Сільськогосподарська мікробіологія. — 2017. — Вип. 25. — С. 10–17.
ISSN 1997-3004

УДК 579:631.461:57.083.13

ВПЛИВ РЕЧОВИН РІЗНОГО ХІМІЧНОГО СКЛАДУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ДІАЗОТРОФІВ НА НАСІННІ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

С. Ф. Козар, Т. А. Євтушенко, В. М. Нестеренко

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: ismav@online.ua

Вивчено вплив вуглеводів, багатоатомних спиртів, сполук білкової природи і натрію хлориду на збереженість діазотрофів на насінні сільськогосподарських культур. Визначено найбільш перспективні речовини та їх комплекси для підтримання життєздатності азотфіксувальних бактерій. Встановлено, що найбільш ефективними є комплекси хімічних сполук, оскільки за їхньої дії чисельність мікробних клітин на насінні була вищою у порівнянні з іншими варіантами. Отримані результати досліджень можуть бути використані для розробки нових способів підвищення життєздатності корисних ґрунтових мікроорганізмів за їх інтродукції в агроценози.

Ключові слова: *діазотрофи, комплекс хімічних речовин, збереженість, життєздатність, стан спокою.*

Асоціативні і симбіотичні азотфіксувальні бактерії, розвиваючись у кореневій зоні рослин, здатні покращувати їх азотне живлення, а також стимулювати ріст і розвиток сільськогосподарських культур [1; 2]. Однак, у результаті дії різних чинників, переважно абіотичних, діазотрофи можуть втрачати свою життєздатність, що слід враховувати при застосуванні інокулянтів, призначених для підвищення продуктивності культурних рослин. Особливо критичним це є в період часу від бактеризації насіння до початку розвитку кореневої системи рослини.

При цьому перспективними для вирішення проблеми можуть бути дослідження особливостей переходу мікроорганізмів у стан спокою, який характеризується зниженням активності метаболічних процесів, але підвищеною життєздатністю. Відомі форми спокою (наприклад, спори бацил, цисти азотобактера), за яких бактерії можуть зберігатися тривалий час. Неспорулюючі бактерії здатні переходити в стан спокою, не утворюючи специфічних структурних форм. До них належать деякі види мікроорганізмів, які здатні активно фіксувати азот атмосфери, зокрема, *Azospirillum brasilense* [3] і *Bradyrhizobium japonicum* [4].

Одним із шляхів подовження термінів зберігання бактеріальних інокулянтів може бути додавання у середовище хімічних добавок. Однак вплив хімічних речовин (полімерів, багатоатомних спиртів, вуглеводів, речовин білкової природи та ін.) на мікроорганізми залежить від тривалості їхньої дії. Різноманітність природи та хімічної структури сполук, які можуть позитивно впливати на життєздатність бактерій, обумовлює і різні механізми їх дії.

У зв’язку з вищезазначеним, вивчення впливу на мікроорганізми речовин різної природи є актуальним.

Матеріали й методи. Дослідження проводили з *Bradyrhizobium japonicum* М-8 [5], *Azospirillum brasilense* 410 [6] при обробці насіння сої сорту Легенда. При цьому бактерії культивували як окремо, так і в змішаній культурі. Консорціум *Azotobacter vinelandii* і *Azotobacter chroococcum* М-70/2 [7] використовували для обробки насіння кабачків сорту Грибовський, *Rhizobium radiobacter* 204 [8] — для обробки насіння пшениці озимої сорту Поліська 90, *Rhizobium leguminosarum* 31 для обробки гороху сорту Царевич.

Мікроорганізми отримано з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту

© С. Ф. Козар, Т. А. Євтушенко, В. М. Нестеренко, 2017

сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Висловлюємо щиру вдячність авторам за люб'язно надані штами.

Застосовували речовини різної хімічної природи: вуглеводи (альгінат натрію, крохмаль, агар-агар, глюкозу, а також мелясу, яка крім вуглеводів містить комплекс хімічних сполук); багатоатомний спирт (маніт); білкової природи (желатин); натрію хлорид та комплекси хімічних речовин (КХР 1 на основі полімерів і сполук білкової природи; КХР 2 на основі багатоатомних спиртів і вуглеводів; КХР 3 на основі багатоатомних спиртів, вуглеводів і речовин білкової природи).

