

5. *Протопіш І. Г.* Багаторічнібобові трави – безальтернативний попередник пшеницю зимої в умовах правобережного Лісостепу / Протопіш І. Г., Квітко Г. П., Гетман Н. Я. // Корми і кормовиробництво. — 2012. — Вип. 72. — С. 34—39.
6. *Толкачев Н.З.* Биотехнологические аспекты координированной селекции клубеньковых бактерий и бобовых растений / Н.З. Толкачев // Междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 22-24 мая 2002 г.). — Минск, 2002. — С. 152—153.

*Л.В. Кириленко, Ю.Н. Шкатула*

Винницький національний аграрний університет, Україна

#### ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ В АГРОЦЕНОЗАХ КОЗЛЯТНИКА ВОСТОЧНОГО

В статье обобщаются данные исследований по взаимодействию активных штаммов клубеньковых бактерий *Rhizobium galegae* с различными сортами козлятника. На основе результатов полевых экспериментов с десятью исследуемыми штаммами *Rhizobium galegae* отобрано четыре - 0703, 0721, 159 и Л2, которые формируют эффективный симбиоз со всеми исследуемыми сортами козлятника. Установлено, что предпосевная обработка семян данными штаммами активизирует усвоение молекулярного азота и обеспечивает повышение урожайности зеленой массы растений козлятника.

*Ключевые слова:* *Rhizobiumgalegae*, козлятник, симбиотическая система, азотфиксация, штамм

*L.V. Kirilenko, J.M. Shkatula*

Vinnitsia National Agrarian University, Ukraine

#### THE EFFICIENCY OF SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN THE AGROCENOSIS GALEGAE ORIENTALIS

The article summarized data from studies on the interaction of active strains of nodule bacteria *Rhizobium galegae* with different varieties of *Galegaeorientalis*. On the basis of field experiments with ten strains of *Rhizobiumgalegae* researched selected four - 0703, 0721, 159 and A2, which form an effective symbiosis with all the studied varieties *Galegaeorientalis*. Found, that pre-sowing seed these strains activates the absorption of molecular nitrogen and increase the of green plants of *Galegaeorientalis*.

*Keywords:* *Rhizobium galegae*, *Galegaeorientalis*, a symbiotic system, nitrogen fixation, the strain

Рекомендує до друку

В.П. Патика

Надійшла 17.04.2014

УДК 631.461.5

О. В. КИРИЧЕНКО

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022

### **ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНИХ СИМБІОЗІВ ЗА ІНТРОДУКЦІЇ РИЗОБАКТЕРІЙ НА НАСІННЯ**

У вегетаційних умовах досліджували нітрогеназну активність корневих бульбочок сої протягом вегетації рослин за умов комплексної бактеризації насіння композиціями специфічних рослині-хазяїну ризобій та діазотрофів родів *Azotobacter* і *Enterobacter*. Виявлено переваги у ефективності дії комплексної інокуляції щодо функціональної здатності корневих бульбочок і формування вегетативної маси рослинами порівняно з традиційною бактеризацією насіння ризобіями.

*Ключові слова:* соя, бульбочкові бактерії, азотобактер, ентеробактер, комплексна бактеризація, нітрогеназна активність

