

ПОИСК НЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ-АЗОТФИКСАТОРОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯХ

Е. В. Отейчук

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, ekaterinaotejcuk@gmail.com
Научный руководитель – Д.В. Маслак*

Из почвы прикорневой зоны сельскохозяйственных растений выделены не симбиотические бактерии-азотфиксаторы и изучены их свойства. Создана коллекция из 27 не фитопатогенных бактерий-азотфиксаторов. Для дальнейших исследований отобраны 12 изолятов, обладающих комплексом хозяйственно-полезных свойств (азотфиксация, фосфатмобилизация, синтез фитостимулирующих метаболитов).

Ключевые слова: бактерии-азотфиксаторы; биопрепараты для растениеводства; хозяйственно-полезные свойства.

В настоящее время стоит вопрос о повышении продуктивности сельскохозяйственных культур и улучшения качества урожая. Азот является одним из макроэлементов, необходимых для роста и развития растений. Однако его количество, необходимое для повышения урожая сельскохозяйственных растений, превышает потенциал агробиоценозов. Для восполнения недостатка азота в почве в сельском хозяйстве традиционно используются минеральные удобрения. Однако избыточное их применение пагубно влияет на состояние экосистем: происходит увеличение выделения парниковых газов (метан, сероводород и т.д.), загрязнение грунтовых вод, уменьшение азотфиксирующей активности почвенных микроорганизмов [1].

Использование биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов – один из самых экологически безопасных современных методов повышения урожайности растений. Азотфиксирующие бактерии, или же diaзотрофы, являются биотехнологическим инструментом с высоким потенциалом для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Кроме фиксации азота, такие микроорганизмы могут обладать способностью переводить нерастворимые соединения фосфора в форму легко усваиваемую растениями и вырабатывать биологически активные вещества, стимулирующие рост и развитие растений. Совокупность таких свойств делает эти микроорганизмы перспективными для создания биопрепаратов, повышающих продуктивность растений [1].

Целью данной работы является создание коллекции не симбиотических бактерий-азотфиксаторов, перспективных для использования при создании биопрепаратов для растениеводства.

Выделение изолятов не симбиотических бактерий-азотфиксаторов проводилось из двух образцов почвы, предоставленных фермерскими хозяйствами Республики Беларусь. Навеску почвы весом 10 грамм помещали в 100 мл физиологического раствора и встряхивали в течение 1 часа на круговом шейкере. Затем делали серию последовательных разведений с шагом в 10 раз. Высев микроорганизмов для получения изолированных колоний проводили из разведений 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} на безазотную среду Эшби. Выросшие изолированные колонии пересевали на среду Эшби истощающим штрихом для подтверждения их способности азотфиксации. Кроме того производили пересев выделенных микроорганизмов на агаризованную ГРМ-среду, для проверки их способности к росту на стандартных полноценных средах.

Оценку безопасности выделенных микроорганизмов для растений, проводили на основании определения у них факторов вирулентности. Исследование проводили по стандартным методикам [2].

Фосфатмобилизующие свойства микроорганизмов оценивали по их способности при росте на среде Муромцева [2] формировать прозрачные зоны (зоны гало) вокруг колоний микроорганизмов.

О способности микроорганизмов синтезировать биологически активные вещества, стимулирующие рост растений, судили по их влиянию на рост протиста *Chlorella vulgaris*, который можно расценивать как модель растительной клетки. Исследуемые микроорганизмы засевали бляшками диаметром 0,5 см на среду Хата [2], содержащую культуру *Ch. vulgaris*. Сутки чашки инкубировали при 28 °С в темноте (для роста бактериальной культуры), затем переносили в светотеплицу (для роста и фотосинтеза хлореллы). Положительное влияние бактерий исследуемых изолятов на рост хлореллы фиксировали по образованию темно-зеленых зон роста протиста вокруг колоний микроорганизмов.

В ходе выделения бактерий-азотфиксаторов на безазотной среде Эшби отсеяно 48 изолированных колоний. При повторных пересевах изолятов на среде Эшби, четыре из них не подтвердили способности к фиксации молекулярного азота.

