

М. С. Корнійчук, Н. Л. Заярнюк, В. Г. Червецова, О. В. Федорова  
Національний університет “Львівська політехніка”,  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

## ДОСЛІДЖЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ІЗ РОДІВ *RHIZOBIUM* ТА *AZOTOBACTER* ЯК РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНОГО БІОПРЕПАРАТУ ДЛЯ ОРГАНІЧНОГО ЗЕМЛЕРОБСТВА

© Корнійчук М. С., Заярнюк Н. Л., Червецова В. Г., Федорова О. В., 2018

Із прикореневої зони салату сійного *Lactuca sativa* виділено мікроорганізми родів *Rhizobium* та *Azotobacter* та перевірено їх рістстимулювальну активність у складі бактеріальної композиції та монокультур. Простерилізоване насіння *Lactuca sativa* пророщено у стерильних та нестерильних умовах. Як препарат-порівняння використано біопрепарат “Азотофіт-Р” на основі *Azotobacter chroococcum*. Оброблення стерильного насіння бактеріальною композицією із родів *Rhizobium* та *Azotobacter* позитивно вплинуло на його ріст. Маса паростків, одержаних із цього насіння, була більшою, ніж з насіння, обробленого препаратом-порівняння.

Ключові слова: ризосфера, біопрепарат, біоінокулянт, біодобриво, культивування, рістстимулювальна активність, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Lactuca sativa*.

M. S. Korniiichuk, N. L. Zayarnyuk, V. G. Chervetsova, O. V. Fedorova

## RESEARCH OF BACTERIAL COMPOSITION BASED ON RHIZOBIUM AND AZOTOBACTER AS THE GROWTH STIMULATING BIOPREPARATION FOR ORGANIC AGRICULTURE

© Korniiichuk M. S., Zayarnyuk N. L., Chervetsova V. G., Fedorova O. V., 2018

Microorganisms of the genera *Rhizobium* and *Azotobacter* were isolated from the radial zone of *Lactuca sativa* and their growth-stimulating activities in the bacterial composition and monocultures were checked. Sterile seeds of *Lactuca sativa* were sprouted in sterile and non-sterile conditions. The Azotophyte-R based on *Azotobacter chroococcum* was used as a reference preparation. The treatment of sterile seeds with the bacterial composition of the genera *Rhizobium* and *Azotobacter* positively influenced its growth. The weight of the germs obtained from this seed was greater than that of the seed treated with the comparator preparation.

Key words: rhizosphere, biopreparation, bioinoculant, biofertilizer, cultivation, growth-stimulating activity, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Lactuca sativa*.

**Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями.** В Україні активно розвивається органічне землеробство, ідея якого полягає у повній відмові від застосування ГМО, антибіотиків, отрутохімікатів та мінеральних добрив та застосуванні біопрепаратів для стимуляції росту рослин, підвищення врожайності сільськогосподарських культур, профілактики та лікування рослин від хвороб, які викликані грибами і бактеріями [1, 2]. Основою для виробництва біопрепаратів є агрономічно корисна мікрофлора, представників якої використовують для компонування біоінсектицидів, фунгіцидів, інокулянтів, деструкторів рослинних решток та біодобрив [3].

Як біоінокулянти перспективні бактерії родини *Rhizobiaceae*, а саме роду *Rhizobium*, які відзначаються здатністю до фосфомобілізації та азотфіксації, перспективні у плані біоконтролю рослин, виділяють біологічно активні речовини для захисту рослин та здатні колонізувати

ризосфери рослин родин *Fabáceae*, *Asteráceae*, *Cruciferae* тощо. Серед переваг роботи із цими бактеріями – можливість їх легкого виділення та перспективність у використанні із іншою агрономічно корисною мікрофлорою.

