

ІНСТИТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА
УКРАЇНЬСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

На правах рукопису

ЛОХОВА
Валентина Іванівна

УДК 576.8:631.847.21:631.86/633.12

**АЗОТФІКСУЮЧІ МІКРООРГАНІЗМИ РИЗОСФЕРИ ГРЕЧКИ
ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН**

Спеціальність: ~~03.00.07~~ – мікробіологія ^{06.00.09 Рослинництво}

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Київ – 1997



579
Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії біологічного азоту Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН та в лабораторії ґрунтової мікробіології Інституту землеробства УААН в 1985-1996 роках.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувач лабораторії біологічного азоту
Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН
ВОЛКОГОН Віталій Васильович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
завідувач відділу загальної та ґрунтової мікробіології
Інституту мікробіології та вірусології
ім. Д.К.Заболотного НАНУ
ІУТИНСЬКА Галина Олександрівна.

кандидат сільськогосподарських наук,
завідувач лабораторії технічної мікробіології
Південного філіалу Інституту сільськогосподарської
мікробіології УААН
ШЕРСТОБОЄВА Олена Володимирівна

Провідна установа: Харківський державний аграрний університет
ім. В.В.Докучаєва.

Захист дисертації відбудеться 17 ГРУДНЯ 1997 року о 10 годині на
засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 01.20.01 при Інституті землеробства
УААН.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту землеробства
УААН.

Відгуки на автореферат у двох примірниках, завірені печаткою,
просимо надсилати за адресою:

255205 Київська обл., Києво-Святошинський район, смт. Чабани,
Інститут землеробства УААН на ім'я вченого секретаря Спецради.

Автореферат розіслано

1997 року.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
кандидат сільськогосподарських наук

Л.О.Кравченко

ТВ - 30.020
1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність теми. Мікробіологічна фіксація азоту – екологічно чистий та економічно вигідний шлях забезпечення рослин зв'язаним азотом, при якому неможливо забруднення ґрунтів, водоймищ та повітря. Окрім цього, фіксація атмосферного азоту здійснюється переважно за рахунок енергії сонця і дозволяє запобігати великих витрат енергетичної сировини. Вважається, що цілковите опанування процесом мікробіологічної фіксації молекулярного азоту, дозволить вирішити проблему харчування в умовах швидкого зростання населення планети та зменшення запасів нафти, газу та вугілля (Мишустин, Шильникова, 1968, Патика з спів. 1993).

На сьогодні в ряді наукових центрів інтенсивно проводяться дослідження процесу фіксації атмосферного азоту в кореневій зоні небобових рослин та азотфіксуючих мікроорганізмів, які розвиваються в даній екологічній ніші. Початок цим працям поклали дослідження ряду зарубіжних вчених, які показали, що інтенсивність процесу азотфіксації набагато більша в ризосфері рослин в порівнянні з оточуючим ґрунтом (Rinaudo, 1971; Balandreau, Villemin, 1973; Dobereiner, Day, 1975). Проведені на той час дослідження у данному напрямку визначили появу в ґрунтовій мікробіології самостійного розділу, який одержав назву "асоціативна азотфіксація". Вважається, що в кореневій зоні більшості видів сільськогосподарських рослин інтенсивність зв'язування атмосферного азоту вища, ніж в ґрунті без рослин (Venkataraman, 1982). Проте ступінь дослідження процесу азотфіксації під певними сільськогосподарськими культурами різна. Значної уваги заслугоує питання про з'ясування можливостей використання асоціативних азотфіксаторів для інокуляції сільськогосподарських культур. Праці багатьох дослідників свідчать про збільшення врожайності рослин, поліпшення якості продукції від застосування цього агроприйому (Патика, 1987; Патика з спів., 1993; Okon, 1982; Reynders, Vlassak, 1982).

В більшості наукових центрів роботи по з'ясуванню чутливості рослин на інокуляцію проводились з такими культурами, як пшениця, ячмінь, рис, кукурудза, жито, просо та сорго. В відношенні гречки такі дослідження не проводились, що робить актуальним та необхідним пошук активних штамів азотфіксуючих бактерій та створення на їх основі бактеріального препарату під цю культуру.

Мета і завдання досліджень. Мета роботи – створення бактеріального препарату на основі асоціативних азотфіксаторів гречки, здатного підсилювати процес азотфіксації в кореневій зоні рослин та підвищувати продуктивність культури.

ЛНУ ім. В. Стефаника
АН України

Виходячи з мети досліджень, ставились основні завдання:

- вивчення активності азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки;
- дослідження комплексу асоціативних азотфіксуючих мікроорганізмів корневих сфер рослин гречки;
- виділення штамів, які характеризуються високою азотфіксуючою активністю, інтродукція їх в кореневу зону рослин гречки різних сортів та визначення їх ефективності;
- створення бактеріального препарату для підвищення активності азотфіксації в кореневій зоні гречки та збільшення продуктивності культури;
- вивчення ефективності препарату на різних сортах гречки у польових та виробничих дослідах в різних ґрунтово-кліматичних зонах України.

Наукова новизна. Показано, що в кореневій зоні гречки інтенсивно проходить процес азотфіксації. Вперше вивчено асоціативні азотфіксатори ризосфери та коренів гречки.

Вперше виділено штами, які характеризуються високою азотфіксуючою активністю в асоціації з рослинами гречки, здійснена інтродукція цих штамів у кореневу зону різних сортів гречки та вивчена реакція рослин на інокуляцію.

Встановлена наявність в кореневій зоні гречки азоспірил, виділено штам *Azospirillum brasilense* шт.18-2, який має високу азотфіксуючу активність та здатність підвищувати врожайність культури. На основі цього штаму створено бактеріальний препарат під гречку.

