

ЗДАТНІСТЬ ШТАМУ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3 ПРИЖИВАТИСЯ У РИЗОСФЕРІ ЯРИХ ЗЕРНОВИХ

Баранська М.І.

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

*Показано, що штам фосфатмобілізівної бактерії *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 здатний приживатись у ризосфері ярого ячменю та тритикале. З'ясовано, що точність отриманих даних залежить від вибору антибіотика.*

Ключові слова: *штам *Enterobacter nimipressuralis*, ризосфера, ячмінь, тритикале.*

Відомо, що біопрепарати на основі корисних штамів мікроорганізмів не забруднюють навколишнє середовище, є безпечними для здоров'я людини і тварин, підвищують урожайність рослин та покращують якість сільськогосподарської продукції. Але ефективність їх застосування значною мірою залежить від здатності біоагентів препаратів приживатися в кореневій зоні рослин.

Слід зазначити, що вірогідність отриманих результатів щодо приживаності корисних мікроорганізмів у ризосфері рослин залежить від вибору методики визначення. Зокрема, за використання методу генетичного маркування популяцій [1] на точність даних суттєво впливає вибір антибіотика, оскільки у природному середовищі існують мікроорганізми, стійкі до антибіотичних речов. У зв'язку з цим метою наших досліджень було з'ясування ступеня приживаності в кореневих сферах ярих зернових фосфатмобілізівної бактерії *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, адаптованої до різних антибіотиків.

Матеріали й методи. Дослідження проводили в умовах вегетаційних дослідів з ярим ячменем сорту Сталкер та тритикале сорту Аіст. Тривалість досліду 70 діб. Приживаність штаму *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 визначали за допомогою його стрептоміцин-, ампіцилін- та канаміцинрезистентних мутантів. На початкових етапах досліджень нами отримано мутанти цього штаму,

стійкі до стрептоміцину в концентрації 1000 од./мл, а канаміцину та ампіциліну – 100 од./мл середовища за методикою Зібальського [2]. Систематичний пересів культур на середовища з відповідними антибіотиками засвідчив про закріплення набутої ознаки в геномі, і про можливість використання мутантів у дослідах.

Насіння обробляли суспензією добової культури мікроорганізмів (10,2-14,4 млн КУО/мл) у кількості 2 % від маси насіння, висівали в посудини, заповнені темно-каштановим ґрунтом або вермикулітом. Повторність досліду 5-разова. Протягом вегетації через кожні 14 діб здійснювали підживлення рослин повним розчином Прянішнікова.

Визначення чисельності клітин *E. nimipressuralis* 32-3 проводили методом висіву розведень на поживне середовище (м'ясо-пептонний агар) з додаванням відповідно: стрептоміцину – 1000 од./мл, ампіциліну та канаміцину – 100 од./мл, повторність 5-разова. Контролем слугував варіант, у якому не проводили передпосівної бактеризації насіння: в ризосфері рослин обраховували кількість аборигенних бактерій, що стійкі до антибіотиків.

Результати та їх обговорення. При застосуванні стрептоміцинрезистентного мутанту штаму *E. nimipressuralis* 32-3 кількість КУО через 14 діб вегетації ячменю становила 2,99 млн/г сухого ґрунту, але вже через 28 діб вона знизилась і знаходилась на рівні чисельності аборигенних мікроорганізмів, стійких до стрептоміцину (табл. 1).

Використання канаміцинрезистентного мутанту дозволило виявити 2,55 млн КУО/г сухого ґрунту у перший строк відбору зразків. Через 28 діб чисельність бактерії знизилась до 1,37 млн/г сухого ґрунту. При подальших відборах відмічено повільніше зниження чисельності клітин канаміцинрезистентного мутанту: так, через 42 доби нараховано 0,71, через 56 діб – 0,75, а в кінці вегетації (через 70 діб) – 0,57 млн КУО/г сухого ґрунту. Кількість фонових мікроорганізмів, стійких до канаміцину, була практично на одному рівні впродовж вегетації рослин і становила 0,14-0,21 млн КУО/г сухого ґрунту.