Досліджувані мікроорганізми вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці (220 об./хвилину при 28 °С).

B. japonicum культивували в рідкому живильному середовищі такого складу (г/дм^3): відвар насіння гороху — 100; глюкоза — 10; сахароза — 5; $(NH_4)_2SO_4$ — 1,0; KH_2PO_4 — 0,5; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $CaCO_3$ — 0,3.

Для отримання культури *A. brasilense* використовували живильне середовище такого складу (г/дм^3): кукурудзяний екстракт — 30,0; меляса — 30,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 0,10; KH_2PO_4 — 0,25; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,20; $CaCO_3$ — 0,30.

Для змішаного культивування *A. brasilense* та *B. japonicum* використовували живильне середовище такого складу (г/дм^3): дріжджі кормові (сухі) — 3,0; меляса — 5,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 1,0, KH_2PO_4 — 0,15; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,10; $CaCO_3$ — 0,50.

R. radiobacter вирощували у живильному середовищі такого складу (г/дм^3): гороховий відвар — 100,0; цукор — 40,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 1,0; $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,3; $CaCO_3$ — 1,0; вода водогінна до 1,0 дм^3; pH 6,8–7,0.

Бактерії роду *Azotobacter* культивували в рідкому живильному середовищі такого складу (г/дм^3): сахароза — 20,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0,2; KH_2PO_4 — 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0 (pH 7,2–7,3).

Насіння сільськогосподарських культур бактеризували одночасно із застосуванням хімічних речовин. Вихідна чисельність бактерій складала $2 \cdot 10^5$ клітин на насінину. Бактеризоване насіння зберігали без доступу світла за температури 22 ± 2 °С.

Чисельність бактерій на насінні визначали на 7, 14, 21, 30, 60 та 90-ту добу загальноприйнятими мікробіологічними методами [9; 10].

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням пакета програм Excel та Statistica, вірогідність розходження визначали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Переведення діазотрофів у стан спокою і збереження їх за дії хімічних сполук можливо досягти за використання хімічних речовин, які створюють стресові умови для мікроорганізмів, але не призводять до загибелі бактеріальної клітини (наприклад, багатоатомні спирти), а також за рахунок захисної дії хімічних речовин завдяки здатності утворювати захисну оболонку на поверхні клітин (наприклад, полімери і речовини білкової природи).

У процесі досліджень встановлено, що за дії різних хімічних речовин бактерії зберігалися на насінні довше у порівнянні з контрольним варіантом. На рис. 1 наведено результати вивчення збереженості життєздатності бульбочкових бактерій сої за впливу досліджуваних сполук.

Ефективнішими у порівнянні з іншими речовинами виявились глюкоза, крохмаль, альгінат натрію, натрію хлорид. Однак показники чисельності життєздатних клітин бактерій у варіантах з ними з часом знижувались і в кінці терміну зберігання були на рівні контролю.

На основі отриманих даних підбирали комплекси хімічних речовин. Так, до складу першого комплексу входили речовини, які характеризуються захисною дією бактеріальних клітин. Другий комплекс включав речовини, що володіють бактеріостатичною дією. Третій комплекс розроблено на основі складових перших двох комплексів.

У результаті проведених досліджень встановлено, що при зберіганні насіння протягом тривалого часу чисельність бактерій істотно знижувалась, проте у варіантах з обробкою комплексами хімічних речовин ризобії зберігали свою життєздатність на насінні після обробки найдовше. Слід виділити

