

**К.В. Лаврентьева, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков**

Дніпропетровський національний університет імені О. Гончара,  
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,  
e-mail: k\_lavrentyeva@mail.ru

## **ЗДАТНІСТЬ ҐРУНТОВИХ ФОСФАТМОБІЛІЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ ДО КОЛОНІЗАЦІЇ КОРЕНІВ ПШЕНИЦІ**

*В умовах мікровегетаційного досліджу на проростках озимої пшениці встановлено, що ступінь виживання фосфатмобілізуючих бактерій *Enterobacter dissolvens* і *Pseudomonas putida* при культивуванні їх у середовищі із слабкорозчинним трикальційфосфатом є значно вищим, у порівнянні з середовищем із розчинним фосфатом ( $KH_2PO_4$ ). Дослідним культурам властива висока адгезивна здатність до коренів пшениці, вони накопичуються у титрах, більших за 5,7 Іг КУО на 1 г коренів. Встановлено, що штам *P. putida* більш активно колонізував корені проростків пшениці, ніж *E. dissolvens*, що характерно для бактерій цього роду.*

*К л ю ч о в і с л о в а : фосфатмобілізуючі бактерії, мікровегетаційний метод, колонізація коренів.*

Однією з умов підвищення продуктивності культурних рослин є поліпшення їх фосфорного живлення. Проблему забезпечення рослин фосфором значною мірою можна вирішити шляхом використання ґрунтових мікроорганізмів, що покращують засвоюваність рослинами слабкорозчинних фосфатів ґрунту. Це особливо важливо в сучасних умовах, коли хімічна промисловість не може задовольнити потреби сільського господарства у фосфорних добривах. З метою підвищення продуктивності культурних рослин, в Україні та за її межами, розробляються біопрепарати на основі ризосферних фосфатмобілізуючих бактерій. Для розробки такого високоєфективного біопрепарату, окрім вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів, що входять до їх складу, насамперед, є необхідним дослідити процес взаємодії мікробних об'єктів із сільськогосподарськими рослинами. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було визначення ступеню виживання штамів фосфатмобілізуючих бактерій у ризосферній зоні проростків пшениці та дослідити їх здатність до колонізації коренів рослин.

### **Матеріали і методи**

Об'єктом дослідження були два штами ґрунтових фосфатмобілізуючих бактерій *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ДНУ. Визначення ступеню виживання штамів у прикореневій зоні культурних рослин та здатності до колонізації їх коренів досліджували при постановці мікровегетаційного досліджу з озимою пшеницею сорту «Лада Одеська». Досліди проводили у двох варіантах із використанням рідкого середовища Менкінної [4] з рН 7,0, до якого у першому варіанті експерименту як



єдине джерело фосфору вносили розчинний фосфат у вигляді  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в концентрації 1,2 г/л, а в другому — фосфат у вигляді слабкорозчинного трикальційфосфату в концентрації 1,55 г/л. Саме у такій кількості внесених фосфатів концентрація фосфору складає 10 ммоль, яка є оптимальною для розвитку рослин [5]. Штами вирощували у м'ясопептонному бульйоні при 28 °С і 200 об/хв до моменту досягнення культурами стаціонарної фази росту. Потім по 1 мл бульйонних культур вносили до 9 мл середовищ з розчинним і слабкорозчинним фосфатами і робили висів на м'ясопептонний агар (МПА) для визначення в них початкової концентрації життєздатних клітин. Далі проводили бактеризацію коренів проростків пшениці. Для цього зерно пшениці обробляли протягом 10 хв слабким розчином марганцевокислого калію та пророщували у чашках Петрі при 22 °С протягом 2 діб до появи перших корінців. Потім кожен пророщену зернину поміщали на стерильний фільтрувальний папір, зігнутий лійкою зі зрізаним центром, і обережно опускали у пробірку з середовищем так, щоб фільтрувальний папір знаходився над рідиною, але не торкався її. Зерно пророщували у пробірках протягом 7 діб. При цьому насіння знаходилось у фільтрувальному папері над середовищем, а корінці проростали через зрізану частину фільтра до середовища.

