

**СЕЛЕКЦИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ  
И ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ  
ПОВЫШЕНИЕ УРОЖАЙНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ  
К БОЛЕЗНЯМ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА**

**Мохова С.В., Мельникова Н.В., Суховицкая Л.А.**

ГНУ “Институт микробиологии НАН Беларуси”,  
ул. Акад. В.Ф. Купревича, 2, г. Минск, 220141, Беларусь

*Из ризопланы льна-долгунца выделены ризобактерии, обладающие комплексом хозяйственно-полезных свойств и перспективные для создания микробного препарата, способного повышать урожайность растений.*

*Ключевые слова: diaзотрофные и фосфатмобилизующие микроорганизмы, антимикробное действие, глубинное культивирование.*

Ввиду значительной потребности земледелия в минеральных удобрениях и их высокой стоимости перспективным направлением в решении ряда важнейших экономических и экологических проблем сельского хозяйства является минимизация применения химических средств защиты растений и частичной замены минеральных удобрений на бактериальные препараты. Основу таких препаратов составляют живые культуры микроорганизмов и продукты их метаболизма [1].

В Беларуси одной из важнейших технических культур является лен, занимающий свыше 75,0 тыс. га угодий [2]. Возделывается преимущественно лен-долгунец. Неиспользованным до настоящего времени резервом повышения урожайности является селекция льна на эффективность взаимодействия с комплементарными штаммами diaзотрофных микроорганизмов. Перспективным в этом отношении может быть применение бактериальных препаратов ассоциативных diaзотрофных микроорганизмов, обладающих высокой нитрогеназной активностью и в то же время способных синтезировать вещества фитогормональной природы, оказывать стимулирующее влияние на рост и развитие надземных органов и корневой системы растений, повышать устойчивость их к инфекциям и неблагоприятным экологическим воздействиям [3,4].

Большая роль при выращивании льна-долгунца отводится также фосфорному питанию. Максимальное количество фосфора поглощается растениями в фазу появления всходов. Его отсутствие в этот период вегетации значительно снижает урожай льносоломы и семян. В связи с этим инокуляция растений льна биопрепаратами на основе микроорганизмов, в результате жизнедеятельности которых трансформируется фосфор из труднорастворимых фосфатсодержащих минералов почвы и удобрений, является перспективным агроприемом [5].

Наряду с азотным и фосфорным питанием растений большое значение имеет защита льна от различных заболеваний. Фузариоз, ржавчина, антракноз, пасмо снижают семенную продуктивность растений, урожай и качество соломы и волокна [6]. Повысить эффективность и экологичность защиты льна от болезней, вредителей и сорняков можно также путем применения биопрепаратов, обладающих биоконтролирующей способностью.

Среди множества приемов увеличения результативности инокуляции растений особого внимания заслуживает использование в этих целях естественных и искусственных ассоциаций азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих микроорганизмов. Они могут послужить основой новых комплексных биопрепаратов для бактеризации сельскохозяйственных культур [7].

Целью настоящей работы является выделение и селекция тесно ассоциированных с корневой системой льна-долгунца ризобактерий, обладающих комплексом хозяйственно ценных свойств и способных положительно влиять на рост и развитие надземных органов и корневой системы растений, повышать их устойчивость к инфекциям и неблагоприятным экологическим воздействиям, для получения на основе этих бактерий бинарного препарата.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были изоляты диазотрофных [15] и фосфатмобилизирующих [12] ризобактерий, выделенные нами из ризопланы льна-долгунца сорта Е-68, выращиваемого на опытных полях РУП “Институт льна НАН Беларуси”.

Для выделения ризобактерий корни растений тщательно отмывали дистиллированной водой и гомогенизировали. Гомогенат корней высевали на безазотистую среду Эшби для выделения олигонитрофильных микроорганизмов [8] и среду Муромцева – для выделения фосфатмобилизирующих микроорганизмов [9].

Нитрогеназную активность ризобактерий определяли ацетиленовым методом [10]. Культуры в течение 48 ч инкубировали в полужидкой среде Доберейнер [11] при 28 °С, затем вводили ацетилен и дополнительно 24 ч культивировали пробы при той же температуре. Показания снимали на газовом хроматографе Хром-4 и результат выражали в нмолях С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub> на сосуд за сутки.

Фосфатмобилизирующую способность изолятов устанавливали по зонам растворения ортофосфатов кальция в агаризованной глюкозо-аспарагиновой среде [12].