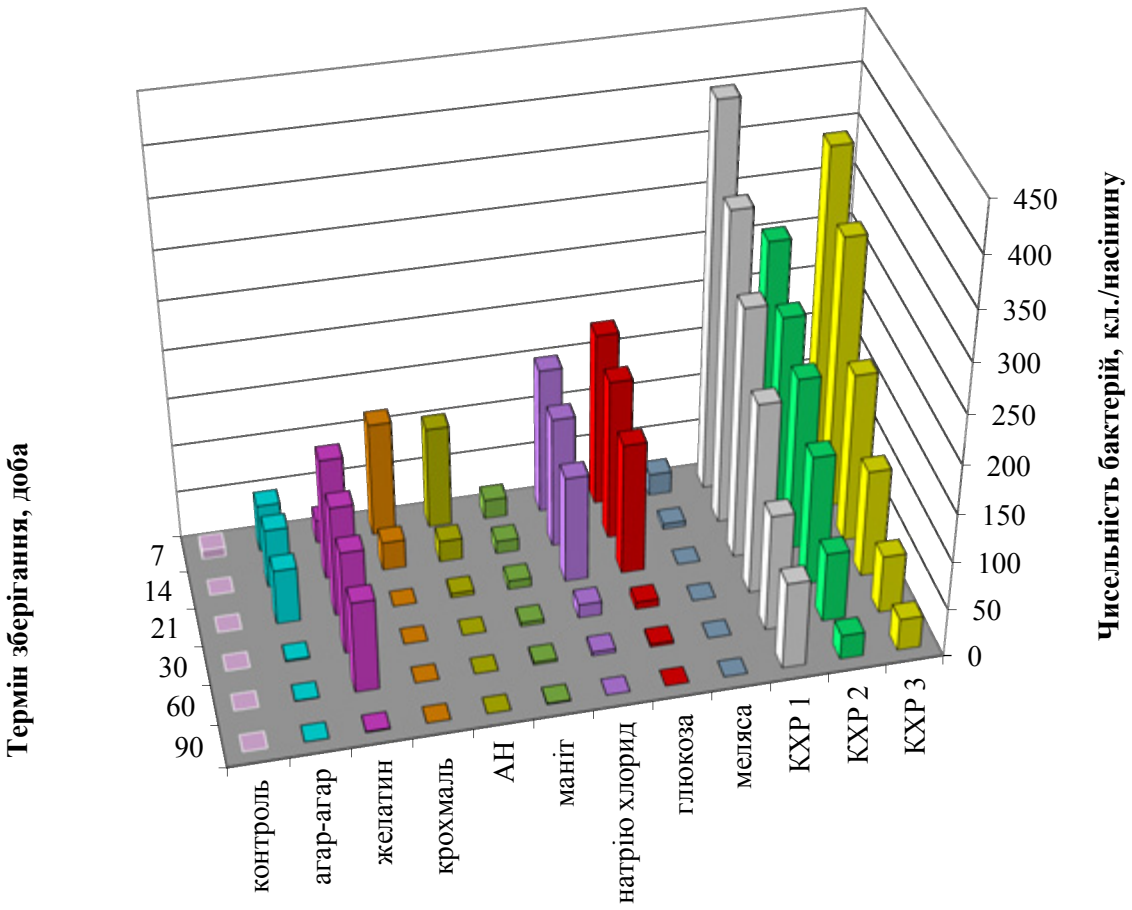

Рис. 1. Вплив хімічних речовин на збереженість B. japonicum М-8 на насінні сої.

КХР 1, за дії якого кількість бульбочкових бактерій сої була вищою в 3,5 рази, ніж за дії КХР 2, а в порівнянні з КХР 3 у 2,5 рази, але не перевищувала 10^2 клітин на насінину.

У дослідах з *A. brasilense* 410 встановлено, що всі досліджувані речовини сприяли подовженню терміну збереженості бактерій (рис. 2).

Однак протягом усього періоду зберігання найвища чисельність мікроорганізмів була за використання комплексів хімічних речовин. Так, за дії КХР 1 чисельність азоспірил перевищувала контроль у 13 разів, у варіанті з КХР 2 — в 7 разів, з КХР 3 — у 9 разів.

З наведених даних видно, що чисельність життєздатних клітин була вищою (як бульбочкових бактерій, так і азоспірил) при використанні полімерів, що можна пояснити їх захисною дією.

При вивченні збереженості на насінні *B. japonicum* М-8, попередньо культивованих сумісно з азоспірилами, встановлено найвищий позитивний вплив на життєздатність бактерій крохмалю (рис. 3), при цьому за дії меляси чисельність ризобій була вірогідно нижчою у порівнянні з іншими сполуками протягом усього терміну зберігання. Через три місяці зберігання серед комплексів найефективнішими були КХР 1 і КХР 2.

Встановлено, що всі досліджувані речовини сприяли подовженню терміну збереженості бактерій роду *Azotobacter* на насінні кабачка (рис. 4). Слід зазначити, що протягом усього терміну зберігання чисельність азотобактера була вищою за дії речовин захисної дії. За використання комплексів хімічних речовин бактеріальні клітини зберігались на насінні довше і їхня кількість перевищила контроль у 3,6 рази за обробки КХР 1, удвічі — з КХР 2 і в 2,5 рази — з КХР 3. При цьому, у варіанті з КХР 1 чисельність життєздатних клітин була на 35 % вище, ніж за використання КХР 3.

