

ХЕМОТАКСИС У РИЗОБАКТЕРІЙ ДО ЕКСУДАТІВ ОВОЧЕВИХ РОСЛИН НА АГАРИЗОВАНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Мельничук Т.М.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Карла Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513, Україна
E-mail: cxm@mail.ru

Запропоновано модифікацію методу визначення позитивного хемотаксису у штамів ризобактерій до ексудатів овочевих рослин на агаризованих середовищах, що полягає у заміні штучного введення хемоефекторів на нативні виділення проростків певного виду рослин, які представлені комплексом речовин. Цей метод забезпечує визначення позитивного хемотаксису (початкового етапу формування рослинно-мікробних асоціацій) та дозволяє, в деякій мірі, пояснити підвищену активність штамів при їх застосуванні у мікробних комплексах, є перспективним для попередньої оцінки нововиділених та виробничих штамів щодо їх асоціативної взаємодії з певним видом рослин.

Ключові слова: позитивний хемотаксис, кореневі ексудати, овочеві рослини, асоціативні мікроорганізми, штами ризобактерій.

Початковим етапом рослинно-мікробної взаємодії при колонізації мікроорганізмами ризосфери та ризоплани рослин є позитивний хемотаксис, який зумовлений виділенням значної кількості органічних кислот, вуглеводів та амінокислот з кореневими ексудатами. Саме хемотаксис, тобто направлений рух, а не випадкове переміщення, відіграє головну роль при заселенні бактеріями екологічної ніші – коренів рослин [1].

Відомі з літератури кілька методів визначення хемотаксису, що базуються на реєстрації руху бактерій у напіврідкому агаризованому середовищі, в яке вводяться хемоефектори [2,3]. Метод визначення руху бактерій на агаризованому середовищі у чашках Петрі описаний як для асоціативних мікроорганізмів [2], так і для ризобій [3]. Як хемоефектори використовуються окремі речовини: амінокислоти, цукри та ін. Початок взаємодії мікроорганізмів з рослинами передбачає їхній активний рух у

напрямі кореня, який визначається сумішшю речовин ексудатів рослини. Характер переміщення бактерій в умовах природного середовища є проявом складних варіантів поєднаної інформації, що базується на адитивності часу адаптації за впливу різних атрактантів і репелентів [4].

Нами запропоновано модифікацію методу визначення хемотаксису у ризобактерій на агаризованих середовищах у чашках Петрі за зміною діаметру колоній, що полягає у заміні штучного введення хемоефекторів на нативні виділення проростків певного виду рослин, які містять комплекс речовин (амінокислоти, цукри та ін).

Матеріали й методи. Проводили визначення позитивного хемотаксису виробничих бактеріальних штамів (*Azotobacter vine-landii* 10702, *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, *Paenibacillus polymyxa* П) та референтного штаму *Agrobacterium radiobacter* 10 з колекції агрономічно-корисних мікроорганізмів до ексудатів капусти *Brassica capitata var. alba* Litzg., огірка *Cucumis sativus* L. і томатів *Lycopersicon esculentum* Mill.

Підготовчим етапом проведення аналізу було одержання середовища з ексудатами проростків. При цьому в чашки Петрі у стерильних умовах вносили по 25 мл агаризованого капустияного середовища (№ 19). Половину таких чашок залишали контрольними, а інші у стерильних умовах накривали мембранними фільтрами SYNPOR з розмірами пор 1,5 мкм. Попередньо фільтри стерилізували кип'ятінням (30 хв) при триразовій заміні киплячої води.

Насіння стерилізували 0,1 %-ним розчином сулеми за експозиції 5 хвилин з наступним відмиванням (не менше 25 разів) стерильною дистильованою водою та рівномірно (7×7=49) розкладали у чашки Петрі на мембранному фільтрі (рис. 1).