Бактеріальні препарати на основі азотфіксувальних (діазотрофних) мікроорганізмів складають суттєву частину сучасних мікробних біотехнологій у рослинництві [3, 7, 10]. Завдяки їх застосуванню поліпшуються показники якості ґрунтів і підвищується продуктивність культурних рослин. Високим азотфіксувальним потенціалом характеризуються бобово-ризобіальні симбіози [2]. Важливою складовою агрофітоценозів і ефективним елементом мікробних біотехнологій є так звані ризобактерії (роди *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Bacillus* та ін.), які здатні до синтезу рістрегулювальних і антибіотичних сполук, азотфіксації, мобілізації недоступних рослинам сполук фосфору, біоремедіації [6, 7, 9, 12]. Азотфіксувальний потенціал ґрунтових вільноіснуючих та асоціативних діазотрофів становить від 2-5 до 60 кг азоту на гектар за вегетаційний період [10] і є значно нижчим за азотфіксувальну активність бобово-ризобіальних симбіозів [2]. Розробка прийомів активації ферментів азотного метаболізму і, в першу чергу, нітрогенази, дозволить поліпшити умови зв'язування та засвоєння азоту мікросимбіонтами та підвищити інтенсивність азотного обміну в агроценозах. Одним із таких прийомів є комплексна бактеризація насіння бобових культур специфічними бульбочковими бактеріями і агрономічно корисними ризобактеріями. Встановлено, що ризобактерії здатні посилювати утворення корневих бульбочок, активізувати ферменти асиміляції азоту – нітрогеназу, глутаматсинтазу, глутаматдегідрогеназу, а також підвищувати вміст білка у вегетативних органах і насінні рослин [3, 4, 7, 14, 15].

Метою даної роботи було дослідження нітрогеназної активності корневих бульбочок сої, утворених *Bradyrhizobium japonicum* 6346 за інтродукції діазотрофів родів *Azotobacter* і *Enterobacter* на насіння.

#### Матеріал і методи досліджень

Об'єктами дослідження були рослини сої (*Glycine max* L. Merr.) сорту Аннушка (ранньостиглий, «Соевий вік», Кіровоград), бульбочкові бактерії *B. japonicum* 6346 і ризосферні діазотрофи *Azotobacter chroococcum* T79 [11] та *Enterobacter* (бактеріальна композиція коктейль [8]). Дослідження проводили у вегетаційних умовах за схемою: варіант №1 – насіння сої неінокульоване; №2 – інокульоване *B. japonicum* 6346; №3 – насіння оброблене *B. japonicum* 6346 + *Azotobacter chroococcum* T79; №4 – насіння оброблене *B. japonicum* + *Enterobacter*. Культури *B. japonicum*, *Enterobacter*, *A. chroococcum* (ІФРГ НАНУ, Київ) вирощували протягом 10 і 3 діб при 28°C на середовищах манітно-дріжджовому агарі та Ешбі [1]. Титр клітин бульбочкових бактерій становив  $10^9$  кл/мл, ризобактерій  $10^8$  кл/мл. У композиціях культури змішували (v:v, 1:1) та інкубували протягом доби, отже, комплексні інокулянти містили ризобіальних клітин вдвічі менше, ніж моноінокулянт. Інокуляцію насіння здійснювали протягом 1 год до висіву. Неінокульоване насіння обробляли водою (абсолютний контроль, а. к.). Аналізували по 10-30 рослин кожного варіанту при кожному відборі (табл.). Нітрогеназну активність корневих бульбочок тестували ацетиленовим методом за Харді зі снівав. [13] на приладі Chromatograf 504 (Польща, «MeraElwgo»). Нітрогеназну активність симбіотичного апарату виражали у мкмоль  $C_2H_4$  / (рослину • год) – загальна активність, мкмоль  $C_2H_4$  / (г бульбочок • год) – питома активність.

#### Результати досліджень та їх обговорення

Показано, що на ранньому етапі розвитку сої (18-денні рослини) процес фіксації азоту симбіотичними системами всіх варіантів був відсутнім. Початок перетворення азоту в корневих бульбочках сої виявлено у фазу розвитку трьох справжніх листків (табл.), що підтверджує існуюче уявлення щодо прямого зв'язку між початком інтенсивної фіксації азоту й активним розвитком фотосинтетичного листового апарату рослин [2]. Однак, лише у рослин, насіння яких інокулювали бульбочковими бактеріями (№ 2) відмічено наявність функціональних бульбочок. Відсутність азотфіксації у варіантах № 3, 4 на даному етапі розвитку сої може бути пов'язана з меншим ризобіальним навантаженням суспензії, оскільки комплексні інокулянти містили вдвічі меншу кількість клітин бульбочкових бактерій.

