

МОНИТОРИНГ И ВЫДЕЛЕНИЕ ДИАЗОТРОФОВ ИЗ БИОЦЕНОЗОВ РАЗНЫХ ПОЧВЕННО- КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН УКРАИНЫ

А.А. Бунас

Институт агроэкології і природокористування НААН

Наведено результати моніторингу і виділення діазотрофів з ґрунтів різних природно-кліматичних зон України. Найбільша чисельність азотфіксувальних бактерій з високою нітрогеназною активністю (0,67–0,94 нмоль C_2H_4 /мл/год) була виділена з кореневої зони дикорослих злакових рослин, що ростуть на сірих лісових ґрунтах південної частини Полісся. Два штами діазотрофів з найвищою нітрогеназною активністю (1,26 нмоль C_2H_4 /мл/год) було виявлено в кореневій зоні рослин, що ростуть на чорноземах Лісостепу та південної частини Степу. Однак серед асоціантів пшениці озимої перспективними для біотехнологічних розробок препаратів для сільського господарства виявилися тільки штами 083 і 472. Вони стріяють накопиченню азоту у фітомасі і активізації розвитку рослин.

Ключові слова: діазотрофи, ґрунт, природно-кліматичні зони України, азотфіксація, коренева зона рослин, пшениця озима.

Современная хозяйственная деятельность человека приводит к загрязнению атмосферы, почвы и водоемов, истощению природных ресурсов, что в свою очередь обуславливает разрушение сложившихся биоценозов. Вот почему общество изменило отношение к экологии и выдвинуло на первый план биологические науки, направленные на рациональное использование природных ресурсов и биобезопасность, в частности сельскохозяйственного производства [1]. Также и сбалансированность развития стран мира определяется уровнем их перехода от традиционной модели экономического роста к «зеленой экономике» — общемировому тренду, поскольку прогресс по его внедрению является основным и единственно верным путем развития в настоящее время [2].

Цикл азота и его этапы (азотфиксация, аммонификация, нитрификация, денитрификация) полностью зависят от деятельности бактерий. Их продукция определяется наличием резервуара доступного азота, который пополняется только в процессе азотфиксации, а уменьшается за счет денитрификации и экспорта продукции, которая выводится из цикла [3].

С другой стороны, многообразие почвенных микроорганизмов позволяет отобрать из высокопроизводительных природных экосистем и агрофитоценозов штаммы диазотрофов с несколькими агрономически ценными признаками, которые не требовательны к условиям существования, имеют высокую скорость роста, за счет чего являются конкурентоспособными при взаимодействии с другими представителями почвенного микробного сообщества [4].

Цель работы — мониторинг диазотрофов в различных почвенно-климатических зонах Украины и скрининг высокоактивных штаммов диазотрофов как потенциальных биоагентов препаратов для применения в экологически безопасных агротехнологиях, что является одним из приоритетных задач современной сельскохозяйственной микробиологии и агроэкологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Образцы ризосферы растений для выделения диазотрофов отбирали из природных целинных фитоценозов различных почвенно-климатических зон, руководствуясь рекомендациями, приведенными

в посевы [5]. Высокоактивные по фиксации молекулярного азота штаммы выделяли в чистую культуру из изолированных с корневой зоны растений консорциумов микроорганизмов, отличающихся высоким уровнем нитрогеназной активности, которую определяли методом ацетиленредукции [6].

Способность новых штаммов ассимилировать молекулярный азот в ассоциации с пшеницей озимой определяли в пробирной культуре. Выращивали инокулированные и не инокулированные (контрольные) растения в 50 мл минеральной среды Виноградского без азота и углеводов. Повторность опыта — 10-кратная. Время инкубации — 20 дней. Анализ суммарного накопления общего азота в среде и фитомассе проводили методом Кьельдаля с помощью прибора Кьельтек по разнице накопления азота микробно-растительными ассоциациями в опытных и контрольных вариантах [7].

Модельные опыты проводили соответственно на нейтральном безазотном субстрате, применяя гидрофильный вспученный вермикулит (фракции 2 мм), питательный безазотный минеральной средой. Выращивали по 2 растения пшеницы озимой в сосуде емкостью 200 мл. Инокуляционная нагрузка — 10^4 бактериальных клеток на одно семя. Повторность — 8-кратная. Суммарное накопление общего азота в субстрате и фитомассе определяли через 30 суток выращивания растений. Эталонном служил препарат ассоциативных diazотрофов Диазофит, применяемый в практике сельского хозяйства для предпосевной обработки семян пшеницы озимой.