Изучали антагонистическую активность ризобактерий по отношению к фитопатогенным микромицетам и бактериям (*Fusarium oxysporum* ЛПМ F-1006, *Alternaria alternate* ЛПМ F-1008, *Pseudomonas syringae* БИМ В-239, *Erwinia carotovora* БИМ В-73), полученным из коллекции микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Для оценки суммарного действия клеток и продуктов метаболизма исследуемых микроорганизмов на рост фитопатогенных тест-организмов применяли общепринятые методы [8].

Чувствительность ризобактерий к пестициду витаваксу (витавакс® 200 ФФ) исследовали в глубинной культуре. Жидкую среду мясо-сусло засеивали культурой исследуемого микроорганизма, стандартизированной по оптической плотности, и в нее вносили раствор пестицида в количестве, соответствующем производственной дозе. Глубинное культивирование проводили в колбах Эрлеймейера объемом 100 мл, содержащих 50 мл питательной среды, на лабораторной качалке (скорость вращения – 200±20 об./мин., температура 26±28 °С) в течение двух суток. Затем определяли титр жизнеспособных клеток и показатели физиолого-биохимической активности культуры (нитрогеназную активность, фосфатмобилизирующую способность).

Физиолого-биохимические свойства и идентификацию изолятов проводили в соответствии с руководствами [13,14].

Математическая обработка данных – общепринятая для биологических исследований [15].

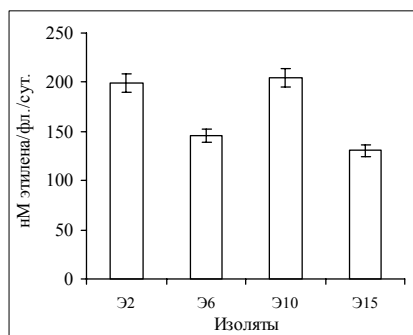
**Результаты и их обсуждение.** Первичный отбор перспективных культур проводили, определяя ростстимулирующую активность метаболитов ризобактерий. Инокуляция семян льна выделенными ризобактериями (15 олигонитрофильных и 12 фосфатмобилизирующих изолятов) способствовала повышению их всхожести

практически во всех вариантах опыта (табл.1). Увеличение средней длины проростков наблюдалось в семи вариантах инокуляции олигонитрофильными микроорганизмами и в шести – фосфатмобилизирующими (табл.1). Максимальной ростстимулирующей активностью обладали фосфатмобилизирующие изоляты  $\Phi_3$ ,  $\Phi_5$ ,  $\Phi_8$ : увеличивалась всхожесть семян в среднем на 99 %, средняя длина проростков – на 52 %.

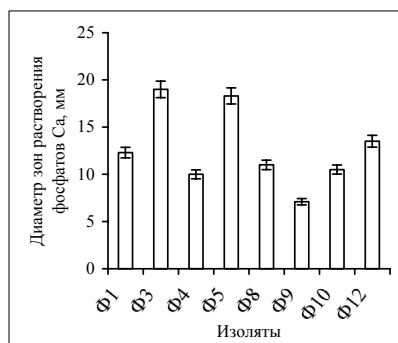
*Таблица 1. Ростактивирующая активность ризобактерий, изолированных из ризопланы льна-долгунца*

| Олигонитрофильные микроорганизмы | Длина проростков, мм | Всхожесть семян, по отношению к контролю, % | Фосфатмобилизирующие микроорганизмы | Длина проростков, мм | Всхожесть семян, по отношению к контролю, % |
|----------------------------------|----------------------|---|-------------------------------------|----------------------|---|
| Контроль                         | 27,4±2,1             | 100   | контроль                            | 27,4±2,1             | 100   |
| Э <sub>2</sub>                   | 31,7±2,9             | 178   | Φ <sub>1</sub>                      | 37,4±2,8             | 173   |
| Э <sub>4</sub>                   | 34,4±1,8             | 221   | Φ <sub>2</sub>                      | 47,2±3,1             | 200   |
| Э <sub>5</sub>                   | 41,8±3,1             | 200   | Φ <sub>3</sub>                      | 59,9±3,2             | 210   |
| Э <sub>6</sub>                   | 27,9±1,9             | 142   | Φ <sub>5</sub>                      | 73,7±3,5             | 173   |
| Э <sub>10</sub>                  | 28,8±2,2             | 163   | Φ <sub>6</sub>                      | 32,0±1,9             | 155   |
| Э <sub>11</sub>                  | 31,3±2,5             | 189   | Φ <sub>8</sub>                      | 73,4±3,9             | 215   |
| Э <sub>12</sub>                  | 30,9±1,9             | 142   | –                                   | –                    | –   |