Азотфіксувальна здатність корневих бульбочок варіанту з ризобіями за рахунок поліпшення азотного живлення забезпечила й активне формування рослинами вегетативної маси (табл.). Абсолютно суха (а. с.) маса рослин даного варіанту перевищувала а. к. вдвічі, інші дослідні варіанти – в 1,4 і 1,5 рази відповідно. Отже, перевага в азотному живленні рослин

## ЕКОЛОГІЯ

варіанту № 2 за наявності процесу біологічного перетворення азоту в симбіотичних структурах – корневих бульбочках є очевидною. Рослини варіантів № 3, 4 за вегетативною масою відрізнялися від рослин а. к. на 46 і 36%, що свідчить про наявність рістрегуляторної дії біологічно активних речовин мікробного походження [3, 6, 9, 12] на рослину за відсутності процесу фіксації азоту соєво-ризобіальними симбіозами.

Таблиця

Нітрогеназна активність корневих бульбочок і формування вегетативної маси рослинами сої  
за інтродукції ризобактерій на насіння

№	Варіант	Нітрогеназна активність, мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> на				Абсолютно суха маса рослини	
		(рослину • год)	%	(г бульбочок • год)	%	г	%
Примордiальний листок, 18-денні рослини							
1	Вода (а. к.)	-		-		0,21±0,02	100
2	Ризобії (штам-контроль)	0		0		0,20±0,01	95/100
3	Ризобії + азотобактер	0		0		0,25±0,01**	119/125
4	Ризобії + ентеробактер	0		0		0,24±0,01**	114/120
Три справжніх листки, 34-денні рослини							
1	Вода (а. к.)	-		-		0,44±0,03	100
2	Ризобії (штам-контроль)	0,096±0,012	100	8,463±1,435	100	0,90±0,07*	205/100
3	Ризобії + азотобактер	0		0		0,64±0,05**	146/71
4	Ризобії + ентеробактер	0		0		0,60±0,05**	136/67
Бутонізація-початок цвітіння, 40-денні рослини							
1	Вода (а. к.)	-		-		1,09±0,09	100
2	Ризобії (штам-контроль)	0,420±0,179	100	7,010±1,541	100	1,32±0,12*	121/100
3	Ризобії + азотобактер	0,541±0,141	129	18,745±6,233**	267	1,24±0,07*	114/94
4	Ризобії + ентеробактер	2,247±0,429**	535	24,576±3,365**	351	1,44±0,11*	132/109
Активне утворення бобів, 55-денні рослини							
1	Вода (а. к.)	-		-		1,66±0,12	100
2	Ризобії (штам-контроль)	1,821±0,252	100	9,084±1,397	100	2,06±0,18*	124/100
3	Ризобії + азотобактер	3,409±1,537**	187	21,677±0,361**	239	2,23±0,22*	134/108
4	Ризобії + ентеробактер	2,276±0,549	125	18,306±3,328**	202	1,48±0,03**	89/72

Примітка. \* - достовірно ( $p \leq 0,05$ ) до абсолютного контролю (№ 1), \*\* - достовірно до штам-контролю (№ 2). Відсоток (%) перед рискою – відносно варіанту № 1, за рискою – варіанту № 2. «-» - відсутність корневих бульбочок у варіанті № 1.

Рістрегуляторна дія мікробних екзометаболітів, одними з основних активуючих компонентів яких є гормони цитокинінової й ауксинової природи [6, 12] бактерій родів *Azotobacter* і *Enterobacter*, як додаткових компонентів комплексних інокулянтів, більш виражена на ранньому етапі онтогенезу сої (18-денні рослини). Вегетативна маса рослин варіантів № 3 і 4 на 14-19% і 20-25% перевищувала значення а. к. і штам-контролю відповідно. Значення а. с. маси рослин за інокуляції ризобіями знаходилося на рівні а. к., поясненням чого може бути однаковий вихідний рівень азотного живлення рослин (0,25 норми мінерального азоту за Гельригелем у субстраті росту). Перевага ж у накопиченні вегетативної маси рослинами варіантів із комплексною

бактеризацією насіння може бути пояснена активуючим впливом додаткових компонентів інокулянтів – агрономічно корисних бактерій, екзометаболіти яких містять низку біологічно активних речовин [6, 9] і здійснюють пряму гормональну регуляцію росту і розвитку рослин [5]. Так, азотобактер і ентеробактер, поряд із псевдомонадами, бацилами, азоспірилами вважають найбільш активними продуцентами фітогормонів серед ризосферних і епіфітних бактерій [6, 12].

