



## РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИИ *PAENIBACILLUS POLYMYXA P* В РИЗОСФЕРЕ ВИНОГРАДА

Л. А. ЧАЙКОВСКАЯ,

доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник,

Н. Н. КЛИМЕНКО,

научный сотрудник, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма

(295000, г. Симферополь, ул. Киевская, д. 150; e-mail: ninaklymenko@yandex.ru)

**Ключевые слова:** *Paenibacillus polymyxa P*, ризосфера, виноград.

Экологизация виноградарства является неотъемлемой частью стабилизации состояния окружающей среды и снижения антропогенной нагрузки на ампелоценоз. Поэтому актуальным является применение таких элементов агротехнологий, как внесение в почву микробных препаратов и задернение междурядий виноградников. Основой успешности предпосевной инокуляции семян микробными препаратами является принцип активного размножения и метаболизма инокулянта в ризосфере растений. Однако активные штаммы, составляющие основу биопрепаратов, не всегда в полном объеме приживаются в ризосфере культурных растений, поэтому целесообразно изучение способности данных биоагентов к интродукции. Исследована возможность развития бактерии *Paenibacillus polymyxa P* в ризосфере винограда. С этой целью проведена серия опытов, вследствие которой получены микроорганизмы, устойчивые к воздействию антибиотиков: стрептомицина (1200 ед./мл), ампициллина (130 ед./мл) и канамицина (120 ед./мл). Корневую систему саженцев винограда обрабатывали суспензией полученных антибиотико-резистентных форм, высаживали в сосуды, заполненные лугово-аллювиальной почвой. По истечению каждых 14 дней отбирали ризосферную почву и определяли численность антибиотикорезистентных форм, общая продолжительность опыта составляла 70 дней. В качестве контроля использованы растения, корневая система которых не была бактериализованной. Установлено, что численность антибиотикорезистентных форм достигает  $8 \cdot 10^6$  КОЕ/1г почвы и может служить фактором, существенно влияющим на жизнедеятельность растения. Отмечено улучшение роста и развития саженцев винограда, что свидетельствует о том, что биоагент препарата «Биополитид» действительно приживается в ризосфере растения. С целью получения более точных результатов показана целесообразность использования нескольких антибиотиков для получения резистентных форм бактерий.

## GROWTH OF BACTERIA *PAENIBACILLUS POLYMYXA P* IN GRAPE RHIZOSPHERE

L. A. CHAIKOVSKAYA,

doctor of agricultural sciences, senior research worker,

N. N. KLIMENKO,

research worker, Scientific Research Institute of Agriculture of Crimea

(Kievskaya 150 Str., 295000, Simferopol; e-mail: ninaklymenko@yandex.ru)

**Keywords:** *Paenibacillus polymyxa P*, rhizosphere, grape.

Greening viticulture is an integral part of the stabilization of the environment and reduction of anthropogenic load on grape agrocenosis. Therefore, the use of agricultural technologies such as soil application of microbiological preparations and inter-row sodding of vineyards is relevant. The basis of the success of presowing inoculation of seeds by microbial drugs is the active principle of reproduction and metabolism of inoculum in the rhizosphere of plants. However, the active strains that form the basis of biological preparations, not always fully survive in rhizosphere soil of cultivated plants, so the study of the ability of these biological agents to the survival rate is relevant. It was studied the possibility of the bacterium *Paenibacillus polymyxa P* to survive in rhizosphere soil of grape. It was held a series of experiments, which were obtained as a result of microorganisms resistant to antibiotics: streptomycin (1200 u/ml), ampicillin (130 u/ml) and kanamycin (120 u/ml). Grape root system of plants treated with a suspension of the antibiotic-resistant forms of *Paenibacillus polymyxa P* and planted in containers filled with meadow alluvial carbonate soil. Every 14 days rhizosphere soil was taken and the number of antibiotic-resistant mutants determined, the total duration of the experiment was 70 days. As control used plants where roots were not treated. It was found that the number of antibiotic-resistant forms of bacteria reaches  $8 \cdot 10^6$  in 1 g of soil, and can serve as a factor that significantly affects the life of the plant. There was also improvement in the growth and development of grape, which indicates that the biological agents of preparation "Biopolitid" really survive in rhizosphere of grape. In order to obtain more accurate results the feasibility of using several antibiotics for resistant forms of bacteria shows.

