

КОЛЕКЦІЯ КОРИСНИХ ҐРУНТОВИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ІСМАВ НААН: ПОШУКОВІ ТА ПРИКЛАДНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сільськогосподарське виробництво в значній мірі залежить від біорізноманіття ґрунтів, без якого неможливе забезпечення оптимального росту рослин і тварин та задоволення їх основних фізіологічних потреб. Мікроорганізми відіграють беззаперечно важливу роль у процесах розкладання і синтезу органічної речовини. Азотфіксувальні та фосфатмобілізівні бактерії мають особливе значення у забезпеченні рослин доступними елементами живлення та речовинами фітогормональної природи. Мікроорганізми, які проявляють антагоністичні властивості щодо мікроорганізмів – збудників хвороб сільськогосподарських культур та ентомопатогенні бактерії є одними з важливих компонентів програм комплексної боротьби з фітопатогенами та сільськогосподарськими шкідниками. Набувають великого значення мікроорганізми і в харчовій промисловості, а також їх починають активно застосовувати в секторах лісівництва та рибальства.

Важливим етапом розвитку мікробіології є формування спеціалізованих колекцій, орієнтованих на інтереси біотехнології, на використання колекційних штамів мікроорганізмів для вирішення конкретних завдань у сільському господарстві.

Колекція корисних ґрунтових мікроорганізмів ІСМАВ НААН почала формуватися з 1969 р., а у 1998 р. в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН в лабораторії ґрунтової мікробіології за ініціативи академіка НААН В.П. Патики організовано сектор типових культур непатогенних мікроорганізмів, метою роботи якого було



ВОРОБЕЙ
Юлія Олександрівна
*Завідувач колекції,
кандидат
біологічних наук,
старший науковий
співробітник*

створення колекції культур ґрунтових мікроорганізмів, які мають наукову та практичну цінність. У 2002 р. постановою Кабінету Міністрів України колекція внесена до реєстру наукових об'єктів, що становлять національне надбання України під назвою «Колекція корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук». З 2012 р. Колекція входить до складу лабораторії фізіології мікроорганізмів як окремий науковий сектор.

Колекція об'єднує спеціалізовані зібрання штамів мікроорганізмів, які були сформовані в лабораторіях протягом 60 років існування Інституту. Вона є результатом багаторічних досліджень ролі мікроорганізмів у процесах формування родючості ґрунту, живлення рослин, регулювання фітосанітарного стану довкілля. У фондах колекції зберігається 580 культур мікроорганізмів (бактерій та грибів) [2]. Велику цінність для колекції мають типові штами, що використовуються в систематиці як еталони відповідних видів мікроорганізмів. Колекція слугує базою для збереження різноманіття корисних ґрунтових мікроорганізмів, що є важливою складовою біологічних ресурсів України.

Основним завданням колекції є довготривале гарантоване зберігання стабільних за основними характеристиками культур мікроорганізмів та поповнення її фондів новими штамми бактерій і грибів. Особлива увага приділяється збереженню властивостей мікроорганізмів, які мають наукову та виробничу цінність.

З інтенсивним розвитком в Україні органічного землеробства надзвичайної актуальності

набувають дослідження азотфіксації в кореневій зоні небобових культур та мікроорганізмів, які здійснюють даний процес. Визначення різнобічних асоціативних взаємовідносини діазотрофів з рослинами розкриває механізми позитивної дії мікроорганізмів на сільськогосподарські культури, дозволяє прогнозувати ефективність взаємодії мікро- і макроорганізму [3]. На основі ефективних штамів діазотрофів розробляються біопрепарати, що широко застосовуються у сільськогосподарському виробництві для інокуляції насіння з метою підвищення продуктивності рослин та якості врожаю.

