

analysis of nucleotide sequences of the 16S rRNA gene fragment isolates are close to the representatives of the *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*. Study of the endophytic bacteria acetylene-reductase activity in pure culture showed that two isolates, phylogenetically close to the *Paenibacillus* and *Acinetobacter*, are able to fix the atmospheric nitrogen. Their nitrogen-fixing activity was larger than the *Azotobacter* reference strain rate.

Keywords: soybean-rhizobial symbiosis, endophytic bacteria of nodules, taxonomy, nitrogen fixation

Рекомендує до друку

Надійшла 10.04.2014

В.П. Патика

УДК 579.266.2:574.38

А.А. БУНАС, Я.В. ЧАБАНЮК, О.М. ДМИТРУК

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

АЗОТФІКСУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ РИЗОСФЕРИ РОСЛИН ЗАЛЕЖНО ВІД ЕКОТОПУ ІЗОЛЮВАННЯ

Вивчено вплив різних доз азотного добрива на структуру та функціонування мікробіоценозу ризосфери рослин ріпаку. Виявлено, що 78% бактеріальних ізолятів, виділених з рослин ризосфери ріпаку, можуть використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральний і органічний азот або за відсутності зв'язаних форм цього елемента, фіксувати інертний молекулярний азот атмосфери з різною активністю. Встановлено, що бактеріальні ізоляти А-29 та К-11, виділені з контрольного варіанту, володіли найвищим рівнем азотфіксації.

Ключові слова: ріпак, ризосферні мікроорганізми, нітрогеназна активність

Високородючі ґрунти України еволюційно сформувались здебільшого під степовими фітоценозами, в яких найважливішу роль азотонакопичувачів виконують бактерії, які фіксують азот атмосфери в умовах вільного існування, або в асоціативній взаємодії з рослинами [3, 5]. Основна частина мікроорганізмів ризосфери рослин представлена гетеротрофами, що використовують у своїх трофічних шляхах кореневі виділення рослин. Таким чином, взаємодії мікроорганізмів у ризосфері рослин базуються на фоні міжвидової конкуренції за трофічні ресурси [1]. В умовах конкурентних взаємовідносин у ґрунті домінуюча роль належить популяціям, що володіють високим рівнем адаптивності до чинників середовища існування.

З метою вивчення особливостей функціонування трофічних взаємодій в угрупованні мікроорганізмів основних еколого-трофічних та таксономічних груп ризосфери рослин ріпаку залежно від доз внесеного азоту мінеральних добрив проведено скринінг та дослідження азотфіксувальних властивостей діазототрофних ізолятів, виділених із ризосферного ґрунту досліджуваних агроценозів.

Матеріал і методи досліджень

Ґрунтові зразки ризосфери рослин ріпаку відбирали впродовж вегетації в тимчасовому польовому досліді Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН: у II декаді травня (фаза цвітіння); II декаді червня (фаза дозрівання врожаю); II декаді липня (після збору врожаю). Культура – ріпак озимий сорту Чорний велетень. Облікова площа ділянок – 25 м². Розміщення варіантів досліді – систематичне послідовне. Повторність – чотирикратна.

Схема досліді: 1. Контроль (без внесення добрив); 2. N₁₂₀P₈₀K₁₄₀; 3. N₁₅₀P₈₀K₁₄₀; 4. N₁₈₀P₈₀K₁₄₀.

Використовували мінеральні добрива: аміачну селітру, суперфосфат простий та калій хлористий. На дослідній ділянці перед посівом ріпаку озимого створювали фон фосфорних та калійних добрив у концентрації 80 кг/га та 140 кг/га відповідно. Підживлення рослин ріпаку

азотними добривами в усіх дослідних варіантах здійснювали навесні наступного року в три етапи залежно від варіанта досліджу.

Виділення домінуючих ізолятів мікроорганізмів, їх морфологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні властивості визначали загальноприйнятими у мікробіології методами [4]. Домінантними вважались мікроорганізми, які на чашці Петрі склали більше 10%.