При зберіганні *R. leguminosarum* 31 на насінні гороху протягом трьох місяців, як і у

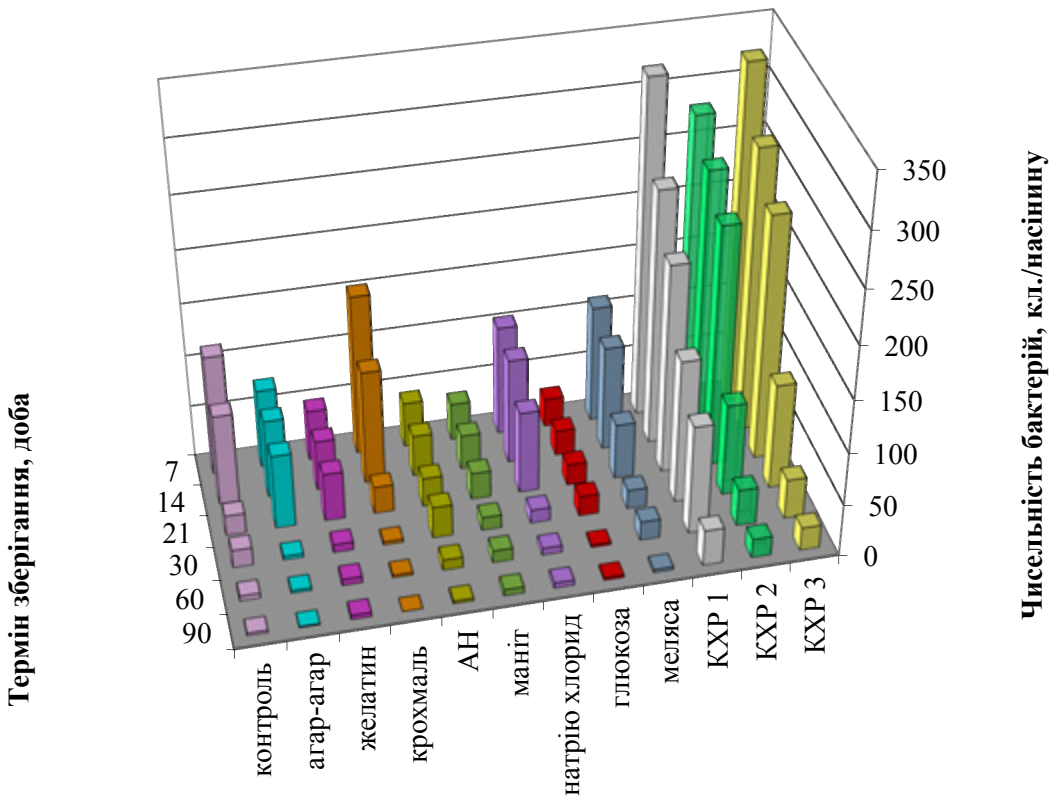

Рис. 2. Вплив хімічних речовин на збереженість A. brasilense 410 на насінні сої.