Чашки Петрі розміщували у поліетиленових пакетах з метою запобігання пересиханню середовища упродовж 14-ти діб розвитку проростків на поверхні мембранного фільтру. Мембранний фільтр у свою чергу запобігає механічному пошкодженню агаризованого середовища проростками та не чинить перешкод для проникнення в нього їхніх ексудатів. Після експозиції мембранні фільтри разом з проростками знімали з поверхні агаризованого середовища, а в центр чашки висівали 0,02 мл бактеріальної суспензії. Паралельно висівали таку ж кількість бактеріальної суспензії на контрольні

22

чашки, які зберігали в однакових умовах з дослідними від початку експерименту.

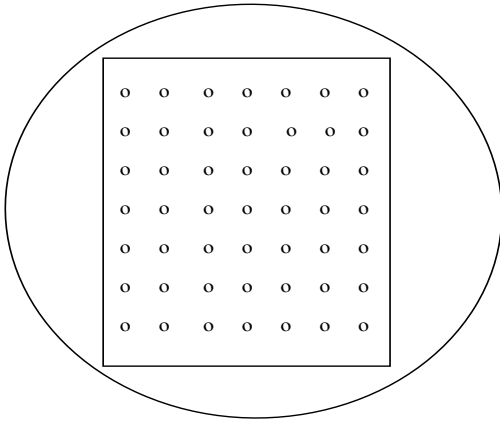


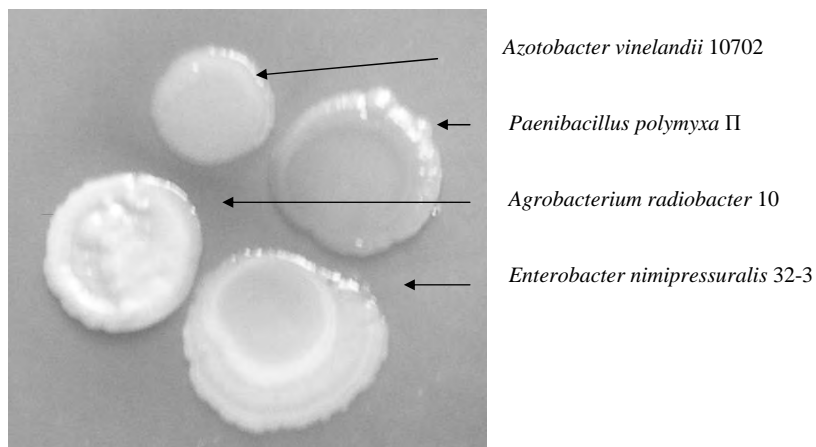
Рис. 1. Схема розміщення насіння (квадрат) на мембранних фільтрах (коло) на агаризованому капустияному середовищі (№ 19) у чашці Петрі.

Бактеріальну суспензію готували з дводобової культури, вирощеної на агаризованому капустияному середовищі в пробірці при температурі 28 °С, шляхом змиву 5 мл дистильованої води. В 1 мл такої суспензії міститься та кількість бактерій, яка відповідає певному штаму бактерії: *A. vinelandii* 10702 – $0,5 \times 10^9$ КУО, *P. polymyxa* П – $0,7 \times 10^9$ КУО, *E. nimipressuralis* 32-3 – $2,2 \times 10^9$ КУО, *A. radiobacter* 10 – $4,0 \times 10^9$ КУО.

Результати та їх обговорення. Направленість інтеграційних процесів у системі рослина-мікроорганізм залежить від складу корневих екзометаболітів [5]. Попередньо було встановлено, що капустияне середовище № 19 сприятливе для розвитку як проростків овочевих рослин, так і виробничих штамів мікроорганізмів. У контролі спостерігали ріст біомаси в зоні нанесення суспензії, типовий для штаму бактерій та середовища: *A. vinelandii* 10702 продукує дифундуючий у середовище коричневатий пігмент, колонії *Paenibacillus polymyxa* П мали світло-коричневий колір, *E. nimipressuralis* 32-3 за найбільшого розміру колоній утворює біомасу білуватого кольору, як і *A. radiobacter* 10 (рис. 2).