Серед азотфіксуючих бактерій, які сприяють підвищенню продуктивності сільськогосподарських культур, бактерії роду *Azospirillum* є одними з найперспективніших мікроорганізмів завдяки їх здатності до асоціативної взаємодії з рослинами, фіксування молекулярного азоту та синтезу фітогормонів і вітамінів. Різноманітність азоспірил за просторовою локалізацією в кореневій зоні рослин (в ризосфері, ризоплані та гітосфері) також обумовлює значну зацікавленість вчених різних країн світу дослідженням механізмів взаємодії даних бактерій з рослинами. У зв'язку з цим в колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів особливу увагу приділено аналітичній селекції представників роду *Azospirillum* та вивченню їх властивостей. Так, протягом останніх п'яти років виділено понад 100 штамів азоспірил з кореневої зони рослин пшениці ярої та озимої, лаванди та суниці.

З кореневої зони рослин пшениці ярої 14 сортів виділено 29 чистих культур азотфіксуючих бактерій роду *Azospirillum*. Високою нітрогеназною активністю в чистій культурі (112 нмоль етилену/посудину за 24 години) характеризується *Azospirillum* sp. 137, виділений з відмитих коренів пшениці сорту Етюд, в ризоплані якого було зафіксовано високу нітрогеназну активність. За використання мікробіологічних методів, а також за допомогою ПЛР-ампліфікації фрагментів генів *nifD*, а також *dnifA* (олігонуклеотидні послідовності даного праймера винайдені нами

вперше з метою видової ідентифікації колекційних штамів мікроорганізмів), аналізу продуктів ПЛР в агарозному гелі підтверджено належність штаму *Azospirillum* sp. 137 до виду *Azospirillum brasilense* [13] (рис. 1).

Співробітниками колекції показано, що бактеризація насіння пшениці ярої сорту Провінціалка суспензіями штамів *Azospirillum* sp. 137 і *A. brasilense* 77 сприяє підвищенню швидкості проростання насіння на 32-33%. В результаті інокуляції насіння кількість деформацій корневих волосків проростків збільшується в 4 рази порівняно з контролем, що свідчить про утворення асоціації даного штаму з рослинами пшениці ярої [10].

Показано здатність бактерій *Azospirillum* sp. 137 розвиватися в кореневій зоні рослин пшениці ярої. При цьому нітрогеназна активність у 2,8 – 7,5 рази перевищує даний показник у контролі.

Структурний аналіз пшениці ярої у варіантах з бактеризацією показав, що *A. brasilense* 137 забезпечує приріст показників довжини колосу, маси зерен з колосу та маси 1000 зерен. Встановлено, що за використання для бактеризації насіння пшениці ярої *A. brasilense* 137 підвищується урожайність даної культури на 18,5% по відношенню до контролю, та на 5,6% - до позитивного контролю.

У результаті пошуку нових штамів діазотрофів виділено також 12 чистих культур *Azospirillum* sp.



Рис. 1. Колонії бактерій *Azospirillum brasilense*

з ризосфери суниці садової. Досліджено морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості нових ізолятів.

Паралельно з активною селекцією нових штамів асоціативних азотфіксувальних бактерій та вивченням їх властивостей співробітниками проводиться робота з удосконалення методів зберігання культур мікроорганізмів. Здійснюється аналіз впливу різних способів підтримання життєздатності штамів та збереженість їх агрономічно цінних властивостей. Особливе значення дана робота має для типових і референтних штамів, що характеризуються складними живильними потребами та пересіваються на агаризовані середовища кожні 10 діб: *A. brasilense* Sp.7, *A. brasilense* Sp.245, *A. halopraeferans* AU 4, *A. irakense* KBC 1, *A. lipoferum* 59b, *Herbaspirillum seropedicae* Z78. Показано, що субкультивування всіх референтних штамів *Azospirillum* та *Herbaspirillum* на агаризованому середовищі з інтервалом 10 діб та на напіврідкому середовищі Доберейнер з інтервалом 3 місяці забезпечує високий рівень виживання (4 бали). За зберігання під шаром мінерального масла протягом 8 років залишаються життєздатними штами *Herbaspirillum seropedicae* Z78, *A. irakense* KBC1, *A. brasilense* Sp.7, *A. brasilense* Sp.245. Зазначені культури, що періодично пересіваються на агаризовані та напіврідкі середовища, а також тривалий час (8 років) зберігаються під



Рис. 2. Колонії ризобій пугу на бобовому агарі

шаром мінерального масла, зберегли без змін активність ферментів вуглеводного обміну. Серед сполук азоту найкращий ріст азоспірил забезпечували мочевина, амонійна та нітратна форми азоту. Штами, що зберігалися 3 місяці на середовищі Доберейнер, та протягом 8 років під шаром масла продукували більшу кількість полісахаридів, ніж їх варіанти, що пересівалися кожні 10 діб, забезпечуючи краще виживання культур у стресових умовах. За чутливістю до антибіотиків суттєвих відмінностей між культурами, що зберігаються різними методами, не виявлено.