По закінченню терміну культивування для оцінки ступеню виживання штамів у ризосферній зоні рослин було визначено кількість життєздатних клітин в обох культуральних середовищах шляхом висіву їх на МПА. Для дослідження колонізувальної здатності штамів *P. putida* та *E. dissolvens* з кожного варіанту досліду відбирали по 3 проростки, відділяли корені, визначали їх вагу, розтирали у ступці з 10 мл фізіологічного розчину, робили ряд розведень та висівали на МПА з ністатиним із концентрацією 50 мг/мл для пригнічення росту грибів. Чашки інкубували в термостаті при 28 °С 24 години та робили підрахунок числа КУО [1]. Колонізувальну здатність штамів оцінювали за кількістю КУО бактерій на 1 г коренів. Статистичне опрацювання 3-х експериментальних серій досліджень проводили стандартними методами з визначенням t-критерія Стьюдента на 5% рівні значущості [3].

### Результати та їх обговорення

Порівняння кількості життєздатних клітин штамів *E. dissolvens* і *P. putida* в культуральному середовищі з розчинним фосфатом із кількістю життєздатних клітин тих же штамів у середовищі зі слабкорозчинним фосфатом показало, що ступінь виживання обох культур у другому варіанті є значно вищим (табл. 1).

На кінець терміну культивування рослин кількість життєздатних клітин штамів *E. dissolvens* та *P. putida* в середовищі зі слабкорозчинним фосфатом складала відповідно 16,2% і 5,5% від початкової кількості клітин, тоді як у середовищі з розчинним фосфатом лише 0,52% і 0,05%. При цьому рН середовища зі слабкорозчинним трикальційфосфатом знизився відповідно до 4,3 і 4,9, а рН середовища з розчинним фосфатом — до 5,2 і 5,4. Більше зниження кількості життєздатних клітин обох штамів у середовищі із розчинним фосфатом наприкінці терміну культивування рослин можна пояснити тим, що оптимальна для проростків пшениці концентрація розчинного фосфату в середовищі (10 ммоль) пригнічувала ріст мікроорганізмів. Подібні результати відносно негативного впливу розчинного фосфату на активність і розвиток фосфатомобілізуючих бактерій отримано в роботі Міканової [6].



Таблиця 1  
 Ступінь виживання *E. dissolvens* та *P. putida* у ризосферній зоні проростків пшениці (n=3)

Table 1  
 Survival degree of *E. dissolvens* and *P. putida* strains in rhizosphere zone of wheat germ (n=3)

Штами	Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині на початку досліду, Іg КУО/10 мл		Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині через 7 діб, Іg КУО/10 мл	
	Середовище із $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Середовище із $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<i>P. putida</i>	7,83±6,59	7,82±6,61	4,49±3,26*	6,56±5,21*
<i>E. dissolvens</i>	8,12±7,09	8,13±7,16	5,84±4,67*	7,34±6,07*

\* результати достовірні на 5% рівні значущості

Більш високий відсоток виживання обох досліджених культур у середовищі зі слабкорозчинним трикальційфосфатом, можливо, пов'язаний з їх здатністю самостійно «регулювати» процес звільнення фосфору з трикальційфосфату, підтримуючи необхідну і достатню для їх росту і росту рослин концентрацію розчинного фосфору в середовищі.

Тим самим можна пояснити і різницю в здатності штамів до колонізації коренів пшениці при вирощуванні їх у середовищах із розчинним і слабкорозчинним фосфатами (табл. 2). Так, для штамів *E. dissolvens* і *P. putida* через 7 діб вирощування проростків у 10 мл середовища із трикальційфосфатом на 1 г коренів пшениці було адсорбовано клітин відповідно у 3,6 і 2,5 рази більше, ніж у середовищі із розчинним фосфатом.

Таблиця 2  
 Колонізувальна активність штамів *E. dissolvens* та *P. putida* у розрахунку на 1 г коренів (n=3)

Table 2  
 Colonizing activity of *E. dissolvens* and *P. putida* strains in recalculation per 1 g of wheat roots (n=3)

Штами	Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині на початку досліду, Іg КУО/10мл		Кількість життєздатних клітин на 1г коренів пшениці через 7 діб, Іg КУО	
	Середовище із $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Середовище із $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<i>P. putida</i>	7,83±6,59	7,82±6,61	5,8±5,00*	6,2±5,15*
<i>E. dissolvens</i>	8,12±7,09	8,13±7,16	5,23±4,17*	5,79±4,98*

\* результати достовірні на 5% рівні значущості



На відміну від *E. dissolvens* штам *P. putida* активніше колонізував корені проростків пшениці (табл. 2). Через 7 діб вирощування проростків на 1 г коренів пшениці у середовищі із трикальційфосфатом було адсорбовано у 2,57 раза більше клітин штаму *P. putida*, ніж *E. dissolvens*, а у середовищі із розчинним фосфатом — у 3,8 раза. Це можна пояснити тим, що культура має високу адгезивну здатність, що характерно для бактерій цього роду.