Математический анализ полученных результатов проводили с помощью стандартных компьютерных программ «Статистика».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дiazотрофы проявляют четко выраженный ризосферный эффект, образуют тесные взаимосвязи с растением и в значительно большем количестве находятся в корневой зоне растений, чем в почве

без растений [8]. Поэтому консорциумы микроорганизмов, способные к активной ассимиляции молекулярного азота атмосферы в ассоциации с растениями, выделяли из ризопланы и ризосферы растений.

В результате экспедиционных выездов нами было отобрано 140 образцов корней с ризосферной почвой дикорастущих злаковых растений из высокопроизводительных природных экосистем различных почвенно-климатических зон Украины. Корни отбирали из растений с лучшими фенотипическими показателями.

Методом скрининга было получено более 500 консорциумов, которым была присуща способность к накоплению микробной массы на безазотной среде Виноградского. Большинство изолятов оказались олигонитрофилами, то есть К-стратегиями по экологической классификации и, соответственно, отличались медленным накоплением слизистой биомассы с высоким содержанием углерода и низким — азота, что является характерным для этой функциональной группы микроорганизмов [1]. Лишь у 39 изолятов методом ацетиленредукции установили наличие нитрогеназного комплекса с разным уровнем активности ассимиляции молекулярного азота. Из них выделены в чистую культуру 16 штаммов с высокой азотфиксирующей активностью, которая в безазотной питательной среде варьировала в пределах 0,52–1,26 нмоль этилена/мл/час (табл. 1).

Наибольшее количество высокоактивных diazотрофов было обнаружено в корневой зоне дикорастущих не бобовых растений, произрастающих на серой лесной почве в южной части зоны Полесья. Данная ситуация объясняется тем, что азотфиксирующие бактерии не являются конкурентоспособными в среде с достаточным количеством доступного азота. В результате растения на малоплодородных почвах формируют соответствующий микробиоценоз, в котором азотфиксирующие виды бактерий получают приоритетное развитие [9]. Но самые активные diazотрофы — штаммы 005 и 083 с нитрогеназной активностью 1,26 нмоль этилена/мл/час — были вы-

Таблица 1

Диазотрофы с высокой нитрогеназной активностью из разных почвенно-климатических зон Украины

№ штамма	Нитрогеназная активность, нмоль этилена/мл/час
<i>Чернозем обыкновенный (Северная часть зоны Степи)</i>	
5	1,26±0,07
13	0,52±0,07
19	0,61±0,03
40	0,71±0,09
<i>Чернозем типичный (Лесостепь)</i>	
83	1,26±0,00
<i>Дерново-подзолистые почвы (Полесье)</i>	
93	0,71±0,09
102	0,78±0,00
<i>Серая лесная почва (Южная часть зоны Полесья)</i>	
111	0,82±0,07
120	0,74±0,08
180	0,89±0,00
198	0,94±0,09
201	0,71±0,09
307	0,71±0,04
426	0,67±0,01
<i>Чернозем оподзоленный (Лесостепь)</i>	
472	0,82±0,07
484	0,74±0,04

делены из корневой зоны злаковых растений, произрастающих на черноземных почвах зоны Лесостепи и южной части зоны Степи.

Известно, что способность к ассимиляции молекулярного азота еще не свидетельствует о возможности активного функционирования бактерий в корневой зоне растений. Критерием ассоциативности служит суммарный прирост общего азота в фитомассе инокулированных проростков и субстрате [10]. Поэтому свойство выделенных штаммов диазотрофов усваивать молекулярный азот в ассоциации с растениями пшеницы озимой устанавливали в условиях лабораторного стерильного опыта с выращиванием пробирных инокулированных и не инокулированных диазотрофами растений на безазотном субстрате.

В результате только штаммы 083 и 472, используя корневые экссудаты в качестве источника углерода и энергии, проявили способность к ассоциативному взаимодействию с растениями пшеницы озимой. Они за 20 суток роста инокулированных проростков в пробирной культуре на безазотном субстрате способствовали накоплению общего азота больше на 0,23 и 0,11 мг соответственно, по сравнению с контролем без инокуляции (табл. 2).