Поскольку одним из важных критериев для микроорганизмов, перспективных для использования в производстве микробных биопрепаратов, является способность к росту на лабораторных питательных средах (удобство при культивировании), 44 изолята бактерий-азотфиксаторов пересевали истощающим штрихом на агаризованную среду на основе рыбного гидролизата. В результате из работы были

исключены два изолята микроорганизмов, плохо растущих в лабораторных условиях на полноценной среде.

Так как бактерии-азотфиксаторы, изучаемые в настоящей работе, выделены из почвы прикорневой зоны сельскохозяйственных растений, среди них могли присутствовать и фитопатогенные микроорганизмы. Для дальнейших исследований с целью отбора бактерий, перспективных для включения в биопрепараты для растениеводства, необходимо было проверить отсутствие у них фитопатогенных свойств. Микроорганизмы проверяли на наличие у них комплекса факторов вирулентности, таких как пектатлитическая, целюлолитическая и амилалитическая активность, способность мацерировать растительную ткань (картофеля и моркови), вызывать некроз растительной ткани (реакцию гиперчувствительности) на листьях боба овощного, а также наличие фитотоксичности по отношению к *Ch. vulgaris*. В результате проведенных экспериментов из работы были удалены 15 потенциально опасных для растений изолята, бактерии которых имели комплекс из трех и более факторов вирулентности.

Двадцать семь изолятов не фитопатогенных свободноживущих бактерий-азотфиксаторов помещены в коллекцию не фитопатогенных микроорганизмов НИЛ Молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ.

Микроорганизмы, перспективные для использования при создании биопрепаратов повышающих продуктивность растений, должны обладать комбинацией хозяйственно-полезных свойств, таких как фиксация молекулярного азота, способность к фосфатмобилизации и синтезу фитостимулирующих метаболитов. К последним в первую очередь относятся фитогормоны.

Изучение этих параметров проведено у 27 не фитопатогенных изолятов бактерий-азотфиксаторов, выделенных в ходе работы. Выяснено, что бактерии 12 изолятов обладают комплексом хозяйственно-полезных свойств. Результаты представлены в таблице.

Хозяйственно-полезные свойства изучаемых бактерий-азотфиксаторов

Изолят	Фосфат-мобилизация	Стимуляция роста <i>Ch. vulgaris</i>	Изолят	Фосфат-мобилизация	Стимуляция роста <i>Ch. vulgaris</i>
1,3	+	+	2,29	-	+
1,4	-	+	2,33	-	+
1,5	+	+	1,36	+	+
2,17	-	+	1,41	-	+
2,18	-	+	1,43	-	+
2,19	+	+	1,44	-	+

Как видно из представленных данных, бактерии 4 изолятов (1,3, 1,5, 2,19, 1,36) способны переводить в растворимое состояние фосфор из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Для этих микроорганизмов отмечена также способность к стимуляции роста *Ch. vulgaris*. Так же в эксперименте отмечена способность бактерий изолятов 1,4, 2,17, 2,18, 2,29, 2,33, 1,41, 1,43 и 1,44 стимулировать рост *Chl. vulgaris*, но у этих бактерий-азотфиксаторов отсутствует способность к фосфатмобилизации. Бактерии 12 изолятов, обладающие комплексом хозяйственно-полезных свойств, представляют наибольший интерес в дальнейших исследованиях по созданию биопрепарата для повышения продуктивности растений.

Из почвенных проб выделено 42 изолята азотфиксирующих микроорганизмов. Бактерии 15 изолятов проявили фитопатогенные свойства и были удалены из дальнейших исследований.

27 изолятов не фитопатогенных бактерий-азотфиксаторов помещены в коллекцию не фитопатогенных микроорганизмов НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ.

Бактерии 12 изолятов обладают комплексом хозяйственно-полезных свойств (азотфиксация, фосфатмобилизация, синтез фитостимулирующих метаболитов) и представляют интерес для дальнейших исследований по созданию биопрепарата для повышения продуктивности растений.

Библиографические ссылки

1. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 9. С. 28–33.
2. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск: БГУ, 2005.