ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам (Под ред. О.Микета). 121-127, М., Мир, 1982.
2. Хроматография на бумаге. (Под ред. И.М.Хейса и К.Мацека). 445-447, М., Иностранная литература, 1962.
3. *Fang Peijmg, Mao Weiyng, Chen Qi*. Acta Microbiol. Sinica, 22, 4, 353-360, 1982.
4. Patent 154384, France, 1968.
5. Patent 3,650,899, USA, 1972.
6. Patent 3,329,577 USA, 1967.
7. *Ruchti G., Boume J.R.* 1st, Fur. Conger. Biotechnol., Interlaken, 1978. Frankfurt, 2, 101-103, 1978.
8. *Yoshinaga F., Yoshinaga S., Katsuga N.S.* Cen. Appl. Microbiology. 13, 25-37, 1967.

Поступила 22.X.1997

Биолог. журн. Армении, 3-4 (52), 1999

УДК 579.64.58.071

КОНКУРЕНТОСПОСОБНОЕ СООБЩЕСТВО АССОЦИАТИВНЫХ ДИАЗОТРОФОВ В РИЗОСФЕРЕ ЯЧМЕНЯ

Վ.Գ. ՆԻԿՈԳՈՍՅԱՆ, Ի.Բ. ԲԱԳԴԱՏԱՐՅԱՆ

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучено сообщество азотфиксирующих микроорганизмов (САН) из ризосферы ячменя, отличающееся высокой азотфиксирующей активностью, конкурентоспособностью и ростестимулирующим действием на пшеницу. Исследованное САН А43 состоит из диазотрофов, принадлежащих к родам *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* и других сопутствующих бактерий. Этот состав в течение 6-летнего лабораторного хранения не изменяется. Показано, что наличие в САН культуры *Erwinia sp.* защищает диазотрофов от окружающих конкурентов и с разной активностью подавляет рост ряда фитопатогенных бактерий.

Ուսումնասիրվել է զարու ռիզոսֆերայից մեկուսացված ազոտֆիքսող մանրէների համակեցություն (ՍԱԴ), որն օժտված է ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ, մրցունակ է և նպաստում է ցորենի սերմերի աճեցողությանը: Պարզվել է, որ փորձարկված А43 (ՍԱԴ) կազմված է *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* ցեղերին պատկանող դիազոտորոֆներից և նրանց ուղեկցող այլ մանրէներից: Համակեցության այդ կազմը լաբորատոր պայմաններում վեց տարիների ընթացքում պահպանվել է նույնությամբ: Ցույց է տրված, որ ՍԱԴ-ում զարգացող *Erwinia sp.*-ն դիազոտորոֆներին պաշտպանում է շրջապատի մրցակիցներից և տարբեր ակտիվությամբ ճնշում մի շարք ֆիտոպաթոգեն բակտերիաների զարգացումը:

A community of nitrogen-fixing microorganisms (CNFM) isolated from rhizosphere of barley with high nitrogen-fixing activity, the competitor stability and stimulating growth activity of wheat seeds has been studied. The community А43 consists of diazotrophs

of genera *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* in combination with other accompanying microorganisms. The CNFM composition mentioned was not changed during six years of maintenance. Protection of diazotrophs from surrounding competitors and depression a number of phytopathogenic bacteria by *Erwinia* sp. in CNFM has been revealed.

Сообщество diaзотрофов - ризосфера ячменя

Выявлено, что смешанные культуры несимбиотических азотфиксаторов в отличие от чистых культур обладают высокой азотфиксирующей активностью [2, 8] и ростстимулирующим действием на растения [9, 12, 13]. Этим обусловлен значительный интерес ученых к указанным сообществам азотфиксирующих микроорганизмов в последние десять лет. Изучены состав, азотфиксирующая активность, стабильность и другие свойства ассоциаций diaзотрофов [2, 14]. Однако недостаточны сведения об экологии несимбиотических азотфиксаторов на корнях растений и особенно о взаимодействии микроорганизмов в смешанных культурах [2, 3, 8].

В настоящей статье обобщены результаты исследований одного сообщества азотфиксирующих микроорганизмов ризосферы ячменя.