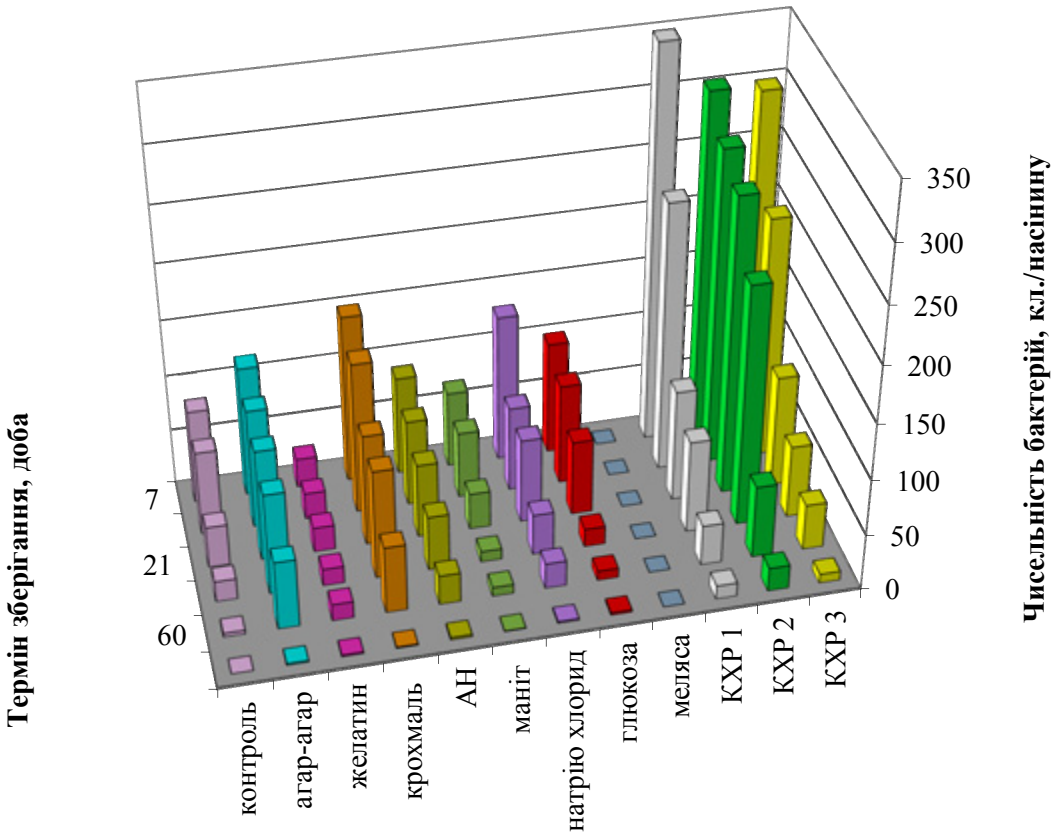

Рис. 3. Вплив хімічних речовин на збереженість B. japonicum M-8 (у змішаній культурі з A. brasilense 410) на насінні сої.