Культури *A. halopraeferans* AU 4 і *A. lipoferum* 59 b характеризуються високим рівнем виживання (4 бали) лише за зберігання під маслом протягом року. Через 1,5 – 2 роки зазначені штами повністю втрачають життєздатність (0 балів).

Дослідження збереженості агрономічно цінних властивостей виробничого штаму *A. brasilense* 18-2 в умовах польового досліду з гречкою показало, що тривале зберігання штаму методами періодичного пересіву та під мінеральним маслом істотно не впливає на його азотфіксувальну здатність. Найвищий приріст урожаю зерна гречки (11,1 %) забезпечив штам, який підтримувався методом періодичних пересівів.

Встановлено, що за зберігання під шаром масла оптимальний інтервал між пересівами для більшості діазотрофів родів *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Variovorax*, *Azotobacter*, *Azospirillum* складає 4-5 років.

Після 8-річного зберігання під маслом у бактерій *Azotobacter chroococcum* рівень виживання не перевищує 1 бала, а у більшості представників *Azotobacter vinelandii* залишається високим – 3-4 бала.

Визначено також показники синтезу метаболітів рістстимулювальної дії представників роду *Azotobacter*. Так, здатність до продукування цитокініноподібних речовин *A. chroococcum* M-70 та ауксиноподібних речовин *A. vinelandii* MX дещо знижувались при зберіганні. Виявлено, що тривале зберігання під шаром масла впливає на стабільність культури *Chetomium cochliodes* 3250. Це

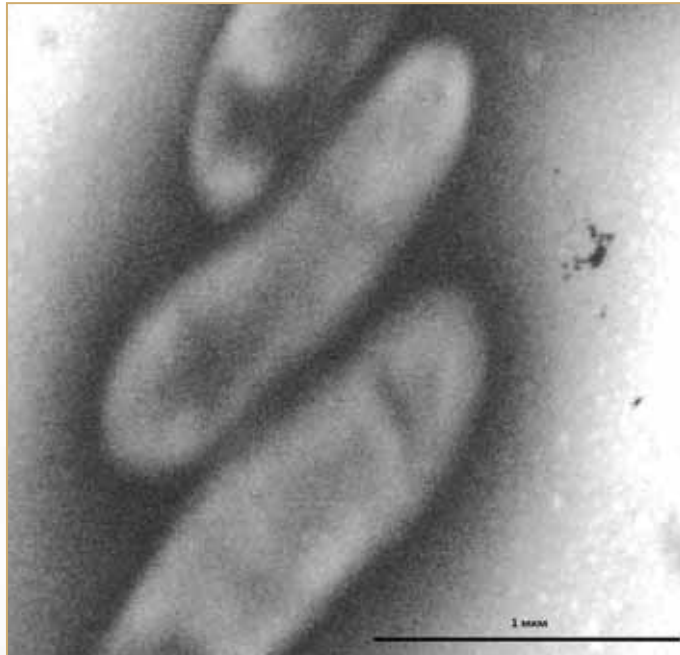


Рис. 3. Морфологія клітин ризобій нуту (збільшення 1x16000)

проявляється в уповільненні лінійної швидкості росту гриба до 0,34 мм/год, зміні морфології колоній та активності спороношення.

Отже, підбір оптимальних способів зберігання, що забезпечують високу життєздатність мікроорганізмів та збереженість їх агрономічно цінних властивостей, залежить від штамових особливостей культур, що належать до різних систематичних груп.

Серед корисних ґрунтових мікроорганізмів особливе значення мають бульбочкові бактерії, що у симбіозі з бобовими культурами фіксують молекулярний азот атмосфери і перетворюють його в сполуки, які легко засвоюються рослинними організмами, а також продукують фізіологічно активні речовини, що забезпечує підвищення урожаю та покращення якості сільськогосподарської продукції.