Положительная рецензия представлена И. В. Митрофановой, доктором биологических наук, заведующей отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН.

Одним из аспектов биологического земледелия, основанного на экологической стабилизации агроэкосистем, является применение микробных препаратов. Исследователями разработаны экологически безопасные микробные препараты, которые вводятся в систему необходимых агротехнических мероприятий и успешно применяются в технологиях выращивания сельскохозяйственных культур в различных агроклиматических зонах. Одна из основных функций микробных препаратов – это активизация микробно-растительного взаимодействия, являющегося мощным фактором повышения производительности агроэкосистем. Установлено, что биопрепараты способствуют интенсификации физиолого-биохимических процессов у растений и повышают устойчивость к заболеваниям, благодаря чему возрастает их урожайность и качество сельскохозяйственной продукции [1, 2, 11–13]. В последние годы нами проведены комплексные исследования по использованию бактериальных препаратов в технологии выращивания винограда. Установлено положительное воздействие бактериализации (микробные препараты «Диазофит», «Фосфоентерин», «Биополицид» и их комплекс) на рост и развитие винограда, а также его производительность и качество урожая [5]. Экологизация виноградарства является неотъемлемой частью стабилизации состояния окружающей среды и снижения антропогенной нагрузки на ампелоценоз. Поэтому актуально применение таких элементов агротехнологий, как внесение в почву микробных препаратов и задернение междурядий виноградников. Однако активные штаммы, составляющие основу биопрепаратов, не всегда в полном объеме приживаются в ризосфере культурных растений, поэтому целесообразно изучение способности данных биоагентов к интродукции.

Как известно, основой успешности предпосевной инокуляции семян микробными препаратами является принцип активного размножения и метаболизма инокулянта в ризосфере растений. Ведь высокая степень колонизации корневых сфер может быть залогом эффективного функционирования интродуцированного штамма и его положительного влияния на рост и развитие растений, а также их продуктивность [7–9].

Многими исследователями установлена способность к интродукции микроорганизмов в ризосфере сельскохозяйственных растений [6, 14, 15]. В наших предыдущих исследованиях также доказана способность *Agrobacterium radiobacter* 204 и *E. nimipressuralis* 32-3 к приживаемости в ризосфере винограда [3, 4].

**Цель и методика исследований.** Учитывая сказанное, цель наших исследований заключалась в определении способности штамма *Paenibacillus*

*polymyxa* П (основы препарата «Биополицид») к размножению в ризосфере саженцев винограда сорта Мускат белый.

Исследования по изучению приживаемости биоагента препарата «Биополицид» проведены с использованием общепринятых методик в условиях вегетационного опыта (продолжительность 70 суток). В опыте использовали виноград сорта Мускат белый на подвое Шасла × Берландиери 41Б. Способность к развитию *P. polymyxa* П в указанной топологической сфере определяли с помощью стрептомицин-, ампициллин- и канамицин-резистентных форм, полученных по методике Зибальского [10]. Наши исследования показали, что штамм-основа «Биополицида» был наиболее устойчивым к действию стрептомицина – получен мутант, который выдерживает концентрацию антибиотика 1200 ед./мл. В то же время резистентность форм, полученных для ампициллина и канамицина, не превышала 130 и 120 ед./мл соответственно.

Корневую систему винограда обрабатывали суспензией суточной культуры антибиотико-резистентных форм *P. polymyxa* П (10,2–11,5 млн КОЕ/мл): 6 мл на каждый саженец. Растения высаживали в сосуды (емкость 6 л) с почвой (лугово-аллювиальной карбонатной). Основные характеристики почвы: запасы гумуса 1,5–2,2 %; содержание подвижного азота 11–18 мг/кг, фосфора – 32–38 мг/кг, калия – 260–430 мг/кг; pH почвенного раствора 8,2–8,5; содержание карбонатов и активной извести – 15–37 % и 10–15 % соответственно. Данные показатели являются оптимальными для выращивания винограда. Повторность опыта шестикратная.

Численность антибиотико-резистентных форм бактерии *P. polymyxa* П в ризосфере растений определяли каждые две недели (на 14-е, 28-е, 42-е, 56-е и 70-е сутки) по методике глубинного посева соответствующих разведений почвенной суспензии на питательную среду (гороховый агар) с добавлением раствора антибиотиков в указанной выше концентрации, повторность пятикратная. В контроле приведена численность природных штаммов микроорганизмов, резистентных к действию антибиотиков. Образцы почвы для этого варианта отбирали в ризосфере растений, корневая система которых не была бактериализована.