Селекция диазотрофов по признаку биологической фиксации азота показала: 26 % проверенных ризобактерий, растущих на безазотистой среде Эшби, обладали способностью фиксировать азот атмосферы. Нитрогеназная активность у них колебалась от 130,9 до 204,7 нмоль  $C_2H_4$ /сосуд/сут. (рис. 1). Диаметр зон растворения ортофосфатов кальция исследуемыми микроорганизмами составлял  $7,1 \div 19$  мм (рис. 2).



*Рис. 1. Нитрогеназная активность изолятов бактерий ризопланы льна*



*Рис. 2. Фосфатмобилизирующая активность изолятов бактерий ризопланы льна*

В результате аналитической селекции по совокупности исследуемых свойств из выделенных 27 изолятов для создания комплексного препарата под культуру льна-долгунца отобраны четыре наиболее перспективных: diaзотрофы (Э<sub>2</sub> и Э<sub>10</sub>) и фосфатмобилизирующие гетеротрофы (Ф<sub>3</sub> и Ф<sub>5</sub>).

Установлено, что инокуляция семян льна-долгунца отобранными изолятами положительно влияет на развитие растений в ранние стадии онтогенеза. Основные показатели, которые принимались при этом во внимание, – высота растений и вес корней – превышали показатели контроля в среднем на 14,5 % и 59,9 %, соответственно. Эффективность при использовании бинарных ассоциаций (дiazотроф + фосфатмобилизирующий гетеротроф) была выше.

Учитывая большую практическую значимость и целесообразность совмещения предпосевной бактериализации семян diaзотрофными и фосфатмобилизирующими инокулянтами с протравливанием пестицидами, а также в связи с использованием в технологии возделывания льна биологического метода контроля патогенов, нами проведены исследования антимикробной активности перспективных изолятов по отношению к фитопатогенным микроорганизмам. Была испытана антимикробная активность четырех отобранных изолятов ризобактерий и оценено влияние на нее витавакса.

Установлено, что эти изоляты способны ингибировать рост фитопатогенных грибов и бактерий (табл. 2). Результаты исследо-

ваний показали, что зоны лизиса фитопатогенных грибов (*Fusarium oxysporum* и *Alternaria alternata*) составляют 9,3-19,3 мм, максимальные значения отмечены для изолятов  $\Phi_3$ ,  $\Phi_5$  и  $\Xi_{10}$ . Антагонизм по отношению к фитопатогенным бактериям *Pseudomonas syringae* и *Erwinia carotovora* установлен у всех исследуемых изолятов. Зоны нарастания были достаточно велики и составили 22,3-40,0 мм.

**Таблица 2. Антимикробное действие ризобактерий и влияние витавакса на это свойство**

| Изоляты ризобактерий  | Антимикробное действие ризобактерий на тест-объекты |                                    |                           |                             |
|-----------------------|---|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                       | <i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-259               | <i>Erwinia carotovora</i> БИМ В-73 | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Alternaria alternata</i> |
|                       | диаметр зоны нарастания, мм                         |                                    | диаметр зоны лизиса, мм   |                             |
| $\Phi_3$              | 31,3±1,2  | 27,6±0,7                           | 15,3±0,5                  | 18,0±0,7                    |
| $\Phi_3$ + витавакс   | 28,6±0,9  | 29,0±1,0                           | 13,3±0,3                  | 19,5±0,8                    |
| $\Phi_5$              | 27,3±0,7  | 22,3±0,7                           | 16,0±0,4                  | 16,6±0,4                    |
| $\Phi_5$ + витавакс   | 26,3±0,7  | 24,0±0,5                           | 17,2±0,6                  | 17,5±0,4                    |
| $\Xi_2$               | 31,6±1,4  | 30,0±1,2                           | 9,3±0,2                   | 8,3±0,2                     |
| $\Xi_2$ + витавакс    | 30,6±1,2  | 31,0±1,0                           | 8,6±0,3                   | 9,2±0,3                     |
| $\Xi_{10}$            | 40,0±1,6  | 39,2±1,5                           | 19,3±0,7                  | 17,3±0,6                    |
| $\Xi_{10}$ + витавакс | 41,3±1,4  | 38,0±1,1                           | 18,5±0,5                  | 16,0±0,4                    |

Обнаруженные антимикробные свойства исследованных изолятов открывают принципиальную возможность частичной замены химически синтезированных средств защиты растений, что наряду со снижением доз минеральных азотных и фосфорных удобрений, вносимых под лен, может уменьшить техногенную нагрузку на почву.