Відомо, що кількісний та якісний склад популяцій ризобій, сформованих у ґрунті під час вирощування бобових культур часто не відповідає вимогам сільськогосподарського виробництва. Аборигенні бульбочкові бактерії можуть поступатися за своєю активністю та ефективністю штамам, які відібрані за цими ознаками. Тому



Рис. 4. Бульбочки на коренях рослин нуту за інокуляції *M. ciceri* ND-64

аналітична селекція бульбочкових бактерій та включення до технологій вирощування бобових культур такого прийому як інокуляції насіння високоефективними та конкурентоспроможними штамами ризобій є необхідним агрозаходом для отримання стабільної урожайності.

Співробітниками колекції встановлено, що в дерново-підзолистих ґрунтах, де впродовж 30 років не вирощувались еспарцет, лядвенець, маш, та серадела поширені бульбочкові бактерії, здатні до активного симбіозу з цими культурами. У фазі інтенсивного росту – бутонізації, залежно від виду рослин, на коренях формувалось від 14,0 до 38,0 бульбочок/рослину з рівнем азотфіксації від 12,4 до 44,14 мкгN/рослину за годину. Виділено нові штами ризобій еспарцету, лядвенцю, машу та серадели, вивчено їх основні морфолого-культуральні властивості.

Вивчено властивості штаму *Rhizobium galegae* K-3, який формує ефективний симбіоз з козлятником східним і сприяє підвищенню його продуктивності на 14% у порівнянні з виробничим штамом [1]. За розробленої схеми імунізації кролів отримано три високоактивні специфічні антисироватки до штамів бульбочкових бактерій

люпину *Rhizobium lupini* 367a, *R. lupini* 30л та десмодіуму *Bradyrhizobium* sp. (*Desmodium*) Д2. Штами бульбочкових бактерій люпину, які зберігаються в колекції, розділено на 3 серогрупи: 1) найбільш численна серогрупа 367a (штами, ізольовані з бульбочок поширених видів люпину *L. luteus*, *L. album* та частина штамів з бульбочок люпину декоративного); 2) штами бульбочкових бактерій серадели, які позитивно реагували з двома антисироватками до ризобій люпину та сої: 367a та KB11; 3) штами, серологічна належність яких залишається не визначеною.

Вивчено здатність 35 штамів бульбочкових бактерій засвоювати вуглеводи. Встановлено суттєві відмінності за характером використання вуглеводів як між представниками різних родів та видів ризобій, так і між штамми одного виду. Показано, що використання різних сполук азоту є індивідуальною штамовою ознакою. Оптимальним джерелом азоту для штамів бульбочкових бактерій є $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Визначено, що кращими для довготривалого зберігання бульбочкових бактерій є удосконалені середовища з гороховим або люпиновим відваром, сірчаноокислим амонієм та підібраними концентраціями вуглеводів. Вони забезпечують найкращий ріст ризобій та помірне продукування ними екзополісахаридів [4].

Показано, що тривале зберігання штамів *Bradyrhizobium japonicum* M-8 і *B. japonicum* 46 методами періодичного пересіву та в ліофілізованому стані істотно не впливає на їх симбіотичні властивості. За показниками урожайності сої виявлено, що тривала підтримка штамів *B. japonicum* M-8 і *B. japonicum* 46 під мінеральним маслом менш надійна, ніж два інші методи зберігання (періодичний пересів та ліофілізація). Найвищий приріст урожаю зерна сої (18,9 %) забезпечив штам

B. japonicum 46, який підтримувався методом періодичних пересівів.

Протягом 2016-2017 рр. проведено пошук та селекцію нових високоефективних штамів роду *Mesorhizobium* – мікросимбіонтів рослин нуту та лядвенцю, що вирощувались в зонах Полісся, Степу та Лісостепу України [6] (рис. 2). Вперше показано, що популяції бульбочкових бактерій нуту в ґрунтах України гетерогенні: представлені ризобіями, що розрізняються між собою за швидкістю росту та іншими культурально-морфологічними, фізіолого-біохімічними та симбіотичними властивостями. В умовах вегетаційних дослідів вивчено симбіотичні властивості *M. ciceri*. Показано утворення значної кількості бульбочок (більше ніж у позитивному контролі) за інокуляції насіння нуту 13-ма штамми з 69 досліджуваних ізолятів.