Азотфіксувальну активність домінантних ізолятів визначали методом Харді в модифікації Умарова [4].

Результати досліджень та їх обговорення

Рослини ріпаку для формування оптимальної вегетативної маси, високого і якісного урожаю потребують внесення великої кількості мінеральних добрив, особливо азотних. За таких умов, найбільший інтерес при дослідженні мікроорганізмів-домінантів основних еколого-трофічних та таксономічних груп ризосфери рослин ріпаку викликають амоніфікуючі бактерії та бактерій, що здатні асимілювати мінеральні форми азоту. В лабораторних умовах виділено 82 бактеріальні ізоляти, з яких 40 ізолятів віднесено до амоніфікаторів та 42 ізоляти – до групи бактерій, що використовують мінеральні форми азоту.

Спираючись на принцип дублювання функцій мікроорганізмів [2] у мікробіоценозі намагались встановити діапазон трофності виділених домінантних ізолятів амоніфікаторів і бактерій, що асимілюють мінеральний азот мають здатність рости на середовищах зі змінним джерелом азоту (органічний ↔ мінеральний, тобто МПА ↔ КАА) або за відсутністю цього елемента, фіксувати його з атмосфери (седовище Ешбі розведене в 100 разів).

Проаналізувавши отримані дані, виявили, що 78% з виділених бактеріальних ізолятів проявили широкоспецифічні властивості (рис. 1), тобто бактерії володіють здатністю використовувати в своїх трофічних ланцюгах мінеральний, органічний азот або за відсутністю цього елемента, фіксувати його з різною активністю. Оскільки переважна частка мікроорганізмів є широко специфічними, то саме вона більш повно відображає властивості мікробіоценозу [1, 2]. Перспективність ізолятів діазотрофів оцінюють за конкурентоздатністю до ніш існування, спроможністю колонізувати корені рослин, невимогливістю до умов існування, швидкістю росту і використанням поживних речовин, продукції біологічно активних речовин тощо [6].

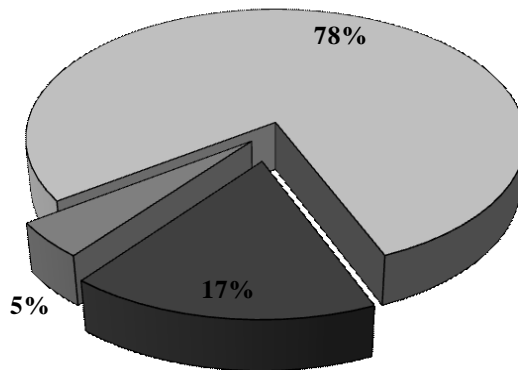


Рис. 1. Частка широкоспецифічних бактеріальних ізолятів серед виділених домінантних ізолятів ризосфери ріпаку:

■ широкоспецифічні, ■ середньоспецифічні, ■ вужькоспецифічні

Тому, визначення азотфіксувальних властивостей бактеріальних ізолятів виділених з ризосфери рослин ріпаку, проводили на тих ізолятах, що володіли широким діапазоном трофності та за всіма ознаками були діазотрофами.

Виявлено, що всі 10 ізолятів, виділені з ризосфери рослин ріпаку контрольного варіанту володіють здатністю синтезувати фермент нітрогеназу. Рівень відновлювання ацетилену коливався в межах 2,22 до 18 нМ C₂H₂/мл/год. Найвищий рівень нітрогеназної активності виявлено у ізоляту А-29, найнижчий – для ізоляту А-27.

Дослідження нітрогеназної активності ізолятів, виділених з кореневої зони рослин ріпаку екотопів, де вносили азот у кількості 120 і 150 кг/га, показує, що рівень активності азотфіксувального ферменту більшості ізолятів, а саме 11, коливався в межах 6–8 нМ C₂H₂/мл/год. Виключенням став ізолят К-17 та А-2 з рівнем активності нітрогенази 15,0 та 11 нМ C₂H₂/мл/год, відповідно.