Необходимо было выяснить, как влияет витавакс, используемый для протравливания семян льна-долгунца, на антимикробную активность отобранных изолятов. Зоны подавления роста фитопатогенных тест-объектов изолятами ризопланы льна-долгунца, на которые воздействовали протравителем, оставались практически без изменений по сравнению с контролем (без витавакса).

Первичная оценка влияния производственных доз витавакса

на рост четырех изолятов, проведенная при глубинном культивировании, не выявила ингибирующего действия протравителя на их рост (табл. 3). Количество жизнеспособных клеток diaзотрофов ( $\mathcal{E}_2, \mathcal{E}_{10}$ ), культивированных в течение 48 часов в меласно-минеральной среде, при высеве на плотную среду Эшби колебалось от  $2,9$  до  $5,4 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, а в вариантах без протравителя – от  $3,1$  до  $5,3 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

Активность нитрогеназы у азотфиксирующих микроорганизмов ( $\mathcal{E}_2, \mathcal{E}_{10}$ ) составила  $180,5 - 201,6$  нмоль  $C_2H_4$ /сосуд/сутки и на таком же уровне оставалась в вариантах с применением витавакса.

**Таблица 3. Влияние витавакса на выживаемость азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих ризобактерий (глубинное культивирование)**

| Варианты           | Численность микроорганизмов, КОЕ/мл |                           |
|--------------------|-------------------------------------|---------------------------|
|                    | контроль                            | применение витавакса      |
| $\Phi_3$           | $8,5 \pm 0,51 \cdot 10^9$           | $7,9 \pm 0,36 \cdot 10^9$ |
| $\Phi_5$           | $4,8 \pm 0,31 \cdot 10^9$           | $5,0 \pm 0,33 \cdot 10^9$ |
| $\mathcal{E}_2$    | $5,3 \pm 0,35 \cdot 10^9$           | $5,4 \pm 0,29 \cdot 10^9$ |
| $\mathcal{E}_{10}$ | $3,1 \pm 0,13 \cdot 10^9$           | $2,9 \pm 0,40 \cdot 10^9$ |

Аналогичным образом витавакс влиял на развитие и трансформирующую способность отобранных фосфатмобилизирующих изолятов ( $\Phi_3, \Phi_5$ ). Их численность после двух суток культивирования с пестицидом составляла  $5,0 - 7,9 \cdot 10^9$ , в контроле –  $4,8 - 8,5 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, активность растворения ортофосфата кальция также не изменялась ( $11,6 - 14,3$  мм).

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что широко используемый в технологии возделывания льна-долгунца протравитель витавакс в целом не снижает хозяйственно ценных свойств отобранных изолятов, что указывает на возможность совмещения бактеризации семян льна с протравливанием.

Отселектированные изоляты ризобактерий идентифицированы: 3 изолята относятся к роду *Enterobacter*, один – к роду *Pseudomonas*. Проверка, проведенная УО “Витебская государственная академия ветеринарной медицины”, показала, что выделенные изоляты нетоксичны и непатогенны.

Таким образом, в ходе проведенных нами исследований выделены изоляты ризобактерий, тесно ассоциированные с ризопланой

льна-долгунца, проведен отбор по комплексу физиолого-биохимических свойств (нитрогеназная активность, трансформация ортофосфатов кальция, ростстимулирующий эффект и антимикробное действие) наиболее перспективных продуцентов комплексного микробного препарата, обеспечивающего повышение урожайности и устойчивости льна-долгунца к болезням. Результаты работы могут послужить научной базой для разработки технологии получения нового микробного препарата.

1. Суховицкая Л.А. Новые биологические препараты ризобактерин-С и фитостимофос для повышения урожайности растений и снижения доз минеральных удобрений // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Матер. II Московского междунар. конгресса (г. Москва, 10-14 ноября, 2003). – М., 2003. – Ч. 1. – С. 231.