Позитивний хемотаксис у референтного штаму *A. radiobacter* 10 виявлено до ексудатів капусти і огірка, а виділення помідорів були для нього репелентами. Реакція досліджуваних виробничих штамів на введення в середовище ексудатів проростків різних

видів овочевих рослин була різною в залежності від виду як штаму, так і рослини, на що вказує інтенсивність росту або навіть його відсутність (табл. 1).



Azotobacter vinelandii 10702

Paenibacillus polymyxa П

Agrobacterium radiobacter 10

Enterobacter nimipressuralis 32-3

Рис. 2. Особливості росту штамів ризобактерій на агаризованому капустияному середовищі № 19 (контроль).

Таблиця 1. Хемотаксис виробничих штамів мікроорганізмів до ексудатів проростків овочевих рослин

Варіанти дослідів	<i>A. vinelandii</i> 10702		<i>P. polymyxa</i> П		<i>E. nimipressuralis</i> 32-3	
	d, мм	%	d, мм	%	d, мм	%
Контроль – середовище №19	11	100	15	100	19	100
Ексудати огірка	16	145	0	0	23	121
Ексудати томатів	8	73	16	107	8	42
Ексудати капусти	16	145	0	0	17	89

Примітка: d – діаметр хемотаксисного кільця, мм

Відмічено вплив ексудатів на ріст штаму *A. vinelandii* 10702, для якого атрактантами є виділення проростків огірка і капусти, тоді як ексудати томатів є репелентами для нього. Позитивний хемотаксис штаму *P. polymyxa* П встановлено до ексудатів томатів, але збільшення діаметра хемотаксисного кільця було незначним – 7 % до контролю, проте під впливом ексудатів капусти і огірка відмічено 100 % пригнічення розвитку цього штаму. Атрактантами

для штаму *E. nimipressuralis* 32-3 були ексудати огірка, а виділення проростків томатів і капусти були репелентами для нього.

Паралельно з визначенням діаметра хемотаксисного кільця, оцінювали візуально інтенсивність росту штамів мікроорганізмів, яку виражали кількістю плюсів (рис. 3).

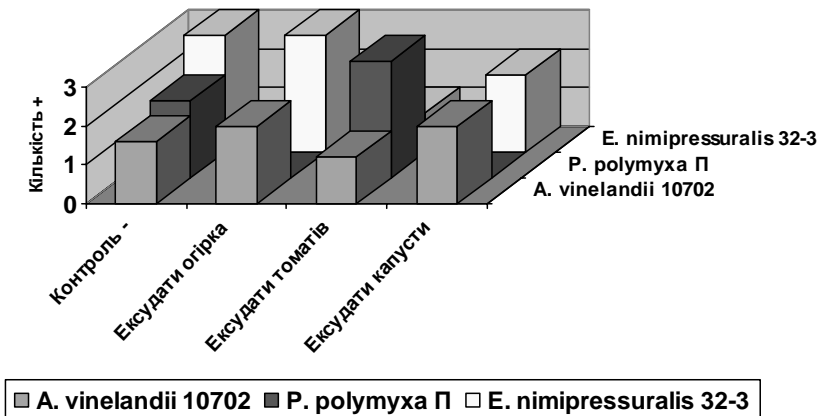


Рис. 3. Інтенсивність росту біомаси виробничих штамів у залежності від ексудатів різних видів рослин (1 – слабкий ріст, 2 – помірний ріст, 3 – сильний ріст)

Рівень інтенсивності росту мікробної маси, як правило, корелював з розміром хемотаксисного кільця. Незначне відхилення від контролю за інтенсивністю росту в сторону збільшення біомаси штаму *A. vinelandii* 10702 забезпечили ексудати огірка і капусти, а під впливом виділень томатів відмічено зменшення показників. Накопичення біомаси *P. polymyxa* П під впливом ексудатів томатів було більш відчутним відносно контролю, ніж зростання діаметру хемотаксисного кільця. Найвищу інтенсивність росту біомаси штаму *E. nimipressuralis* 32-3 забезпечили ексудати огірка.