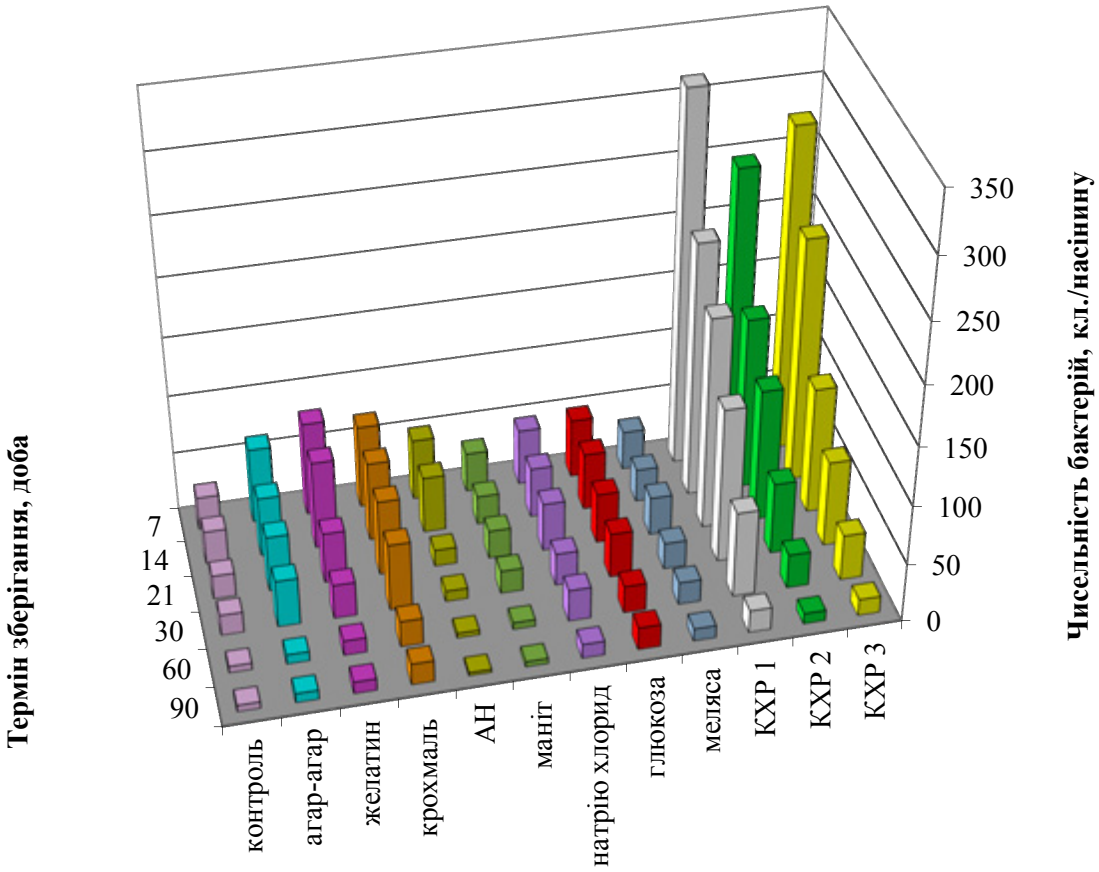

Рис. 4. Вплив хімічних речовин на збереженість A. vinelandii і A. chroococcum M-70/2 (сумарна кількість бактерій) на насінні кабачка.

дослідах з бульбочковими бактеріями сої і азотобактером, ризобії зберігалися краще у порівнянні з контрольним варіантом за дії комплексу, до складу якого входять полімери, що також можна пояснити їх захисною дією.

При використанні вуглеводів бульбочкові бактерії гороху зберігалися краще, ніж у контролі, проте кількість життєздатних клітин була меншою у порівнянні з варіантами, в яких використовували комплекс хімічних речовин КХР 1 (рис. 5): за його дії чисельність бактерій через три місяці зберігання перевищувала контроль у 6 разів.

За зберігання *R. radiobacter* 204 протягом трьох місяців ефективним був желатин (рис. 6). За дії глюкози чисельність бактерій на насінні через 7 днів була найвищою у порівнянні з іншими окремими хімічними сполуками, проте через 90 діб кількість мікроорганізмів знаходилась на рівні контролю. Всі комплекси хімічних речовин були ефективними протягом першого місяця, але в кінці зберігання найефективнішим виявився КХР 1, оскільки за його дії кількість досліджуваних діазотрофів перевищувала контрольний варіант у 7 разів.

Отже, слід зазначити, що після бактеризації насіння азотфіксувальними мікроорганізмами за зберігання його протягом трьох місяців відбувається значне зниження кількості життєздатних клітин бактерій. Додавання речовин різної хімічної природи повністю не зупиняє цей процес, однак сприяє зменшенню його інтенсивності. Для збереження діазотрофів у стані спокою на насінні доцільно використовувати комплекси хімічних речовин, оскільки їх ефективність є значно вищою, ніж використання окремих речовин. Отримані результати досліджень можуть бути використані у подальших розробках способів підвищення життєздатності корисних ґрунтових мікроорганізмів для їх інтродукції в агроценози.