Методом аналітичної селекції одержано нові ефективні штами мікросимбіонтів лядвенцю: *Mesorhizobium loti* L-8m і *M. loti* L-03, досліджено їх морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості. Показано, що інокуляція насіння лядвенцю суспензіями даних бактерій забезпечує утворення бульбочок на коренях рослин і підвищення показників маси рослин на 45,5 – 47,9% відносно контролю в умовах вегетаційного дослідів.

За використання електронно-мікроскопічних досліджень показано подібність морфології бактерій, ізольованих з бульбочок рослин лядвенцю рогатого та нуту різних сортів. Клітини спор не утворюють, рухливі, паличкоподібної форми, розмір коливається в межах 1,0-2,0 x 0,3-0,5 мкм [7] (рис. 3.).

Співробітниками колекції удосконалено середовище з гороховим відваром, що забезпечує оптимальний ріст



Каталог культур мікроорганізмів
(друге видання)

представників роду *Mesorhizobium*, помірне продукування ними екзополісахаридів та збереження життєздатності бактерій протягом 6 місяців.

За результатами польових дослідів встановлено, що штам *M. ciceri* ND-64 є ефективним мікросимбіонтом нуту за вирощування в агроценозах Степу та Полісся України [15]. У порівнянні з контролем та інокуляцією виробничим штамом спостерігали формування активнішого симбіотичного апарату і довший період його ефективного функціонування [8, 14] (рис. 4).

Показано, що бульбочкові бактерії *M. ciceri* ND-64 здатні до активного продукування біологічно активних речовин. За використання методу високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) в культуральній рідині *M. ciceri* ND-64 виявлено високий вміст речовин ауксинової природи (ІОК, індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-масляну кислоту та індол-3-карбінол) загальною концентрацією 29,59 мкг/г АБС.

Співробітниками колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів отримано імунну антисироватку до штаму бульбочкових бактерій нуту *M. ciceri* ND-64, яка використана для вивчення конкурентоспроможності даного штаму в умовах польового досліді [5].

Досліджено вплив протруйників насіння нуту на життєздатність бульбочкових бактерій. Бактеризацію проводили через 1 - 28 діб після протруєння. Встановлено, що *M. ciceri* ND-64 є більш стійким до діючих речовин фунгіцидів ніж референтний штам *M. ciceri* Н-12.

Показано, що застосування для інокуляції насіння нуту сорту Пам'ять бактеріальної суспензії *M. ciceri* ND-64 забезпечує зростання структурних показників урожайності: кількості зерен з рослини (на 42%), маси насінин з рослини (на 32%), а також урожайності культури (на 26,5%) протягом трьох років досліджень та поліпшення якості насіння (збільшення масової частки азоту і білка) [9].

Співробітниками отримано Патенти України на ефективні штами *Mesorhizobium ciceri* ND-64,



Завідувач колекції, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Ю. О. Воробей проводить наукові дослідження

Rhizobium galegae К-3, *Azospirillum brasilense* 77, які можуть використовуватись як біоагенти мікробних препаратів для підвищення продуктивності рослин [10, 11, 12].

Опубліковано друге видання каталогу корисних ґрунтових мікроорганізмів, доповнене інформацією щодо 33 штамів [2] (рис. 5). Протягом 2011-2021 рр. за заявками лабораторій та установ 251 штам передано для наукових та прикладних досліджень.

Генофонд корисних ґрунтових мікроорганізмів - національне надбання нашої держави, що безперечно складає важливу частину біологічних ресурсів України і потребує подальшого надійного зберігання, поповнення фондів та проведення різнопланових досліджень, насамперед, молекулярно-генетичних.

Розвиток колекції, поповнення її фондів, проведення актуальних та практично спрямованих досліджень мікроорганізмів, їх властивостей і способів надійного зберігання - все це формує надійне підґрунтя для розвитку сільськогосподарської мікробіології.