Отже, одержані результати показали, що позитивний хемотаксис залежить від виду мікроорганізму та складу ексудатів певного виду рослин.

Відомо, що деякі фактори навколишнього середовища можуть чинити вплив на позитивний хемотаксис у мікроорганізмів [6]. Низькі температури в прикореневій зоні сої можуть пригнічувати процес формування бульбочок, проте поєднана інокуляція штамми ризобій *Bradyrhizobium japonicum* і ризобактерій роду

Bacillus здатна індукувати бульбочкоутворення за таких умов [7]. Свідчення щодо підвищення активності бактеріальних штамів при їх поєднанні досить широко представлені як у вітчизняній, так і зарубіжній літературі. Зокрема показано, що здатність штаму *Pseudomonas fluorescens* колонізувати зону коренів сосни поряд з місцем відходження латеральних коренів підвищувалась у присутності штамів *Paenibacillus polymyxa*, тоді як колонізуюча активність самих штамів при цьому залишалась незмінною [8].

Дані нашого дослідження впливу окремих штамів та їх комплексу на ріст і розвиток овочевих рослин (томатів, капусти) також показали переваги останнього. У стресових умовах польових дослідів стабільнішу позитивну дію за роками досліджень (2000-2003 рр), порівняно з окремими біопрепаратами, забезпечував їх комплекс [9, 10].

Вищезазначене зумовило наші подальші дослідження позитивного хемотаксису у штамів *A. vinelandii* 10702, *A. radiobacter* 10, *P. polymyxa* П, *E. nimipressuralis* 32-3 при їх поєднаному вирощуванні на чашках Петрі з агаризованим середовищем № 19 за описаною вище методикою. У контролі спостерігали бактеріальний ріст, характерний для кожного окремого штаму (див. рис. 2). Позитивний хемотаксис у досліджуваних штамів при їх поєднанні спостерігали до ексудатів проростків томатів, тоді як виділення капусти негативно впливали на інтенсивність росту біомаси мікроорганізмів. При поєднаному вирощуванні штамів на середовищах з ексудатами капусти і огірка відмічено ріст навіть у штаму *P. polymyxa* П, при моноштамовому вирощуванні якого спостерігали 100 % інгібування росту. Таке явище може бути свідченням того, що штами в асоціаціях підвищують адаптивний потенціал до умов вирощування та знімають негативну дію певних лімітуючих чинників.

Таким чином, встановлено залежність позитивного хемотаксису від виду мікроорганізму та складу ексудатів певного виду рослин. Атрактантами для виробничого штаму *A. vinelandii* 10702 є виділення огірка і капусти. Позитивний хемотаксис у штаму *P. polymyxa* П встановлено тільки до ексудатів томатів при повному інгібуванні його росту виділеннями огірка та капусти. У штаму *E. nimipressuralis* 32-3 позитивний хемотаксис виявлено до ексудатів огірка, тоді як репелентами були виділення проростків томатів і капусти.

Запропонований метод дозволяє проводити оцінку позитивного хемотаксису, як початкового етапу асоціативної взаємодії, у нововиділених і виробничих штамів у лабораторних умовах, наближених до природних, оскільки враховується дія нативних виділень певного виду рослин.

1. Lugtenberg B. J. Molecular determinations of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* / B. J. Lugtenberg, L. C. Dekkers, G. V. Bloemberg // Ann. Rev. Phytopathol. — 2001. — Vol. 39. — P. 461–490.

2. Жулин И. Б. Хемотаксис у *Azospirillum brasilense* по отношению к аминокислотам / И. Б. Жулин, В. В. Игнатов // Микробиология. — 1986. — Т. 55, № 2. — С. 340–342.