**Аналіз попередніх досліджень і публікацій.** Бактерії роду *Rhizobium* цікаві для досліджень тому, що вони є симбіотичними стосовно бобових, але здатні успішно колонізувати ризосферу інших рослин, наприклад латуку чи редису [4]. Цінність використання роду *Rhizobium* полягає у тому, що ці мікроорганізми мають здатність до азотфіксації, фосфомобілізації синтезу фітогормонів, таких як ауксини, гібереліни та цитокініни [5, 6]. Перспективним є використання роду *Rhizobium* як агентів біоконтролю небобових. У літературі описано можливість синтезу штамом *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* T24 пептидного антибіотика трифолітоксину, синтезу сидерофорів, таких як антранілат, кацетол, віцибактин тощо [7]. Також *Rhizobium* сприяє покращенню синтезу рослиною фітоалексинів [6]. Бактерії родини *Rhizobiaceae* використовують для одержання монобактеріальних біопрепаратів, проте аналіз літератури показав, що кращими є препарати, що містять композиції декількох різних представників ризосферних мікроорганізмів [3].

Перспективними для використання у складі полібактеріальних біопрепаратів є бактерії роду *Azotobacter*. Ця група мікроорганізмів відзначається здатністю фіксувати атмосферний азот, переводячи його у доступні рослині форми [8], здатна синтезувати фітогормони [3]. Також важливою властивістю представників роду *Azotobacter* є здатність деяких видів (*A. vinelandii*) розкладати хімічні речовини, такі як тетраціанонікелят, які забруднюють навколишнє середовище [3]. Важливо зауважити, що представників роду *Azotobacter* можна використовувати як у вигляді монокультури, так і у поєднанні із мікроорганізмами родів *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* та представниками бульбочкових бактерій (родина *Rhizobiaceae*) [3].

**Метою** роботи є виділення та дослідження бактерій роду *Rhizobium* та *Azotobacter* задля створення бактеріальної композиції та перевірки її рістстимулювальних властивостей.

**Експериментальна частина.** Використано зразки ґрунту із ризосфери рослин *Lactuca sativa* різного походження. Облік бактерій у зразках ризосферного ґрунту здійснено методом Красильникова [9].

Для виділення культури бактерій роду *Azotobacter* використано селективне середовище Ешбі для виділення азотфіксаторів [10]; рН середовища становив 7–7.2; експозиція культивування сім днів за температури  $28 \pm 2$  °С, згідно з методикою, наведеною в [5]. Колонії, що утворилися, були поділені за морфологічними ознаками, пронумеровані та перенесені на свіже агаризоване середовище Ешбі методом посіву газоном, після чого методом виснажувального штриха та культивовані за аналогічних умов. Чітко відокремлені колонії були перенесені на скошений агар Ешбі та знову культивовані за аналогічних умов сім днів до чітких проявів наявності культури.

Для виділення чистої культури бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* було використано модифікований метод, описаний у літературі [9]. Бактерії інкубовано за температури  $28 \pm 2$  °С протягом 1–2 діб до утворення слизистих білуватих непрозорих колоній, схожих на краплі стеарину.

Для отримання робочих суспензій готували розведення із концентрацією мікроорганізмів  $1 \cdot 10^9$  КУО/мл. Для дослідів використано монобактеріальні суспензії *Azotobacter* та *Rhizobium*, а також комплекс, одержаний змішуванням у стерильних умовах рівних об'ємів цих суспензій. Як культуру-порівняння використано промисловий біопрепарат Азотофіт-Р, наявний у продажу, приготування якого здійснювали відповідно до інструкції: 0.5 мл препарату розчиняли в 50 мл води. Інкубація насіння із приготованими бактеріальними суспензіями тривала 1 год, після чого насіння вносили у високі та широкі пробірки (висота 200 мм, ширина 20 мм) на перлітовий субстрат, просочений поживним середовищем такого складу: калійна селітра – 0,5 г/л, суперфосфат – 0,35 г/л, магній сірчаноокислий – 0,3 г/л, амонійна селітра – 0,2 г/л. Експозиція вирощування рослин становила 20 днів за 16–18 °С за природного освітлення у нестерильних та стерильних умовах.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Використання селективного середовища Ешбі дало можливість виявити у ризосфері латуку чотири культури азотфіксувальних бактерій із різною морфологією. Подальше мікроскопування виявило культуру, характерною особливістю якої була наявність капсул із диплококами та виражений поліморфізм, від паличок до коків, залежно від віку культури. Колонія характеризувалась значним виділенням слизу, що є, швидше за все, капсулярним. Колонії округлої форми із однорідною структурою та краплеподібними краями. На середовищі із м'ясо-пептонного агару (МПА) ця культура виділяла в середовище пігмент коричневого кольору. Поєднання факту використання селективного середовища, на якому здатен рости *Azotobacter*, наявність капсул, значне слизовиділення та пігментація дали можливість характеризувати аналізований мікроорганізм як представника роду *Azotobacter*.