Чисельність клітин ампіцилінрезистентного мутанту *E. nimipressuralis* 32-3 у темно-каштановому ґрунті ризосфери ячменю через 14 діб вегетації рослин становила 2,58 млн КУО/г сухого ґрунту, через 28 діб знизилась удвічі і дорівнювала 1,1 млн КУО/г, протягом наступних трьох відборів (через 42,

56 та 70 діб) майже не змінювалась і була на рівні 0,9; 1,04 та 0,83 млн КУО/г сухого ґрунту, відповідно (табл. 1). В той же час у контролі кількість бактерій, стійких до ампіциліну була значно меншою і коливалась у межах 0,21-0,28 млн КУО/г сухого ґрунту.

Таблиця 1. Динаміка чисельності клітин антибіотико-резистентних мутантів *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосферному ґрунті ярого ячменю, млн КУО/г сухого ґрунту

Варіанти досліджу	Тривалість досліджу, доба				
	14	28	42	56	70
Контроль (бактерії, що стійкі до стрептоміцину)	0,65±0,17	0,92±0,09	0,90±0,14	0,63±0,14	0,58±0,11
Стрептоміцин-резистентний мутант	2,99±0,24	0,82±0,12	0,54±0,11	0,93±0,18	0,78±0,13
Контроль (бактерії, що стійкі до канаміцину)	0,21±0,11	0,16±0,05	0,16±0,07	0,14±0,06	0,16±0,07
Канаміцин-резистентний мутант	2,55±0,29	1,37±0,21	0,71±0,16	0,75±0,20	0,57±0,13
Контроль (бактерії, що стійкі до ампіциліну)	0,21±0,10	0,28±0,05	0,23±0,03	0,25±0,10	0,28±0,08
Ампіцилін-резистентний мутант	2,58±0,28	1,10±0,17	0,90±0,10	1,04±0,07	0,83±0,11

Чисельність клітин *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосфері рослин ячменю, вирощуваного на вермикулітному субстраті, була дещо вищою, ніж за тих же умов у темно-каштановому ґрунті. Максимальну кількість КУО штаму відмічено на початкових періодах вегетації (через 14 та 28 діб після висіву): 8,82 та 5,48; 3,92 та 3,07; 4,22 та 3,67 млн/г сухого субстрату за використання стрептоміцин-резистентного, ампіцилінрезистентного та канаміцинрезистентного мутантів відповідно (табл. 2).

Таблиця 2. Динаміка чисельності клітин антибіотикорезистентних мутантів E. nimipressuralis 32-3 у ризосфері рослин ярого ячменю, вирощуваного на вермікуліті, млн КУО/г сухого вермікуліту

Варіанти досліджу	Тривалість досліджу, доба				
	14	28	42	56	70
Контроль (бактерії, що стійкі до стрептоміцину)	0,11±0,08	0,16±0,07	0,27±0,10	0,22±0,08	0,32±0,32
Стрептоміцин-резистентний мутант	8,82±0,18	5,48±0,30	2,27±0,19	2,30±0,12	1,89±0,11
Контроль (бактерії, що стійкі до канаміцину)	0,08±0,04	0,19±0,02	0,22±0,09	0,19±0,08	0,19±0,10
Канаміцин-резистентний мутант	4,22±0,38	3,67±0,27	2,00±0,12	1,97±0,13	1,67±0,16
Контроль (бактерії, що стійкі до ампіциліну)	0,30±0,03	0,31±0,15	0,25±0,06	0,22±0,04	0,19±0,02
Ампіцилін-резистентний мутант	3,92±0,37	3,07±0,08	2,35±0,23	2,55±0,17	1,94±0,13

При подальшому спостереженні виявлено зниження кількості КУО *E. nimipressuralis* 32-3. Так, через 42 доби нараховано 2,27, 2,35 та 2,0 млн КУО/г сухого субстрату стрептоміцинрезистентного, ампіцилінрезистентного та канаміцинрезистентного мутанту; через 56 діб – 2,3, 2,55 та 1,97 млн КУО/г сухого субстрату і в кінці вегетації (через 70 діб) – 1,89, 1,94 та 1,67 млн КУО/г сухого субстрату, відповідно.