2. Никончик П.И. Возможная эффективность земледелия сельскохозяйственных предприятий республики Беларусь // Стратегия и тактика экономически целесообразной адаптивной интенсификации земледелия: Матер. междунар. науч.-практ. конфер. (г. Минск, 1-2 июля, 2004). – Минск, 2004. – Т. 1. – С. 3-11.

3. Кукреш С.П., Ходянкova С.Ф., Цыганов А.Р., Лабуда С. Энергосберегающие и экономически эффективные агрохимические приемы повышения урожайности и качества льнопродукции // Приемы повышения плодородия почв, эффективности удобрений и средств защиты растений: Матер. междунар. науч.-практ. конфер. (г. Горки, 27-29 мая, 2003). – Горки, 2003. – С. 164-170.

4. Кукреш С.П., Ходянкova С.Ф., Михайловская Н.А. и др. Эффективность применения экологически безопасных бактериальных препаратов под лен-долгунец // Сахаровские чтения 2005 года: экологические проблемы XXI века: Матер. 5-ой междунар. научн. конфер. (г. Гомель, 20-21 мая, 2005). – Гомель, 2005. – Ч. 2. – С. 80-81.

5. Суховицкая Л.А. Микробные биотехнологии в экономически целесообразной адаптивной интенсификации земледелия // Стратегия и тактика экономически целесообразной адаптивной интенсификации земледелия: Матер. междунар. науч.-практ. конфер. (г. Минск, 1-2 июля, 2004). – Минск, 2004. – Т. 1. – С. 42-48.

6. Кудрявцев Н.А. Возможности биоконтроля патогенов, вредителей и сорняков льна // С/х микробиология в XIX-XXI веках:



Тез. докл. Всерос. конфер. (г. С.-Петербург, 14-19 июня, 2001). – С.-Пб, 2001. – С. 95-96.

7. Казарова Т.М., Годова Г.В., Шильникова В.К. Эффективность бактериальных ассоциаций при их интродукции в ризоценозы // С/х микробиология в XIX-XXI веках: Тез. докл. Всерос. конфер. (г. С.-Петербург, 14-19 июня, 2001). – С.-Пб, 2001. – С. 57.

8. Сэги И. Методы почвенной микробиологии. – Минск: “Колас”, 1983. – 296 с.

9. Муромцев Г.С., Павлова В.Ф. Выделение почвенных микроорганизмов, мобилизующих фосфаты железа и алюминия. – Докл. ВАСХНИЛ. – 1975. – № 1. – С. 7-8.

10. Умаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях // Почвоведение. – 1976. – № 11 – С. 119-123.

11. Von Vulow Y.F.W., Dobereiner J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1975. – Vol. 72, № 6. – P. 1123-1126.

12. Основные микробиологические и биохимические исследования почвы / Методические рекомендации. – Л., 1987. – 47 с.

13. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – 536 с.

14. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хюта. – М.: Мир, 1980. – 495 с.

15. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов. – Минск: БГУ, 1973. – 221 с.

**СЕЛЕКЦІЯ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ І  
ФОСФАТМОБІЛІЗУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ,  
ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ПІДВИЩЕННЯ  
УРОЖАЙНОСТІ ТА СТІЙКОСТІ ДО ХВОРОБ  
ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ**

**Мохова С.В., Мельникова Н.В., Суховицька Л.А.**  
ДНУ “Інститут мікробіології НАН Білорусі”, Мінськ

*Із ризоплани льону-довгунця виділені ризобактерії, які мають комплекс господарсько корисних властивостей і перспективні для отримання мікробного препарату, здатного підвищувати урожайність рослин*

Ключові слова: діазотрофні і фосфатмобілізувальні мікроорганізми, антимікробна дія, поживні середовища, глибинне культивування

**SELECTION OF NITROGEN FIXING AND PHOSPHATE-  
MOBILIZING MICROORGANISMS ENSURING BOTH  
PRODUCTIVITY RISE AND DISEASE RESISTANCE OF  
*LINUM USITATISSIMUM ELONGATA L.***

**Mokhova S.V., Melnikova N.V., Sukhovitskaja L.A.**  
Institute of Microbiology, NAS of Belarusi, Minsk

*Rhizobacteria isolated from *Linum usitatissimum elongata L.* rhizoplane possess a complex of valuable properties and they are promising species for elaboration of microbial preparation to raise plant productivity.*

Key words: *diazotroph and phosphate-mobilizing microorganisms, antimicrobial action, submerged cultivation*