**Результаты исследований.** В подавляющем большинстве исследований, проведенных с целью изучения приживаемости штаммов микроорганизмов в ризосфере растений, для получения резистентных мутантов используется только один антибиотик. На наш взгляд, с учетом существования природных штаммов, устойчивых к действию антибиотиков, и с целью получения более точных результатов целесообразно использовать несколько антибиотиков.

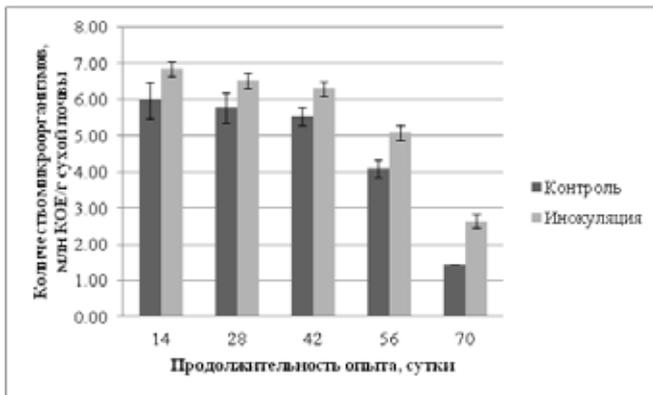


Рис. 1. Динамика численности стрептомицин-резистентных бактерий *P. polymyxa* П в ризосфере винограда

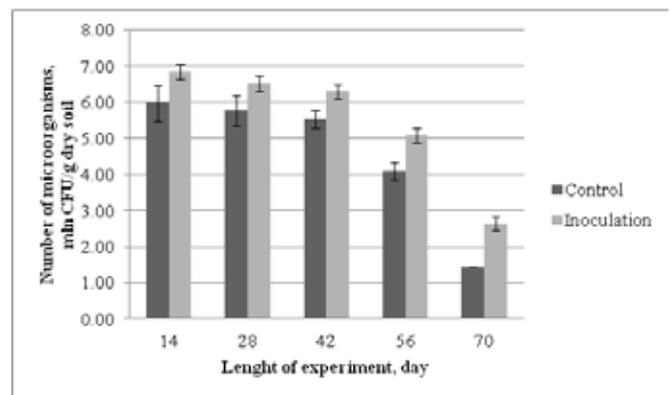


Fig. 1. Dynamics of the number of streptomycin-resistant bacteria *P. polymyxa* P in the rhizosphere of grape

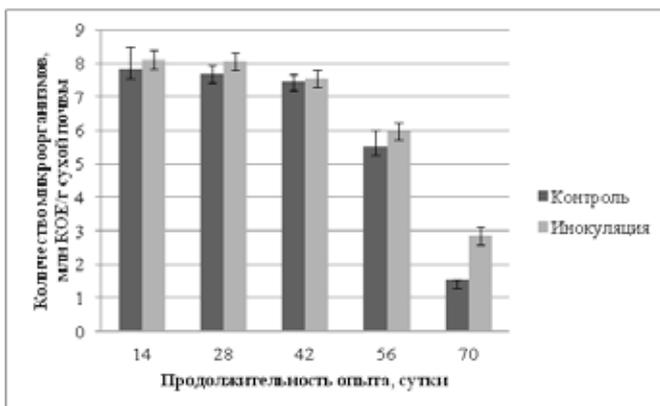


Рис. 2. Динамика численности ампициллин-резистентных бактерий *P. polymyxa* П в ризосфере винограда

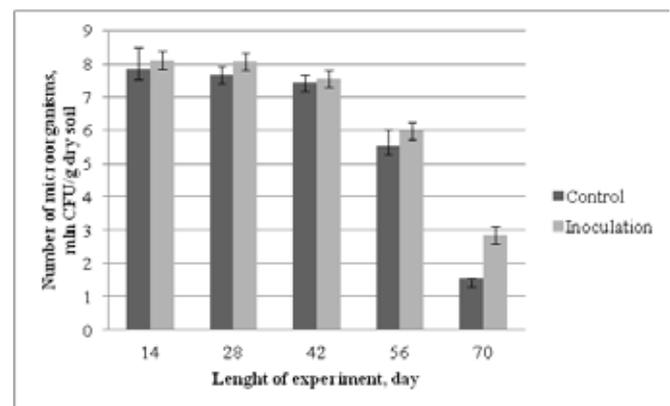


Fig. 2. Dynamics of the number of ampicillin-resistant bacteria *P. polymyxa* P in the rhizosphere of grape

Анализ проведенных исследований показал, что в ризосфере контрольных растений численность аборигенных бактерий, устойчивых к стрептомицину, колебалась в пределах 1,4–6,0 млн КОЕ/г сухой почвы (рис. 1). Наибольшее их количество учтено на 14-е сутки опыта – 6,0 млн КОЕ/г сухой почвы.