Основні публікації
співробітників лабораторії:

1. Воробей Ю. О., Воробей В. С., Пиріг О. В. Особливості взаємодії *Rhizobium galegae* з козлятником східним. Сільськогосподарська мікробіологія. 2016. Вип. 24. С. 9–17.

2. Волгогон В. В., Воробей Ю. О., Надкернична О. В. Каталог культур мікроорганізмів. Чернігів: видавець Брагинець О.В., 2015. 48 с.

3. Волгогон В.В. Методичні рекомендації «Наукові основи створення штучних симбіозів діазотрофів зі злаковими і бобовими культурами. [Волгогон В. В., Надкернична О. В., Крутило Д. В. та ін.]. Чернігів: ІСМАВ НААН. 2015. 58 с.

4. Ковалевська Т. М. Методичні рекомендації «Методи культивування та тривалого зберігання бульбочкових бактерій у колекціях». [Т. М. Ковалевська, С. Ф. Козар,

Д. В. Крутило та ін.]. Чернігів: ІСМАВ НААН. 2015. 36 с.

5. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Волкова І. В., Усманова Т. О. Штам *Mesorhizobium ciceri* ND-64 – ефективний мікросимбіонт нуту сучасних сортів. Сільськогосподарська мікробіологія. 2020. Вип. 32. С. 3–15.

6. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Романова І. М., Усманова Т. О., Бушулян О. В. Новий штам *Mesorhizobium* sp. 1 та його вплив на структурні показники врожаю нуту сорту Скарб. Сільськогосподарська мікробіологія. 2018. Вип. 27. С. 40–44.

7. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Усманова Т. О., Стрекалов В. М. Характеристика властивостей бульбочкових бактерій нуту, поширених в агроценозах Лісостепової та Степової зон України. Сільськогосподарська мікробіологія. 2019. Вип. 29. С. 21–28.

8. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Усманова Т. О. Ефективність бактеризації насіння нуту сорту Скарб новим штамом *Mesorhizobium ciceri*. Вісник аграрної науки. 2019. № 10. С. 32–36.

9. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Халеп Ю. М. Економічна та біоенергетична

ефективність бактеризації нуту штамом *Mesorhizobium ciceri* ND-64. Сільськогосподарська мікробіологія. 2020. Вип. 31. С. 64–71.

10. Штам активних азотфіксувальних бактерій *Azospirillum brasilense* для інокуляції насіння пшениці ярої: пат. 105118 Україна. МПК С12N 1/20, Надкернична О. В., Воробей Ю. О., Шаховніна О. О.; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН; заявл. 21.07.2015; опубл. 10.03.2016, бюл. № 5.

11. Штам бактерій *Rhizobium galegae* для підвищення урожаю козлятника східного та поліпшення якості рослинної сировини: пат. 105942 Україна. МПК С12N 1/20, Воробей В.С., Воробей Ю. О., Ковалевська Т. М.; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН; заявл. 12.10.2015 ; опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7.

12. Штам бульбочкових бактерій *Mesorhizobium ciceri* ND-64 (ІМВ-7835) для одержання бактеріального препарату під нут: пат. № 141783 Україна. МПК С12N 1/02, С05F 11/08, Логоша О. В., Воробей Ю. О., Усманова Т. О.; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН; заявл. 21.10.2019; опубл. 27.04.2020, Бюл. № 8. 4 с.

13. Vorobei Y., Deriabin O., Usmanova T. Phenotypic and molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* 137 capable to root colonization of spring wheat. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. Tom. XXVII, Issue: 2. 2020. P. 129–135.

14. Lohosha O., Vorobei Y. Dynamics of formation and functioning of legume-rhizobial symbiosis *Mesorhizobium ciceri* – *Cicer arietinum*. *Australian Journal of Crop Science*. 2021. I. 15(01). P. 129–136.

15. Lohosha O., Vorobei Y., Usmanova T. *Mesorhizobium ciceri* ND-64 – highly efficient symbiont of chickpea plants, cultivated in Polissia and Steppe zone of Ukraine. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. 2021. T. XXVII. I. 1. P. 55–58.