Кількість аборигенних мікроорганізмів, стійких до антибіотиків, у вермікулітному субстраті була незначною. Так, чисельність мікроорганізмів, резистентних до стрептоміцину, впродовж вегетації рослин ячменю ярого повільно зростала від 0,11 до 0,32 млн КУО/г сухого субстрату, а кількість мікроорганізмів, стійких до канаміцину – від 0,08 до 0,19 млн КУО/г сухого субстрату (табл. 2). Чисельність мікроорганізмів, стійких до ампіциліну,

була дещо більшою і коливалась у межах 0,19-0,30 млн КУО/г сухого субстрату.

Подібні результати одержано при дослідженні приживаності штаму *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосфері рослин ярого тритикале сорту Аіст. Так, виявлено, що чисельність клітин *E. nimipressuralis* 32-3 у темно-каштановому ґрунті ризосфери рослин за використання ампіцилін- та канаміцинрезистентних мутантів поступово знижувалась упродовж вегетації: від 2,28 до 0,97 та від 2,00 до 1,27 млн КУО/г сухого ґрунту, відповідно (табл. 3). У той же час, у контрольних варіантах вона була значно меншою: кількість ґрунтових ампіцилінрезистентних бактерій була майже на одному рівні впродовж вегетації і становила 0,18-0,24 млн КУО/г сухого ґрунту.

Таблиця 3. Динаміка чисельності клітин антибіотико-резистентних мутантів *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосферному ґрунті рослин ярого тритикале, млн. КУО/г сухого ґрунту

Варіанти досліджу	Тривалість досліджу, доба				
	14	28	42	56	70
Контроль (бактерії, що стійкі до стрептоміцину)	0,87±0,18	0,64±0,13	0,25±0,05	0,44±0,09	0,55±0,12
Стрептоміцин-резистентний мутант	2,53±0,21	0,67±0,20	0,55±0,16	0,53±0,12	0,58±0,10
Контроль (бактерії, що стійкі до канаміцину)	0,14±0,04	0,23±0,10	0,21±0,09	0,18±0,09	0,23±0,06
Канаміцин-резистентний мутант	2,00±0,17	1,79±0,24	1,43±0,18	1,52±0,09	1,27±0,08
Контроль (бактерії, що стійкі до ампіциліну)	0,18±0,07	0,20±0,06	0,20±0,06	0,20±0,04	0,24±0,06
Ампіцилін-резистентний мутант	2,28±0,23	1,82±0,14	1,27±0,03	1,24±0,11	0,97±0,05

При застосуванні стрептоміцинрезистентного мутанту відмічено зниження кількості його КУО після 14 доби вегетації рослин: з 2,53 до 0,67-0,53 млн/г сухого ґрунту. Надалі чисельність бактерій знаходилась на рівні кількості аборигенних ґрунтових мікроорганізмів, стійких до стрептоміцину.

Виявлено, що кількість клітин *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосфері тритикале, вирощуваного на вермікуліті, була максимальною на початкових періодах вегетації (через 14 діб після висіву): 7,34, 3,95 та 3,84 млн КУО/г сухого субстрату при використанні стрептоміцин-, ампіцилін- та канаміцинрезистентних мутантів, відповідно (табл. 4).

Таблиця 4. Динаміка чисельності клітин антибіотико-резистентних мутантів *E. nimipressuralis* 32-3 у ризосфері рослин ярого тритикале, вирощуваного на вермікуліті, млн. КУО/г сухого вермікуліту