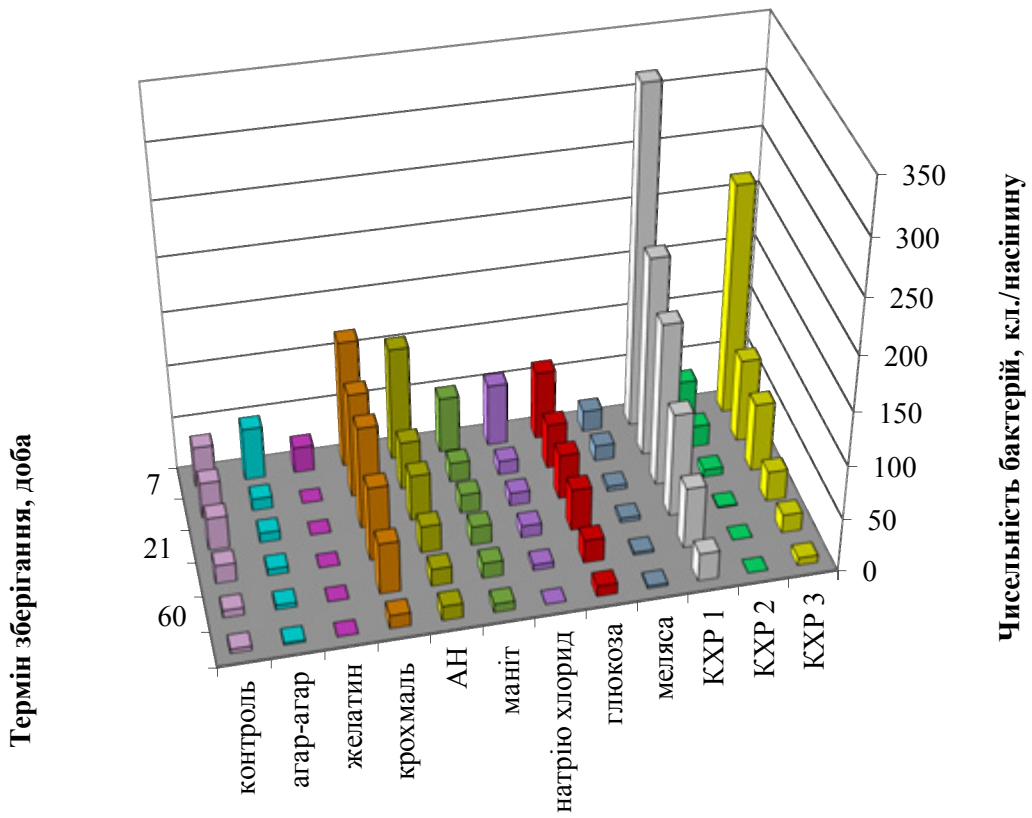

Рис. 5. Вплив хімічних речовин на збереженість R. legutinosarum 31 на насінні гороху.

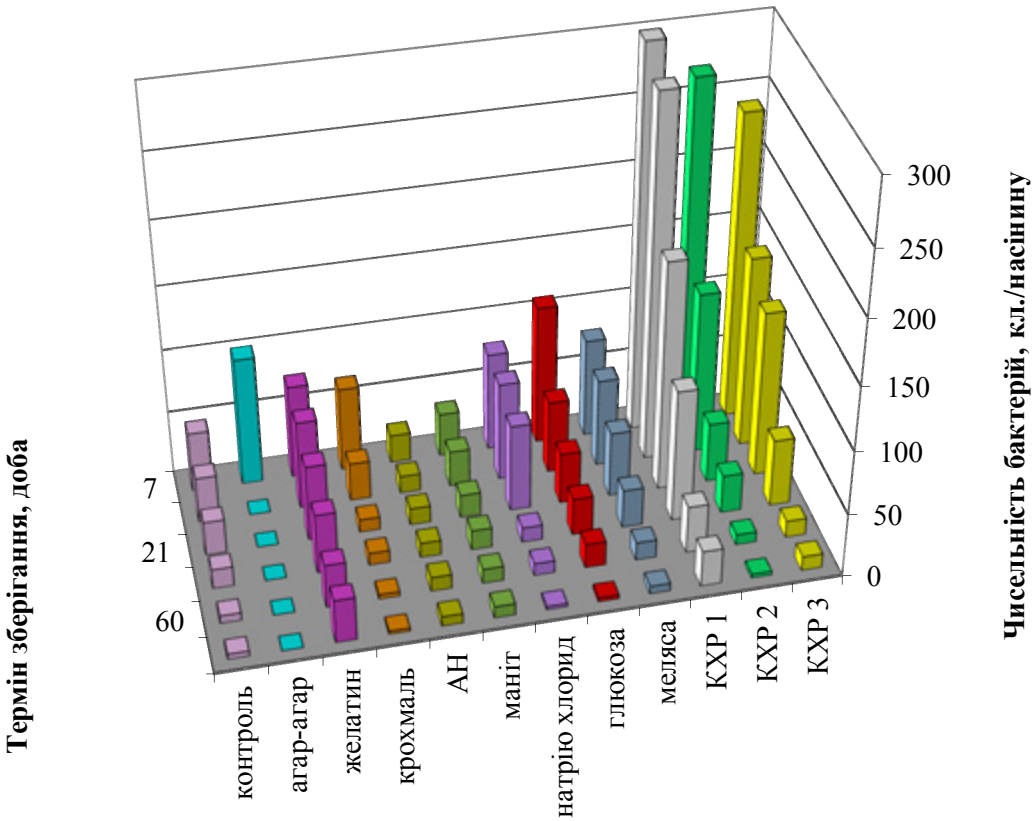

Рис. 6. Вплив хімічних речовин на збереженість R. radiobacter 204 на насінні пшениці озимої.