У фазу бутонізації—початку цвітіння рослин сої за нітрогеназною активністю корневих бульбочок встановлена суттєва різниця між варіантами (табл.). Композиція ризобії + азотобактер сприяла зростанню загальної та питомої активності симбіотичного апарату сої в 1,3 і 2,3 рази. Композиція ризобії + ентеробактер максимально підвищувала рівень фіксації азоту: загальна нітрогеназна активність симбіотичного апарату сої зросла в 5,4 рази, питома – в 3,5 рази. Інтенсивна фіксація азоту симбіозом варіанту № 4 забезпечила активне накопичення рослинами вегетативної маси порівняно до інших варіантів досліду, яка на 32 і 9% перевищувала показники а. к. і штам-контролю відповідно (табл.).

У фазу активного утворення бобів рослини варіантів із інтродукцією на насіння бактерій родів *Azotobacter* і *Enterobacter* мали достатньо високий рівень функціональної активності симбіозів: в 1,9-2,4 рази (№ 3) та в 1,3-2,0 рази (№ 4) вище за активність симбіозу варіанту № 2. Отже, передпосівна бактеризація насіння сої композицією ризобії + ентеробактер максимальну ефективність проявила під час бутонізації-початку цвітіння рослин, ризобії + азотобактер – у фазу активного утворення бобів.

### Висновки

Переваги інтродукції ризобактерій родів *Azotobacter* і *Enterobacter* на насіння сої у складі комплексних інокулянтів з ризобіями порівняно до бактеризації *B. japonicum* 634б проявлялися у утворенні корневих бульбочок із високою функціональною здатністю до фіксації молекулярного азоту та активному формуванні рослинами вегетативної маси, особливо у першу половину вегетації сої за рахунок як мікробних метаболітів рістрегуляторної дії, так і підвищеного за азотом режиму живлення рослин.

1. Антипчук А.Ф. Практикум з мікробіології. Навчальний посібник / Антипчук А.Ф., Піляшенко-Новохатній А.І., Євдокименко Т.М. — К.: Університет «Україна», 2011. — 156 с.
2. Биологическая фиксация азота. Бобово-ризобияльный симбиоз / [Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др.]. — Т. 1. — К.: Логос, 2010. — 506 с.
3. Биорегуляция микробно-растительных систем / [Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреюк Е.И. и др.]. — К.: Ничлава, 2010. — 464 с.
4. Влияние штаммов *Bacillus subtilis* на продуктивность растений гороха при автономной и совместной инокуляции со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1078 / [Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Шавалеева Д.В. и др.] // Агрохимия. — 2008. — № 10. — С. 34—39.
5. Волобуева О.Г. Изменение содержания эндогенного уровня фитогормонов бобовых растений под влиянием ризобий и ризобактерий и эффективность симбиоза / Волобуева О.Г., Скоробогатова И.В., Мирошникова М.П. // Доклады ТСХА. — 2009. — № 281. — С. 165—167.
6. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов / [Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.] // Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 3. — С. 261—268.
7. Кириченко Е.В. Биотехнологии в растениеводстве / Е.В. Кириченко. — Николаев: Илион, 2014. — 436 с.
8. Кириченко О.В. Морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості ізолятів ризосферних діазототрофів пшениці / Кириченко О.В., Жемойда А.В., Капралова Ю.О. // XII з'їзд ТМУ, 24-30 травня 2009 р., Ужгород: Патент, 2009. — С. 378.
9. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение / [Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.] // Прикл. биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 133—143.
10. Мікробні препарати у землеробстві : теорія і практика / [Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М. та ін.]. — К.: Аграрна наука, 2006. — 312 с.
11. Патент України № 62820А6 МПК7 C05F11/08, C12N1/20, Штам бактерій *Azotobacter chroococcum* T79 для одержання бактеріального добрива під сою / Коць С.Я., Титова Л.В., Кириченко О.В. та ін. — Заявл. 19.06.2003, опубл. 15.12.2003. — Бюл. № 12.
12. Продукування фітогормонів деякими вільно існуючими та симбіотичними ґрунтовими мікроорганізмами / [Драговоз І.В., Леонова Н.О., Білявська Л.О. та ін.] // Доповіді НАН України. — 2010. — № 12. — С. 154—159.