Диазотрофы — штаммы 005 и 198, которые в чистой культуре на питательной безазотистой среде активно фиксировали молекулярный азот (табл. 1), не выявили данной способности во взаимодействии с растением, и прибавка азота в пробе была незначительной. Также инокуляция растений пшеницы озимой остальными изолятами азотфиксирующих штаммов бактерий не способствовала существенному накоплению азота в биомассе растений по сравнению с контрольным вариантом.

Таблица 2

Влияние инокуляции семян штаммами диазотрофов на содержание общего азота в биомассе растений пшеницы озимой

Обработка семян	Содержание азота в фитомассе, мг	Прибавка азота в фитомассе, мг
Контроль (обработка водой)	0,24±0,002	0
Инокуляция культурой штамма 083	0,47±0,004	0,23
Инокуляция культурой штамма 472	0,35±0,003	0,11
Инокуляция культурой штамма 005	0,29±0,005	0,04
Инокуляция культурой штамма 198	0,28±0,003	0,03

Таблица 3

Накопление азота в фитомассе штаммами diaзотрофов в ассоциации с растениями пшеницы озимой, мг/г

Варианты опыта	Содержание азота в зеленой массе растений, мг/г	Прибавка к контролю, мг/г	Содержание азота в корнях, мг/г	Прибавка к контролю, мг/г	Суммарная прибавка азота в фитомассе, мг/г
Контроль	13,2±0,1	0	5,2±0,1	0	0
Диазофит	15,5±0,5	2,3	5,9±0,2	0,7	3,0
Штамм 083	16,7±0,4	3,5	5,8±0,4	0,6	4,1
Штамм 472	16,3±0,7	3,1	5,5±0,2	0,3	3,4

Это объясняется тем, что на селективных безазотистых средах растут азотфиксирующие микроорганизмы, которые усваивают азот атмосферы, получая углерод и энергию из почвенных ресурсов, но не способны устанавливать тесные ассоциативные связи с растениями. Вторая причина заключается в том, что обогащенная корневыми экссудатами почва ризосферы, благодаря наличию небольшого количества азотных соединений, не всегда является элективной средой для азотфиксаторов. Третья причина состоит в том, что энергетические вещества почвенного происхождения также содержат в своем составе азотные соединения, что способствуют развитию микроорганизмов-олигонитрофилов. Следовательно, далеко не все высокоактивные по нитрогеназе diaзотрофы способны к ассоциативному взаимодействию с растениями [11].

В модельном опыте проверили способность новых штаммов к фиксации азота в ассоциации с растениями пшеницы озимой.

Результаты проведенных исследований показали, что два штамма выделенных diaзотрофов колонизировали корневую систему пшеницы озимой, активно усваивали молекулярный азот и, трансформируя его в доступную форму, передавали растениям, получая от них взамен продукты фотосинтеза в виде корневых выделений.

Доказательством является то, что в биомассе инокулированных растений содержание азота было выше такового в растениях эталонного и контрольного варианта (табл. 3).

ВЫВОДЫ

Diazотрофы не являются конкурентоспособными в среде с достаточным количеством доступного азота, вследствие чего растения формируют соответствующий ризосферный микробиоценоз на малоплодородных почвах, в котором активно функционируют азотфиксаторы. Именно поэтому наибольшее количество штаммов активных diaзотрофов было обнаружено в корневой зоне дикорастущих злаковых растений, произрастающих на серой лесной почве.

Однако два наиболее активных diaзотрофа — штаммы 005 и 083 с нитрогеназной активностью 1,26 нмоля этилена/мл/час — были выделены из корневой зоны злаковых растений на черноземных почвах Лесостепи и южной части Степи.

Штаммы diaзотрофов 083 и 472 являются перспективными в практическом плане, т.к. способны к образованию ассоциативной азотфиксирующей системы с растениями пшеницы озимой, которая способствует активизации развития растений и накоплению азота в фитомассе.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фурдичко О.І. Екологічна безпека агропромислового виробництва: монографія / за науковою

редакцією акад. О.І. Фурдичка, А.Л. Бойка. — К.: ДІА, 2013. — 416 с.