Материал и методика. Объектами исследования явились САМ А43, культуры diaзотрофов и другие микроорганизмы, выделенные нами из различных вод, донных отложений и почв, стрептомицинустойчивый и тетрациклинустойчивый мутанты азотобактера, а также *Azotobacter chroococcum* ИНМИА В-6111 и 8 фитопатогенных бактерий, полученных из коллекции культур РЦДМ НАН Армении (табл. 5).

Выделение и изучение микроорганизмов САМ А43 проводили на средах Эшби, Чапека, МПА и GB [15]. Культуры выращивали при 27° в аэробных условиях.

Влияние продуктов жизнедеятельности культур САМ на рост семян пшеницы определяли методом обработки семян водной суспензией исследованных культур [5].

Идентификацию культур проводили по определителям Берги [10, 11]. Антагонистические взаимодействия микроорганизмов изучали методом агаровых блоков, а активность азотфиксации - ацетиленовым методом, подробное описание которого нами дано ранее [6]. Полученные результаты подвергались статистической обработке [7].

Результаты и обсуждение. Конкурентоспособное сообщество А43, отобранное из более чем 100 САМ, в первом году выделения проявляло высокую азотфиксирующую активность и стимулировало рост семян пшеницы. Исследования показали, что изученное сообщество состоит из diaзотрофов, принадлежащих к родам *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, а также *Erwinia* и двух других бактерий неизвестной родовой принадлежности. Культура *Azotobacter* по своим морфологическим и физиолого-биохимическим особенностям близка к виду *A.armeniacus* [10], а остальные diaзотрофы и сопутствующий *Erwinia* отличались от известных видов этих родов [11].

Исследование азотфиксации САМ А43 и развивающихся в сообществе diaзотрофов показало, что в течение 1-2 лет после многократных пересевов активность оставалась стабильной (табл.1). Изменения в активности не обнаруживаются также после четырехлетнего хранения культур в экстремальных условиях: низкая температура в зимний период (-2+2°), пересевы один раз в год, резкое изменение температуры и т.д. Любопытно, что максимальная активность азотфиксации обнаруживается в случае совместного культивирования всех diaзотрофов САМ А43.

Интересно отметить, что после 5 лет хранения сообщество сохраняло

стимулирующее рост семян пшеницы свойство (табл.2).

Таблица 1. Азотфиксирующая активность САМ А43 и развивающихся в сообществе diaзотрофов при их длительном хранении

САМ, diaзотрофы	Фиксированный азот, мг/9 дней		
	исходная культура	через 2 года хранения	через 5 лет хранения *
А43	0,62±0,02	0,59±0,03	0,61±0,02
<i>Azotobacter armeniacus</i>	0,41±0,01	0,41±0,02	0,42±0,01
<i>Bacillus sp.</i>	0,12±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01
<i>Klebsiella sp.</i>	0,28±0,03	0,30±0,02	0,29±0,02

Таблица 2. Стимулирующее воздействие САМ А43 на рост семян пшеницы (мм, IV день)

Варианты	Разведения	Длина корней	Высота роста
Контроль	-	37,3±1,52	61,4±2,30
А43	0	52,3±1,96	76,5±2,08
	1:5	62,5±2,36	79,0±4,05
	1:10	42,3±1,90	67,0±2,95
	1:50	54,3±2,05	81,7±2,52
	1:200	64,3±3,58	90,0±4,88

Устойчивость сообществ к экстремальным условиям, вероятно, формировалась в условиях *in situ*, где внешние факторы часто резко изменяются.

Конкурентоспособность САМ А43 обусловлена наличием в сообществе *Erwinia sp.* А43-А1, защищающего diaзотрофов в САМ от антагонистического воздействия многих спороспособных бактерий.

Антагонистическое действие спороспособных бактерий на культуру *Azotobacter* отмечено рядом исследователей [1, 4].

Проведенные нами исследования показали, что спорообразующие бактерии подавляют также рост других diaзотрофов (табл.3). Этот антагонизм

Таблица 3. Антагонизм спорообразующих бактерий в отношении разных diaзотрофов

Diaзотрофы (тест-культуры)	Штамм	Зона подавления роста, мм		
		<i>Bacillus pumilus</i> 43	<i>Bacillus circulans</i> 55	<i>Bacillus subtilis</i> 19
<i>Azotobacter chroococcus</i>	В-6111	20	18	17
<i>A.chroococcus</i>	С-6	23	21	21
<i>A.chroococcus</i>	Т-25	18	15	15
<i>Bacillus sp.</i>	12-1	15	8	8
<i>Bacillus sp.</i>	А-8	12	8	10
<i>Klebsiella sp.</i>	56	19	21	9
<i>Klebsiella sp.</i>	А43	13	9	9
<i>Xanthobacter flavus</i>	47	24	10	9

Примечание: С-6 - стрептомицинустойчивый мутант, Т-25 - тетрациклинустойчивый мутант.