13. Hardy R.W.F. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation / Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D. // Soil. Biol. Biochem. — 1973. — V. 5, N 1. — P. 41—83.
14. Influence of rhizobium and free-living nitrogen-fixing bacteria on nitrogen assimilation enzymes of soybean plants / [ Kuprava N., Betsiashvili M., Dzamukashvili N., Sadunishvili T.] // Bull. Georg. Acad. Sci. — 2006. — V. 173, N 2. — P. 348—351.
15. Nogueira S.V., de Souza F., Martinez C.R. et al. Estipes de *Paenibacillus* promotoras de nodulacao especifica na simbiose *Bradyrhizobium* – caupi / Acta Sci. Agron. — 2007. — V. 29, N 3. — P. 331—338.

*Е. В. Кириченко*

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

#### ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНЫХ СИМБИОЗОВ ПРИ ИНТРОДУКЦИИ РИЗОБАКТЕРИЙ НА СЕМЕНА

В вегетационных условиях исследовали нитрогеназную активность корневых клубеньков сои на протяжении вегетации растений при комплексной бактеризации семян композициями специфичных растению-хозяину ризобий и diaзотрофов родов *Azotobacter* и *Enterobacter*. Выявлены преимущества в эффективности действия комплексной инокуляции относительно функциональной способности корневых клубеньков и формирования вегетативной массы растениями по сравнению с традиционной бактеризацией семян ризобиями.

*Ключевые слова:* соя, клубеньковые бактерии, азотобактер, энтеробактер, комплексная бактеризация, нитрогеназная активность

*О. V. Kyrychenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine

#### FEATURES OF SOYBEAN-RHIZOBIUM SYMBIOSES FUNCTIONING AT THE INTRODUCTION OF RHIZOBACTERIUM ON SEED

The soybean root nodule nitrogen fixing activity during of plants vegetation at the seed complex bacterization of the compositions based of specific for host-plant rhizobium and diazotrophic bacteria of *Azotobacter* and *Enterobacter* was investigated in the greenhouse experiment. It was shown the advantages on the effect of complex inoculations in relation to the root nodules functional ability and forming of vegetative mass plants as compared to traditional rhizobium seed bacterization.

*Keywords:* soybean, nodule bacteria, azotobacter, enterobacter, complex bacterization, nitrogen fixing activity

Рекомендує до друку

Надійшла 24.04.2014

С.В. Пида

УДК 579.64:632.937.3

А.М. КЛИМЕНКО, Я.В. ЧАБАНЮК

Институт агроекології і природокористування НААН України  
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143

### **ВИКОРИСТАННЯ ДІАЗОТРОФІВ У СИСТЕМІ ПІДГОТОВКИ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ**

Проаналізовано деякі особливості штаму *Paenibacillus polymyxa* 6M і можливості його сумісного використання з іншими мікробними препаратами та хімічними засобами захисту рослин для передпосівної підготовки насіння. Штам *P. polymyxa* 6M поряд з вираженими антифунгальними властивостями демонструє достатньо високий рівень активності засвоєння молекулярного азоту та нерозчинних фосфорних сполук завдяки здатності штаму утворювати спори високий титр культури зберігався до 3 місяців на поверхні інокульованого насіння ячменю.