Решта представників ризосфери не мали капсул, але відрізнялися формою колоній та пігментацією. Характеристики всіх колоній наведено в табл. 1.

Таблиця 1

### Характеристики колоній

№ культури	Вигляд колонії на середовищі Ешбі	Пігментація на середовищі Ешбі	Форма бактерій
1	Опукла, із рівними краями, дрібна, гладка, із однорідною структурою	Від слабо-коричневого до коричнево-жовтого кольору	Палички
2	Опукла, із рівними краями, дуже малий розмір, гладка із однорідною структурою	Безколірна	Палички
3	Ризоїдна пласка форма, матова структура, край колонії бугристий	Матово-прозорий	Палички
4	Кругла форма, однорідна структура, краплеподібний край, середні розміри	Безколірні	Поліморфізм : від паличок до диплококів

Із бульбочкових утворень на коренях гороху, пересіяних на бобовий агар, ми отримали декілька типів колоній мікроорганізмів. Перший – великі круглі колонії кольору стеарину із краплеподібним профілем та однорідною структурою, що дає підстави вважати: це представник роду *Rhizobium*, а саме *Rhizobium leguminosarum*. Під час мікроскопування виявилось, що ці бактерії мають паличкоподібну форму та є грамнегативними, що ще раз підтверджує те – це *Rhizobium*. Другий тип колоній мав ризоїдну форму, колір стеарину. Мікроскопування показало паличкоподібну форму бактерій. Третій тип колоній – білі вкраплення поміж колоній першого та другого зразків. Під час мікроскопування спостерігались великі паличкоподібні бактерії з товстою клітинною стінкою. Характерна форма бактерій та пігментація колоній на бобовому агарі дає можливість припустити, що вони є представниками родини *Rhizobiaceae*, проте роди цих бактерій ми не ідентифікували.

Суспензії виділених бактерій роду *Azotobacter* (зразок № 4 табл. 1) та *Rh. leguminosarum* використано для оброблення насіння рослини *Lactuca sativa*. Для інокуляції насіння використано монобактеріальні суспензії *Rh. leguminosarum* та *Azotobacter*, а також композицію цих мікроорганізмів з концентрацією  $1 \cdot 10^9$  КУО/мл.

Пророщення насіння відбувалося у нестерильних та стерильних умовах. Морфологія паростків, оброблених бактеріальною композицією *Rhizobium* та *Azotobacter*, відзначалася кращими ростовими показниками: довше стебло, сформоване листя насиченого зеленого кольору, що сприятиме інтенсивному фотосинтезу, та довше коріння, що сприятиме кращому всмоктуванню живильного середовища. Паростки, отримані із насіння, обробленого монобактеріальною суспензією *Rh. leguminosarum*, також мали довге коріння, але не відзначалися інтенсивним верти-

кальним ростом. Паростки, отримані із насіння, обробленого препаратом-порівняння “Азотофіт-Р” та бактеріями роду *Azotobacter*, виділеними із ризосфери *Lactuca sativa*, не відзначалися інтенсивним вертикальним ростом, мали меншу площу листя, здатного до фотосинтезу, та коротше коріння, ніж насіння, оброблене бактеріальною композицією та монобактеріальною суспензією *Rh. leguminosarum*. У табл. 2 наведено маси пророщених насінин у стерильних та нестерильних умовах.