Необходимо отметить, что численность резистентных микроорганизмов мало изменялась в течение первых шести недель опыта и составила 5,8 и 5,5 млн КОЕ/г сухой почвы на 28-й и 42-й день соответственно. Только на 56-е сутки исследований отмечено снижение их количества: до 4,1 млн КОЕ, наименьшим оно было на 70-е сутки (1,4 млн КОЕ/г сухой почвы). Численность стрептомицин-резистентных форм *P. polymyxa* П в ризосфере бактеризованного растения достигала 2,6–6,8 млн КОЕ/г сухой почвы. Их количество в течение первых шести недель опыта колебалось в пределах 6,8–6,3 млн КОЕ, что на 12–14 % превышало число аборигенных бактерий, устойчивых к воздействию стрептомицина. Число стрептомицин-резистентных форм *P. polymyxa* П на 56-е и 70-е сутки опыта составляло 5,1 и 2,6 млн КОЕ/г сухой почвы (превышение контроля на 24 и 85 % соответственно).

Подобная тенденция отмечена и при исследовании динамики численности бактерий, устойчивых к ампициллину (рис. 2). Количество их в ризосфере

почти не изменялось в первые шесть недель опыта и колебалось в пределах 7,8–7,4 млн КОЕ/г сухой почвы (контрольный вариант) и 8,1–7,5 млн КОЕ (бактеризованные растения).

Число аборигенных бактерий, устойчивых к ампициллину, снижалось на восьмую неделю опыта (5,5 млн КОЕ/г сухой почвы), наименьшим оно было на 70-е сутки – 1,5 млн КОЕ. В ризосфере бактеризованных растений также отмечено уменьшение численности ампициллин-резистентных форм *P. polymyxa* П: до 6,0 и 2,9 млн КОЕ/г сухой почвы на 56-е и 70-е сутки соответственно. Необходимо отметить, что их количество незначительно отличалось от показателей контроля: только на 70-е сутки исследований оно в 1,8 раза превышало численность аборигенных бактерий.

Анализ полученных результатов показал, что численность аборигенных бактерий, устойчивых к канамицину, колебалась в ризосфере контрольных растений в течение опыта в пределах 6,7–2,4 млн КОЕ/г сухой почвы (рис. 3).

Результаты исследований показали, что численность канамицин-резистентных форм *P. polymyxa* П в ризосфере бактеризованных растений была наибольшей по сравнению с количеством ее стрептомицин- и ампициллин-резистентных форм. Так, в начале опыта она составляла 11,2 млн КОЕ/г сухой почвы (14-е

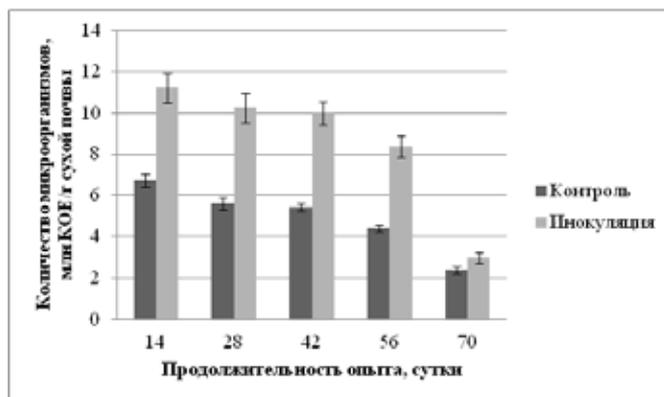


Рис. 3. Динамика численности канамицин-резистентных бактерий *P. polymyxa* П в ризосфере винограда