особенно сильно проявляется у *Bacillus pumilus* 43, подавляющий рост всех исследованных азотфиксаторов, в том числе и рост антибиотикустойчивых *Azotobacter chroococcum*.

Важно отметить, что *Erwinia* A43-A1 инактивирует антибиотики, синтезируемые бактериями-антагонистами (рост всех diaзотрофов до агар-блока продуцента) и подавляет их рост (табл.4). Эта бактерия с разной активностью подавляет также рост ряда фитопатогенных бактерий (табл.5).

Таблица 4. Антагонизм *Erwinia* A43-A1 в отношении разных микроорганизмов

Бактерии (тест-культуры)	Штамм	Способность азотфиксации	Зона подавления роста, мм
<i>Bacillus badius</i>	30	-	12
<i>B.licheniformis</i>	12	-	26
<i>B.megartherium</i>	21	-	12
<i>B.circulans</i>	55	-	18
<i>B.pumilis</i>	43	-	22
<i>B.subtilis</i>	19	-	22
<i>Bacillus sp.</i>	12-1	+	0
<i>Bacillus sp.</i>	A-8	+	0
<i>Azotobacter chroococcum</i>	B-6111	+	0
<i>Klebsiella sp.</i>	56	+	0
<i>Xanthobacter flavus</i>	47	+	0

Таблица 5. Антагонизм *Erwinia* A43-A1 в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Фитопатогенные микроорганизмы (тест-культуры)	Штамм	Зона подавления роста, мм
<i>Pseudomonas lycopersicum</i>	B-8863	14
<i>P.lachrymans</i>	B-8737	36
<i>Xanthomonas baticola</i>	8679	10
<i>X.vesicatoria</i>	8843	36
<i>Erwinia carotovora</i>	B-8700	8
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	B-8799	8
<i>Corynebacterium fascians</i>	B-8692	18
<i>C.michiganense</i>	B-8637	10

Интересно отметить, что указанный штамм A43-A1 не проявляет антагонизма к другим diaзотрофам и азотфиксирующим бациллам.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о своеобразных процессах, протекающих в САМ, и наличии в нем механизмов взаимодействия популяций, обеспечивающих высокий уровень азотфиксации, устойчивость и, особенно, уникальное свойство конкурентоспособности.

Взаимодействие *Erwinia* A43-A1 и diaзотрофов, в частности, соответствует типу взаимодействия протокооперация-коменсализма.

Выявленные особенности САМ A43 и взаимодействия в них микроорганизмов создают предпосылки и перспективу для их практического

применения. Благодаря своей конкурентоспособности это сообщество в естественных условиях может не только защищаться от окружающих конкурентов, но и одновременно, элиминируя их из этой зоны, занимать доминирующее положение, благоприятствуя развитию растений.

ЛИТЕРАТУРА ·

1. Африкян Э.К. Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 3, 154, 1954.
2. Глаголева О.Б., Умаров М.М., Злотников А.К. Микробиология, 63, 2, 221-227, 1994.
3. Звягинцев Д.Г. Бюллетень ВНИИ с/х микробиологии, 42, 6-9, 1985.
4. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. 463, М., Изд-во АН СССР, 1958.
5. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. 531, М., Наука, 1968.
6. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 3, 269-273, 1981.
7. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии. 263, М., Изд-во МГУ, 1978.
8. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. 133, М., Изд-во МГУ, 1986.
9. Умаров М.М., Шабаев В.Л., Смолин В.Ю., Мамедов Н.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
10. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, 964, 1984.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1579, 1986.
12. Kundy B.C. Caur. A. C. Plant and Soil, 57, 2-3, 223-230, 1980.
13. Lethbredge G., Davidson M.S. Soil Biol. and Biochem., 15, 3, 365-374, 1983.
14. Patriquin D.G., Dobereiner J., Jain D.K. Canad. J. Microbiol., 29, 900-915, 1983.
15. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. Plant and Soil, 70, 249-255, 1983.

Поступила 9.XII.1998