Таблиця 2

Маса паростків *Lactuca sativa* на 20-ту добу експозиції

Назва показника	Az*	K*	Rh*	Az+Rh*	Пр*
у стерильних умовах					
Середнє значення маси паростків, г	0,0073	0,0090	0,0096	0,0106	0,0137
$\sigma^*$	0,00146	0,00392	0,00200	0,00300	0,00654
у нестерильних умовах					
Назва показника	Az*	K*	Rh*	Az+Rh*	Пр*
Середнє значення маси паростків, г	0,0070	0,0071	0,0097	0,0119	0,0060
$\sigma^*$	0,00229	0,00245	0,003	0,00248	0,00246

*Rh* – насіння, оброблене бактеріальною суспензією *Rhizobium leguminosarum*;

*Az* – насіння, оброблене бактеріальною суспензією представника роду *Azotobacter*;

*Rh+Az* – насіння, оброблене бактеріальною сумішшю *R. leguminosarum* та представника роду *Azotobacter*; *Пр* – насіння, оброблене біопрепаратом Азотофіт-Р;

*K* – контроль без інокуляції;

$\sigma$  – середньоквадратичне відхилення

Результати дослідження показали, що створення бактеріальної суміші із представників роду *Azotobacter* та *Rhizobium*, виділених із ризосфери латуку, позитивно впливає на ростові показники останнього. У стерильному перліті маса проростків, оброблених препаратом “Азотофіт-Р”, була більша на 22,6 %, ніж оброблених комплексом *Azotobacter* та *Rhizobium*, але у нестерильному субстраті маса насіння, обробленого комплексом, була більша на 49,6 %, що може свідчити про відсутність антагонізму між бактеріями обох родів та про можливість їх сумісного використання (рис. 1, 2).

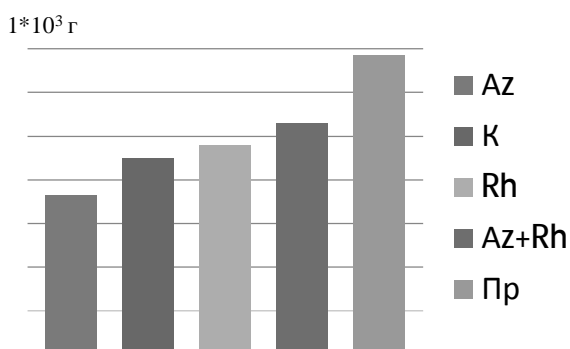


Рис. 1. Усереднені значення маси паростків у стерильних умовах, г

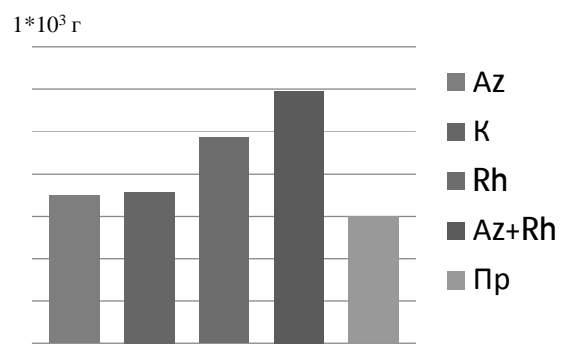


Рис. 2. Усереднені значення маси паростків у нестерильних умовах, г

До складу препарату “Азотофіт-Р” входять мікро- та макроелементи, біологічно активні продукти життєдіяльності бактерій, тобто він виготовлений на основі культуральної рідини. Використання ж композиції родів *Azotobacter* та *Rhizobium* показало оптимальні результати на фоні багатого на поживні та рістстимулювальні сполуки біопрепарату, незважаючи на те, що застосовували не культуральну рідину, а саме змиви із культури на скошеному агарі. Це може свідчити про інтенсивніше виділення корисних речовин, синергізм мікроорганізмів та кращий вплив на насіння бактеріальної композиції. Цей факт є підґрунтям для використання такої композиції бактерій у виготовленні нових інтенсивніших біопрепаратів.