Бактеріальні ізоляти, виділені з ґрунту ризосфери рослин ріпаку де вносили 180 кг/га азоту, проявили нітрогеназну активність у межах 5–6 нМ С₂Н₂/мл/год, що вказує на вибірковість середовища існування.

Висновки

Результати дослідження нітрогеназної активності, діазотрофних ізолятів, виділених з ризосфери рослин ріпаку, свідчать, що рівень синтезу азотфіксувального ферменту залежить від концентрації азоту в середовищі зі збільшенням його вмісту в ґрунтовому розчині активність знижується, тобто поліфункціональна мікробіота блокує процес азотфіксації і споживає доступний елемент. Але необхідно зауважити, що у контрольному варіанті різноманіття діазотрофів і діапазон їх азотфіксувальної властивості набагато більший порівняно з іншими екотопами дослідження.

1. *Белимов А.А.* Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: автореф. дис. на соискание уч. степени доктора б. наук: спец. 03.00.07 «Микробиология» / А. А. Белимов. — С.-Петербург, 2008. — 46 с.
2. *Белимов А.А.* Приживаемость и эффективность корневых диазотрофов при инокуляции ячменя в зависимости от температуры и влажности почвы / А.А. Белимов, С.М. Поставская, А.П. Кожемяков и др. // Микробиология. — 1994. — Т. 63. — С. 900—908.
3. *Біологічний азот: [монографія]* / [Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., Шерстобоева О.В., Мельничук Т.М., та інші]; за ред. В.П. Патики — К.: Світ, 2003. — 424 с.
4. *Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія* / [Волкогон В.В., Надкернична О.В., Токмакова Л.М., Мельничук Т.М., Чайковська Л.О та інші]; за ред. В.В. Волкогона. — К.: Аграрна наука. — 2010. — 464 с.
5. *Кожемяков А.П.* Эффективность препаратов корневых диазотрофов при бактериализации ярового рапса / А.П. Кожемяков, А.А. Белимов // Агрехимия. — 1994. № 7 — 8. — С. 62—67.
6. *Smil V.* Biofixation and nitrogen in biosphere and in global food production / V. Smil // Nitrogen Fixation: Global Perspectives (eds. T. Finan, M. O'Brian, D. Layzell, K. Vessey, W. Newton). — 2000. — P. 7—11.

А.А. Бунас, Я.В. Чабанюк, А.М. Дмитрук

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭКОТОПОВ ИЗОЛИРОВАНИЯ

Проведено исследование по изучению влияния различных доз азотного удобрения на структуру и функционирование микробиоценоза ризосферы растений рапса. Выявлено, что 78% бактериальных изолятов, выделенных из растений ризосферы рапса, могут использовать в своих трофических цепях минеральный и органический азот или при отсутствии связанных форм этого элемента фиксировать инертный молекулярный азот атмосферы с разной активностью. Установлено, что бактериальные изоляты А-29 и К-11 выделенные из контрольного варианта, обладали высоким уровнем азотфиксации.

Ключевые слова: рапс, ризосферные микроорганизмы, нитрогеназная активность

A. Bunas, Y. Chabanuyk, A. Dmitruk

NITROGEN FIXATION ACTIVITY OF BACTERIAL ISOLATES RHIZOSPHERE OF PLANTS DEPENDING ON ECOTOPES ISOLATION.

A study on the effect of study different quantity fertilizers of nitrogen on the structure and functioning microorganism rhizosphera rape plants. Been identified, that 78% bakteria isolates selected of plants rhizosphera rape, able the use of the food chain, mineral, organic or the absence nitrogen forms, can be fix nitrogen from the atmosphere with different activity. It is established, that bakteria isolates A-29 and K-11 isolated from the control variant, has a high level of nitrogen fixation.

Keywords: rape, nitrogenase activity

Рекомендує до друку

Надійшла 29.04.2014

С.В. Пίδα