2. Яцук І.П. Екологічні індикатори зеленого зростання сільського господарства: монографія / І.П. Яцук, Л.І. Моклячук. — К.: ДІА, 2018. — 384 с.
3. Tolker-Nielsen T. Spatial organization of microbial biofilm communities / T. Tolker-Nielsen, S. Molin // *Microbiol. Ecol.* — 2000. — Vol. 40. — P. 75–84.
4. Биологическая фиксация азота. — в 4 т. — Т. 4: Ассоциативная азотфиксация / С.Я. Коць, В.В. Моргун, В.Ф. Патика [и др.] — К.: Логос, 2014. — 412 с.
5. Волкогон В.В. Експериментальна ґрунтова мікробіологія / В.В. Волкогон, О.В. Надкєрнична, Л.М. Токмакова; за наук. ред. д-ра с.-г. наук, проф. В.В. Волкогона. — К.: Аграрна наука, 2010. — 463 с.
6. Hardy R.W.F. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation / R.W.F. Hardy, R.C. Burns, R.D. Holsten // *Soil. Biol. Biochem.* — 1973. — Vol. 5, Issue. 1. — P. 41–83.
7. Практикум з мікробіології / С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш, Г.В. Яворська та ін. — Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. — 436 с.
8. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин; отв. ред. Н.Н. Колодилова. — М.: Наука, 2004. — 348 с.
9. Шерстобоева О.В. Функціональна та таксономічна структура мікробного угруповання темно-сірого ґрунту / О.В. Шерстобоева, О.С. Дем'янюк // *С.-г. мікробіологія.* — 2016. — Вип. 24. — С. 43–51.
10. Шерстобоева О.В. Вплив аеробних і анаеробних діазотрофів на вміст азоту в фітомасі та ґрунті кореневої зони рису / О.В. Шерстобоева, М.К. Шерстобоев // *Агроекологічний журнал.* — 2006. — № 3. — С. 28–32.
11. Dart P.J. Non-symbiotic nitrogen fixation and soil fertility / P.J. Dart S.P. Wani // *Simp. Pap.* — 1999. — Vol. 12. — P. 3–17.

REFERENCES

1. Furdychko, O.I., Boiko, A.L. (2013). *Ekologichna bezpeka agropromyslovogo vyrobnytstva: monografiia* [Ecological safety of agro-industrial production: monograph]. Kyiv: DIA [in Ukrainian].
2. Yatsuk, I.P., Mokliachuk, L.I. (2018). *Ekologichni indykatory zelenogo zrostantia silskoho hospodarstva: monografiia* [Environmental indicators of green growth of agriculture: monograph]. Kyiv: DIA [in Ukrainian].
3. Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbiol. Ecol.* 40, 75–84 [in English].
4. Kots, S.Ya., Morhun, V.V., Patyka, V.F., Petrychenko, V.F., Nadkernichnaia, E.V., Kyrychenko, E.V. (2011). *Biologicheskaiia fiksatsiia azota: asotsiativnaia azotfiksatsiia* [Biological nitrogen fixation]. Kiev: Logos [in Russian].
5. Volkohon, V.V., Nadkernychna, O.V., Tokmakova, L.M., Melnychuk, T.M. (2010). *Eksperymentalna ґрунтова мікробіологія* [Experimental soil microbiology]. Kyiv: Аhrарна наука [in Ukrainian].
6. Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Holsten, R.D. (1973). Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.* 5 (1), 41–83 [in English].
7. Gudzy, S.P., Hnatush, S.O., Yavorska, G.V., Bilinska, I.S. (2014). *Praktykum z mikrobiologii*. [Workshop on microbiology: a textbook]. Lviv: LNU im. Ivana Franka [in Ukrainian].
8. Zavarzin, G. A. *Lekcii po prirodovedcheskoj mikrobiologii* [Lectures on natural microbiology]. Moskva: Nauka [in Russian].
9. Sherstoboeva, O.V., Demianiuk, O.S. (2016). Funkcionalna ta taksonomichna struktura mikrobnogo uhrupovannia temno-siroho hruntu [Functional and taxonomic structure of microbial group of dark gray soil]. *Silskohospodarska mikrobiologiia — Agricultural Microbiology.* 24, 43–51 [in Ukrainian].
10. Sherstoboeva, O.V., Sherstoboev, M.K. (2006). Vplyv aerobnykh i anaerobnykh diazotrofov na vmist azotu v fitomasi ta hrunti korenevoi zony rysu [Influence of aerobic and anaerobic diazotrophs on nitrogen content in phytomass and soil of rice zone]. *Ahroekologichnyi zhurnal — Agroecological journal*, 3, 28–32 [in Ukrainian].
11. Dart, P.J., Wani, S.P. (1999). Non-symbiotic nitrogen fixation and soil fertility. *Simp. Pap.* 12, 3–17 [in English].

Отримано 13.11.2018