Варто зауважити, що монобактеріальні суспензії також позитивно впливають на ріст рослин, хоча і відстають у деяких випадках за показниками від “Азотофіту-Р” та композиції. Особливу увагу варто звернути на *Rhizobium leguminosarum*. Маса насіння, обробленого цією бактерією, була менша у стерильних умовах від значень комплексу на 9,4 %, а “Азотофіту-Р” на 29,9 %, але у нестерильних умовах маса проростків щодо біопрепарату була більша на 38,3 % та менша від показників комплексу на 18,3 % (рис. 1, 2). Ці дані свідчать про перспективність використання монокультури *Rhizobium leguminosarum* як біостимулятора росту небобових рослин.

**Висновки.** З ризосфери салату сійного *Lactuca sativa* виділено бактерії роду *Azotobacter*, з бульбочкових утворень коріння гороху посівного *Pisum sativum* – роду *Rhizobium* (*R. Leguminosarum*), суспензії яких перевірено на рістстимулювальну здатність під час пророщення насіння салату сійного з метою подальшого використання цієї бактеріальної композиції як біоінокулянта. Показано, що використання полібактеріальної композиції на основі родів бактерій *Rhizobium* та *Azotobacter* для стимуляції росту небобових перспективне та здатне підвищити масу паростків *Lactuca sativa* у нестерильних умовах на 39,9 % порівняно із неінокульованим насінням та на 49,6 % порівняно із насінням, обробленим біопрепаратом “Азотофіт-Р”. Доведено, що *R. leguminosarum* здатен успішно колонізувати та стимулювати ріст небобових навіть у вигляді монобактеріальної суспензії, підвищуючи показники маси проростків у нестерильних умовах на 26,44 % порівняно із неінокульованим насінням та на 38,3 % порівняно із насінням, обробленим біопрепаратом “Азотофіт-Р”.

1. Органічне землеробство в Україні [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://zik.ua/news/2017/09/29/organichne\\_zemlerobstvo](https://zik.ua/news/2017/09/29/organichne_zemlerobstvo). 2. Перелік допоміжних продуктів для використання в органічному сільському господарстві, згідно зі стандартом МАОС (міжнародних акредитованих органів сертифікації), з органічного виробництва і переробки, що еквівалентний постановам ЄС № 834/2007 та № 889/2 [Електронний ресурс] // ТОВ “Органік стандарт”. – 2017. – Режим доступу: <http://www.organicstandard.com.ua/files/>. 3. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В .В. Морзун, С. Я. Коць, Е. В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 3. – С. 187–207. 4. Root Colonization of Maize and Lettuce by Bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* / R. Chabot, H. Antoun, J. W. Kloepper, C. J. Beauchamp // Applied and environmental microbiology. – 1996. – Vol. 62, No. 8. – С. 2767–2772. 5. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentum* / A. A. Ibiene, J. U. Agogbua, I. O. Okonko, G. N. Nwachi. // Journal of American Science. – 2012. – P. 318–324. 6. Bhattacharyya P. N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P. N. Bhattacharyya, D. K. Jha // World J Microbiol Biotechnol. – 2012. – No. 28. – P. 1327–1350. 7. Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi // Indian Journal of Experimental Biology. – 2003. – Vol. 41. – P. 1160–1164. 8. *Azotobacter* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Azotobacter>. 9. Практикум по микробиології / Е. З. Теплер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева. – 2-е изд., перекл. і доп. – Москва: Колос, 1979. – 216 с. 10. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособ. / под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.