Незважаючи на різницю ступенів адгезії клітин штамів *E. dissolvens* і *P. putida*, їх обох можна вважати активними колонізаторами, так як у перерахунку на 1 г коренів вони накопичуються у титрах, більших за 5,7 lg КУО. Згідно з літературними даними такий рівень колонізації оцінюється як достатньо високий [1].

Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що в модельному експерименті обидва досліджені штами здатні до активної колонізації ризосфери проростків пшениці та формування з культурними рослинами тісної асоціації. Враховуючи встановлену раніше високу фосфатмобілізуючу активність цих штамів у відношенні трикальційфосфату [2], їх можна вважати перспективними і рекомендувати для розробки біопрепаратів для покращення фосфорного живлення сільськогосподарських рослин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гарагуля А.Д., Бабич Л.В., Киприанова Е.А., Смирнов В.В. Способность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* к колонизации корней пшеницы // Микробиологический журнал. — 1988. — т. 50. — № 6. — С. 77–81.
2. Лаврентьева К.В., Черевач Н.В., Винников А.И. Динамика мобилизации фосфата штамми *Enterobacter dissolvens* і *Pseudomonas putida* з трикальційфосфату // Микробиологічний журнал. — 2008. — т. 70. — № 1. — С. 25–30.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — Москва: Высш. шк., 1990. — 352 с.
4. Рой А.А., Булавенко Л.В., Курдиш И.К. Новые штаммы бацилл, минерализующие органические соединения фосфора // Микробиологічний журнал. — 2001. — Т. 63, № 4. — С. 9–14.
5. Швартау В.В., Стахів М.П. Вплив ортофосфату на активність кислих фосфатаз коренів проростків озимої пшениці // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — т. 39, № 3. — С. 207–211.
6. Mikanova O., Novakova J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate // Rostlinna vyroba. — 2002. — Vol. 48, № 9. — P. 379–400.



Е.В. Лаврентьева, Н.В. Черевач, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара,  
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,  
e-mail: k\_lavrentyeva@mail.ru

## СПОСОБНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К КОЛОНИЗАЦИИ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

### Реферат

В условиях микровегетационного опыта на проростках озимой пшеницы установлено, что выживаемость фосфатмобилизирующих бактерий *Enterobacter dissolvens* и *Pseudomonas putida* при культивировании их в среде со слаборастворимым трикальцийфосфатом значительно выше, чем в среде с растворимым фосфатом ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Культурам свойственна высокая адгезивная способность к корням пшеницы, они накапливаются в титрах, больших, чем  $5,7 \lg$  КОЕ на 1 г корней. Штамм *P. putida* более активно колонизировал корни проростков пшеницы, чем *E. dissolvens*, что характерно для бактерий этого рода.

К л ю ч е в ы е с л о в а : фосфатмобилизирующие бактерии, микровегетационный метод, колонизация корней.

K.V. Lavrentyeva, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov

Oles Gonchar Dnepropetrovsk National University,  
72, Gagarina str., Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine,  
e-mail: k\_lavrentyeva@mail.ru

## CAPABILITY OF SOIL PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIAL STRAINS TO COLONIZE WHEAT ROOTS

### Summary

During microvegetative investigation at wheat plants it was shown that *Enterobacter dissolvens* and *Pseudomonas putida* strains survive better in the media with insoluble tricalciumphosphate in contrast to medium with phosphate ion content. The strains of soil bacteria have high adhesive features to the plant roots as 1g of wheat root contains more than  $5.7 \lg$  of colony forming units. It was shown that the strains of *P. putida* colonize wheat roots more actively than *E. dissolvens* strains, that is characteristically for this genus of bacteria.

К e y w o r d s : phosphate-solubilizing bacteria, microvegetative investigation, root colonization.