3. Кириченко Е. В. Вивчення хемотаксису бульбочкових бактерій люпину до органічних речовин / Е. В. Кириченко // Мікробіол. журн. — 2005. — Т. 67, № 3. — С. 19–26.

4. Глаголев А. Н. Таксис у бактерий / А. Н. Глаголев // Успехи микробиологии. — 1983. — Вып. 18. — С. 163–192.

5. Кравченко Л. В. Роль корневых экзометаболитов в интеграции микроорганизмов с растениями : автореф. дисс. ... докт. биол. наук / Л. В. Кравченко. — М. : МГУ, 2000. — 45 с.

6. Курдиш И. К. Влияние некоторых факторов внешней среды на хемотаксис *Bradyrhizobium japonicum* / И. К. Курдиш, Т. С. Антонюк, Н. В. Чуйко // Микробиология. — 2001. — Т. 70, № 1. — С. 106–110.

7. Bai Y. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum* / Y. Bai, X. Zhou, D. S. Smith // Crop Sci. — 2003. — Vol. 43. — P. 1774–1781.

8. Bent E. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* Dougl. Engelm.) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions / E. Bent, C. Breuil, S. Enebak, C. P. Chanway // Plant and Soil. — 2002. — Vol. 241, № 2. — P. 187–196.

9. Мельничук Т. М. Эффективность применения биопрепаратов в технологии выращивания капусты / Т. М. Мельничук, Л. Н. Татарин, Т. Ю. Пархоменко, В. Ф. Васецкий // Науч. тр. ученых Крымского гос. аграрн. ун-та. — Симферополь, 2002. — Вып. 72. — С. 75–79.

10. Мельничук Т. М. Застосування бактеріальних препаратів в південному овочівництві / Т. М. Мельничук, Л. Н. Татарин, Т. Ю. Пархоменко // Вісник аграрної науки Причорномор'я. — Миколаїв, 2003. — Т. 2, спец. вип. 3 (23). — С. 302–308.

ХЕМОТАКСИС У РИЗОБАКТЕРИЙ К ЭКССУДАТАМ ОВОЩНЫХ РАСТЕНИЙ НА АГАРИЗОВАННЫХ СРЕДАХ

Мельничук Т.Н.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

Предложено модификацию метода определения положительного хемотаксиса ризобактерий к экссудатам овощных растений на агаризованных средах, которая состоит в замене искусственного введения хемотропных веществ на нативные выделения проростков определенного вида растений, которые представляют комплекс веществ. Этот метод обеспечивает определение положительного хемотаксиса (начального этапа формирования растительно-микробных ассоциаций) и позволяет, в некоторой степени, объяснить повышенную активность штаммов при их применении в микробных комплексах, является перспективным для предварительной оценки нововыведенных и производственных штаммов в отношении их ассоциативного взаимодействия с определенным видом растений.

Ключевые слова: *положительный хемотаксис, корневые экссудаты, овощные растения, ассоциативные микроорганизмы, штаммы ризобактерий.*

THE RHIZOBACTERIA CHEMOTAXIS TO EXUDATION OF VEGETABLE PLANTS ON MEDIUM WITH AGAR

Melnichuk T.N.

The Southern Experimental Station of Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Gvardeyskoye

The modified method of positive chemotaxis determination at the culture of rhizobacteria to vegetable plant exudates on the medium with agar was proposed. It is a substitution of artificial introduction of chemoeffectors with native exudates of seedlings of the definite plants which are a complex of compounds. This method provides determination of positive chemotaxis (the initial stage of plants-microbes associations forming), allows to explain the promoted activity of strains at their application in microbic complexes and it is considered to be perspective for initial evaluation of new and industrial strains.

Key words: *positive chemotaxis, root exudates, vegetable plants, associative microorganisms, rhizobacterium strains.*