1. Біологічний азот / [Патика В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін] ; за ред. В. П. Патики. — К. : Світ, 2003. — 422 с.

2. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика : [монографія] / [Волкогон В. В., Надкернична О. В., Ковалевська Т. М. та ін.] ; за ред. В. В. Волкогона. — К. : Аграрна наука, 2006. — 311 с.

3. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* / [Мулюкин А. Л., Сузина Н. Е., Погорелова А. Ю. и др.] // Микробиология. — 2009. — Т. 78, № 1. — С. 42–51.

4. Hirsch A. M. How rhizobia survive in the absence of a legume host, a stressful world indeed / A. M. Hirsch // Symbioses and stress: joint ventures in biology. — Dordrecht, Netherlands : Springer, 2010. — P. 377–391.

5. Пат. 39545 Україна, МПК[5] C 12 N 1/20, C 05 F 11/08. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої / М. З. Толкачов, В. П. Патика, І. О. Каменєва, Л. Ю. Грітчіна. — заявл. 06.10.2000 ; опубл. 15.06.2001, бюл. № 5.

6. Пат. 1806123 СССР, МКИ C 05 F 11/08, C 12 N 1/20. Штамм бактерий *Azospirillum lipoferum* для производства удобрений под райграс пастбищный и костец безостый / [Волкогон В. В., Мальцева Н. Н., Онищенко Л. И. и др.] — № 4916559/13, заявл. 05.03.91 ; опубл. 30.03.93, бюл. № 12.

7. А. с. 1476831 СССР, МКИ[4] С 05 F11/08. Консорциум штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii* для производства бактериальных удобрений под кормовую свеклу и капусту / Ю. М. Мочалов, В. И. Канивец. — № 4086625 / 30-13, заявл. 02.07.86 ; опубл. 03.01.1989.

8. А. с. СССР № 1621433, А 1 С 05 F 11/08, С 12 N 1/20/ Штамм бактерий *Agrobacterium radiobacter* для производства бактериального удобрения под рис и пшеницу / Н. К. Шерстобоев, А. В. Хотянович, В. Ф. Патыка. — заявл. 28.09.88.

9. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии : [учебное пособие для вузов] / Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. ; [ред. Шильниковой В. К.] ; 6-е изд., перераб. и доп. — М. : Дрофа, 2005. — 256 с.

10. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги [пер. с венг. И. Ф. Куренного ; ред. Г. С. Муромцева]. — М. : Колос, 1983. — 296 с.

ВЛИЯНИЕ ВЕЩЕСТВ РАЗНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДИАЗОТРОФОВ НА СЕМЕНАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

С. Ф. Козар, Т. А. Евтушенко, В. Н. Нестеренко

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Изучено влияние углеводов, многоатомных спиртов, натрия хлорида и соединений белковой природы на сохранность диазотрофов на семенах сельскохозяйственных культур. Определены наиболее перспективные вещества и их комплексы для поддержания жизнеспособности азотфиксирующих бактерий. Установлено, что наиболее эффективными являются комплексы химических соединений, поскольку при их влиянии численность микробных клеток на семенах

INFLUENCE OF SUBSTANCES OF DIFFERENT CHEMICAL COMPOSITION ON VIABILITY OF DIAZOTROPHS ON SEEDS OF AGRICULTURAL CROPS

S. F. Kozar, T. A. Yevtushenko, V. N. Nesterenko

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Chernihiv

The influence of carbohydrates, polyatomic alcohols, sodium chloride and compounds of protein nature on the safety of diazotrophs on seeds of agricultural crops has been studied. The most promising substances and their complexes to maintain the viability of nitrogen-fixing bacteria were determined. It has been established that the most effective are complexes of chemical compounds, because under their influence, the number of microbial cells on seeds was higher in comparison with other variants.

была выше по сравнению с другими вариантами. Полученные результаты исследований могут быть использованы для разработки новых способов повышения жизнеспособности полезных почвенных микроорганизмов при их интродукции в агроценозы.

Ключевые слова: *диазотрофы, комплекс химических веществ, сохранность, жизнеспособность, состояние покоя.*

The obtained study results can be used to develop new ways to increase the viability of useful soil microorganisms for their introduction into agrocenoses.

Key words: *diazotrophs, complex of chemical substances, safety, vitality, dormant state.*