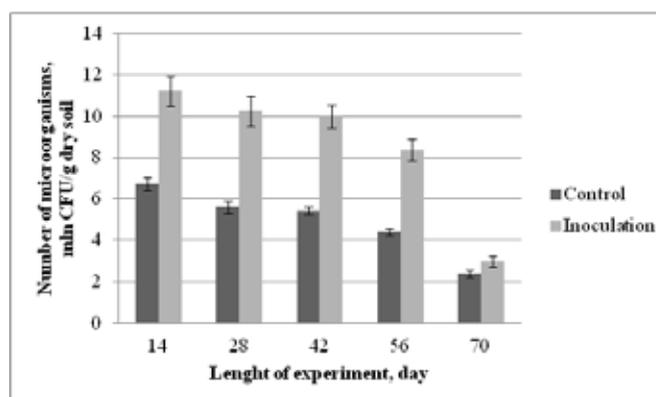


Fig. 3. Dynamics of the number of kanamycin-resistant bacteria *P. polymyxa* P in the rhizosphere of grape

сутки), что превышало значение контроля на 67 %; а на 28-е, 42-е и 56-е – 10,2; 10,0 и 8,4 млн КОЕ/г соответственно (превышение контроля на 82–89 %). Только на 70-е сутки опыта численность канамицин-резистентных форм *P. polymyxa* П незначительно превышала количество аборигенных штаммов, устойчивых к канамицину (на 25 %).

Итак, анализ полученных результатов свидетельствует о незначительной разнице между численностью стрептомицин- и ампициллин-резистентных форм *P. polymyxa* П и аборигенных бактерий, резистентных к действию указанных антибиотиков, в ризосфере виноградных саженцев. Только использо-

вание канамицин-резистентных форм *P. polymyxa* П четко подтвердило возможность развития этого штамма в ризосферной почве: их численность превышала значение контроля на 82–89 %.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают возможность развития бактерии *P. polymyxa* П в ризосфере винограда сорта Мускат белый на подвое Шасла × Берландиери 41 Б. С целью получения более точных результатов показана целесообразность использования не одного, а ряда антибиотиков для получения резистентных форм бактерий.

### Литература

1. Біотехнологія ризосфери овочевих рослин : монографія / за ред. В. П. Патики. Київ, 2015. 266 с.
2. Завалин А. А. Применение биопрепаратов при возделывании полевых культур // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 8. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-biopreparatov-pri-vozdelyvanii-polevyh-kultur>.
3. Клименко Н. М. Развитие *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 в ризосфере растений винограда // Сельскохозяйственная микробиология: межвед. темат. науч. сб. Чернигов : Сивер-Друк, 2014. Вып. 20. С. 12–14.
4. Клименко Н. Н. Изучение приживаемости штамма *Agrobacterium radiobacter* 204 в ризосфере виноградного растения // Инновации в науке : сб. ст. по материалам XLI Междунар. науч.-практ. конф. Новосибирск : Сыбак, 2015. № 1. С. 77–84.
5. Клименко Н. Н., Клименко А. Е., Клименко Н. И., Акчурин А. Г., Чайковская Л. А. Новое в технологии выращивания привитого винограда // Виноградарство и виноделие : межвед. темат. науч. сб. Одесса : ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова», 2013. Вып. 50. С. 107–111.
6. Круглов Ю. В., Лисина Т. О. Интродукция в почву *Bacillus megaterium* 501<sup>rif</sup>: факторы, влияющие на выживание, спорообразование и разложение гербицида прометрина // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 5. С. 107–112.
7. Мельничук Т. М., Патики В. П. Мікробіологічні основи інтродукції корисних мікроорганізмів у ризосферу помідора // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2014. № 46. URL : [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd\\_2014\\_4\\_8.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2014_4_8.pdf).
8. Мельничук Т. Н., Пархоменко Т. Ю., Лолойко А. А., Каменева И. А. Биохимические аспекты взаимодействия ризобактерий и растений // Universum. Химия и биология: электрон. науч. журн. 2014. № 7. URL : <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1429>.
9. Мельничук Т. М., Чайковська Л. О., Каменєва І. О., Якубовська А. І., Лолойко О. А. Фізіолого-біохімічні аспекти взаємодії біоагентів мікробних препаратів та рослин // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Сер. «Біологія». 2014. № 3. С. 134–138.
10. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда и др. ; пер. с англ. : в 3 т. М. : Мир, 1984. Т. 2. С. 29–31.