Варіанти дослідів	Тривалість дослідів, доба				
	14	28	42	56	70
Контроль (бактерії, що стійкі до стрептоміцину)	0,25±0,09	0,23±0,04	0,31±0,15	0,17±0,06	0,23±0,08
Стрептоміцин-резистентний мутант	7,34±0,33	4,36±0,24	3,22±0,27	3,25±0,24	2,06±0,14
Контроль (бактерії, що стійкі до канаміцину)	0,08±0,04	0,28±0,03	0,22±0,10	0,14±0,06	0,14±0,05
Канаміцин-резистентний мутант	3,84±0,22	2,43±0,23	1,44±0,06	1,35±0,09	1,07±0,08
Контроль (бактерії, що стійкі до ампіциліну)	0,18±0,07	0,20±0,06	0,20±0,06	0,20±0,04	0,24±0,06
Ампіцилін-резистентний мутант	3,95±0,24	2,59±0,17	2,12±0,21	2,48±0,08	1,72±0,10

У подальшому прослідковувалось поступове зниження чисельності клітин *E. nimipressuralis* 32-3. Так, через 28 діб

кількість КУО становила 4,36, 2,59 та 2,43 млн/г сухого субстрату за використання стрептоміцин-, ампіцилін- та канаміцинрезистентних мутантів відповідно: через 42 доби нараховано 3,22, 2,12 та 1,44 млн КУО/г сухого субстрату і в кінці вегетації (через 70 діб) – 2,06, 1,72 та 1,07 млн КУО, відповідно.

Кількість аборигенних бактерій, стійких до антибіотиків, не перевищувала чисельність клітин антибіотикорезистентних мутантів штаму *E. nimipressuralis* 32-3 у дослідних варіантах. Так, кількість бактерій, резистентних до стрептоміцину коливалась у межах 0,17-0,31 млн КУО/г сухого субстрату; резистентних до канаміцину – 0,08-0,28 млн КУО/г сухого субстрату, а резистентних до ампіциліну – 0,18-0,24 млн КУО/г сухого субстрату.

Отже, аналіз одержаних результатів свідчить про те, що штам *E. nimipressuralis* 32-3 здатний приживатись у ризосфері рослин ярого ячменю сорту Сталкер та у ризосфері ярого тритикале сорту Аіст. Чисельність КУО його антибіотикорезистентних мутантів сягає високого рівня на початку і знижується впродовж вегетації рослин, що є закономірним з точки зору розвитку молоді екосистеми [3]. Проте, як свідчать результати проведених досліджень, для отримання достовірних даних, при визначенні приживаності мікроорганізмів у ризосфері рослин методом генетичного маркування, доцільно використовувати декілька антибіотиків, оскільки в природному середовищі існує достатня кількість мікроорганізмів, резистентних до певних антибіотиків. Так, якщо орієнтуватись лише на використання стрептоміцинрезистентного мутанта, можна дійти висновку про нетривалу взаємодію інтродукованої бактерії з рослиною. Застосування ж у дослідах мутантів, стійких до інших антибіотиків, дозволяє прослідкувати особливості колонізації ризосфери рослин у динаміці.

1. Obaton M. Utilization de mutants spontanes resistans aux antibiotiques pour k'etude ecoloque des *Rhizobium* / M. Obaton // C. r. held Seans. Acad. Sci. — Paris, 1971. — P. 2630–2633.

2. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; пер. с англ. : в 3 т. — М.: Мир, 1983. — Т. 2. — 1984. — С. 29–31.

3. Біологічний азот / [В. П. Патики, С. Я. Коць, В. В. Волкогон та ін.] ; за ред. В. П. Патики. — К. : Світ, 2003. — 424 с.

СПОСОБНОСТЬ ШТАММА *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3 ПРИЖИВАТЬСЯ В РИЗОСФЕРЕ ЯРОВЫХ ЗЕРНОВЫХ

Баранская М.И.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

*Установлено, что фосфатмобилизирующий штамм *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 способен приживаться в ризосфере яровых ячменя и тритикале. Установлено, что точность полученных данных зависит от выбора антибиотика.*

Ключевые слова: *штамм *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, ризосфера, яровые зерновые.*

ABILITY OF *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3 TO SURVIVE IN THE RHIZOSPHERE OF SPRING GRAIN

Baranska M.I.

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

*The ability of the phosphate-mobilizing strain *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 to survive in the rhizosphere of the spring barley and triticale has been studied. It has been established that precision of the received results depends on the choice of antibiotic.*

Key words: *strain *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, rhizosphere, spring grains.*