11. Петров В. Б., Чеботарь В. К. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства // Достижения науки и техники АПК. 2011. № 8. URL : <http://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskie-preparaty-bazovyy-element-sovremennyh-intensivnyh-agrotehnologiy-rastenievodstva>.
12. Петриченко В. Ф., Тихонович И. А., Коць С. Я., Пати́ка М. В. и др. Сільськогосподарська мікробіологія і збалансований розвиток агроєкосистем // Вісник аграрної науки. 2012. № 8. С. 5–11.
13. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяйственная биология. Сер. «Биология растений». 2011. № 3. С. 3–9.
14. Трєпач А. О. Характер життєдіяльності *Rhizobium radiobacter* на поверхні насіння і в зоні коріння рослин пшениці озимої // Сільськогосподарська мікробіологія. 2013. № 17. С. 31–38.
15. Egamberdieva D. Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions // Plant Soil Environ. 2011. № 57. P. 122–127.

### References

1. Biotechnology of vegetable plants rhizosphere : monograph / ed. by V. P. Patika. Kiev, 2015. 266 p.
2. Zavalin A. A. Application of biological products in crops field cultivating // Advances in science and technology of agro-industrial complex. 2011. № 8. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-biopreparatov-pri-vozdelyvanii-polevyh-kultur>.
3. Klymenko N. M. Development of *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 in the rhizosphere of grapes plants // Agricultural microbiology : interdepartmental thematic scientif. coll. Chernigov : Siver-Druk, 2014. Vol. 20. P. 12–14.
4. Klimentko N. N. Study of the *Agrobacterium radiobacter* 204 survival rate in grape plants rhizosphere // Innovations in science : digest of articles on materials of XLI Intern. scientif. and pract.conf. Novosibirsk : Sybak, 2015. № 1. P. 77–84.
5. Klimentko N. N., Klimentko A. E., Klimentko N. I., Akchuryrn A. G., Chaikovskaya L. A. New in grape growing cultivate technology // Viticulture and winemaking : interdepartmental thematic scientif. coll. Odessa : NSC “IWW of V. E. Tairov”, 2013. Vol. 50. P. 107–111.
6. Kruglov Yu. V., Lisina T. O. Introduction of *Bacillus megaterium* 501<sup>rif</sup> to soil: factors of affecting survival, sporulation and the decomposition of the herbicide prometryn // Agricultural Biology. 2014. № 5. P. 107–112.
7. Melnychuk T. M., Patika V. P. Microbiological basis of useful microorganisms introduction in the rhizosphere of tomato // Scientific reports of National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. 2014. № 46. URL : [http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd\\_2014\\_4\\_8.pdf](http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Nd_2014_4_8.pdf).
8. Melnichuk T. N., Parkhomenko T. Yu., Lolyko A. A., Kameneva I. A. Biochemical aspects of rhizobacteria and plants interaction // Universum: chemistry and biology : electron. scientif. journal. 2014. № 7. URL : <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1429>.
9. Melnychuk T. M., Chaikovskaya L. O., Kameneva I. O., Yakubovskaya A. I., Lolyko O. A. Physiological and biochemical aspects of microbial preparations bio-agents and plants interaction // Scientific note of Ternopol National Pedagogical University of Volodymyr Hnatiuk. Series “Biology”. 2014. № 3. P. 134–138.
10. Methods of general bacteriology / ed. by F. Gerhard et al. ; transl. from English. : in 3 vol. M. : Mir, 1984. Vol. 2. P. 29–31.
11. Petrov V. B., Chebotar V. K. Microbiological preparations – a basic element of modern agricultural technologies of intensive crop production // Advances in science and technology of agro-industrial complex. 2011. № 8. URL:<http://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskie-preparaty-bazovyy-element-ovremennyh-intensivnyh-agrotehnologiy-rastenievodstva>.
12. Petrichenko V. F., Tikhonovich I. A., Kots S. Y., Patika M. V. Agricultural microbiology and balanced development of agro-ecosystems // Bulletin of Agricultural Science. 2012. № 8. P. 5–11.
13. Tikhonovich I. A., Provorov N. A. Agricultural microbiology as a basis for sustainable agricultural production: fundamental and applied aspects // Agricultural biology. «Plant biology» series. 2011. № 3. P. 3–9.
14. Trepach A. O. The character of *Rhizobium radiobacter* life on the surface of winter wheat seeds and roots // Agricultural Microbiology. 2013. № 17. P. 31–38.
15. Egamberdieva D. Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions // Plant Soil Environ. 2011. № 57. P. 122–127.