Практична цінність роботи. Застосування бактеріального препарату на основі *Azospirillum brasilense* шт.18-2 для передпосівної обробки насіння гречки дозволяє підвищувати урожайність культури на 15% і більше та поліпшувати якість продукції.

На захист виносяться основні положення:

- активність процесу азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки;
- таксономічний склад азотфіксуючих бактерій гречки;
- чутливість гречки на інокуляцію азоспірилами;
- дослідно-промисловий регламент виробництва бактеріального препарату на основі *Azospirillum brasilense* шт.18-2.

Декларація конкретного особистого внеску дисертанта в розробку наукових результатів, які виносяться на захист. Проведення лабораторних та польових досліджень, аналіз та теоретичне обґрунтування одержаної наукової інформації виконано дисертантом особисто або при його безпосередній участі. В проведенні досліджень та їх узагальненні доля автора – 70%.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на республіканській конференції “Симбіотрофні азотфіксатори та їх використання в сільському господарстві” (Чернігів, 1987); IV міжнародному симпозиумі по гречці (Орел, 1989); міжрегіональній науково-практичній конференції “Екологічні проблеми аграрного виробництва” (Дніпропетровськ, 1992); міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та спеціалістів (Чабани, 1996). Результати досліджень по темі дисертації доповідались та обговорювались на засіданнях лабораторії біологічного азоту та щорічних звітних сесіях Вченої ради Інституту сільськогосподарської мікробіології, на засіданнях методичної комісії Інституту землеробства УААН з питань землеробства та рослинництва (1996-1997 р.).

Публікації результатів досліджень. По матеріалах досліджень, поданих в дисертації, опубліковано 10 робіт.

Структура і обсяг роботи. Дисертація викладена на 110 сторінках машинопису, включає літературний огляд, об’єкти і методи досліджень та 5 експериментальних розділів, крім цього до складу дисертації входять: вступ, висновки, рекомендації виробництву, додаток та список літератури із 233 найменувань, в тому числі 150 іноземними мовами. Містить 46 таблиць і 12 малюнків.

Автор висловлює щире вдячність завідувачу проблемної лабораторії гречки Подільської державної аграрно-технічної академії, професору Алексєєвій О.С. та науковим співробітникам цієї лабораторії, а також науковим співробітникам Інституту сільськогосподарської мікробіології Надкерничній О.В., Мамчуру О.Е., Машко Н.О. за надану допомогу в проведенні досліджень.

ОБ’ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Об’єкти досліджень. Об’єктами досліджень служили азотфіксуючі мікроорганізми кореневої зони рослин гречки (*Fagopyrum*) сортів: Вікторія, Аеліта, Галєя, Космея, Рада, Крупинка, Омега, Кара-Даг, Зеленоквіткова-90, Подільська, Козачка, Чорноплідна, Подолянка.

Вивчення активності азотфіксації в кореневій зоні рослин проводили в умовах мікровегетаційних дослідів з контролем параметрів вологи та тепла, вегетаційних дослідів в теплиці (грунт – дерново-підзолистий, вміст гумусу – 0,7-1,0%, рН – 6,5) та польових дослідів на світло-сірому опідзоленому супісчаному ґрунті Козелецької сорто-випробувальної ділянки (Чернігівська область) (вміст гумусу – 1,0%, рН_{сол} – 6,2) та чорноземі вилугованому малогу-

мусному дослідного поля Подільської державної аграрно-технічної академії (вміст гумусу – 4,2-4,5%, $pH_{\text{сол}}$ – 6,8-7,2).

Вивчення ефективності застосування бактеріального препарату діазобактерину у виробничих дослідах проводили на чорноземі вилугованому дослідного поля Подільської державної аграрно-технічної академії і дерново-підзолистому пілувато-суспісчаному ґрунті дослідного господарства Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН (вміст гумусу – 0,7-1,0%, $pH_{\text{сол}}$ – 6,5), а також в господарствах Хмельницької області на: чорноземі опідзоленому на лесі (вміст гумусу – 5,2%, $pH_{\text{сол}}$ – 7,0), чорноземі вилугованому малогумусному (вміст гумусу – 4,3%, $pH_{\text{сол}}$ – 7,1); Тернопільської області на чорноземі типовому потужному малогумусному (вміст гумусу – 4,2%, $pH_{\text{сол}}$ – 7,4); Чернігівської області на дерново-підзолистому суспісчаному ґрунті (вміст гумусу – 0,9%, $pH_{\text{сол}}$ – 6,6) і Херсонської області на темно-каштановому солонцюватому ґрунті (вміст гумусу – 3,4%, $pH_{\text{сол}}$ – 6,5).

Мікробіологічні методи досліджень. Вивчення активності азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки проводили ацетиленовим методом в модифікації у непорушеному моноліті “ґрунт – рослина” об’ємом 350 см³ (Волкогон, 1984). Вміст ацетилену аналізували на газовому хроматографі “Chrom - 4” з полум’яно-іонізаційним детектором на колонці з β - β -оксидіпропіонітрилом. Температура термостату – 50°C, витрата газів (мл/хв): водень -30, азот -100, повітря - 500.

Із накопичувальних культур, які мали високу активність азотфіксації (не нижче 0,5 мг азоту на 1 мл середовища), методом розсіву на твердому поживному середовищі аналогічного складу виділяли чисті культури діазотрофів (Звягінцев, 1980).

Бактерії роду *Azospirillum* виділяли по методу Касераса (Caceres, 1982). Нітрогеназну активність чистих культур визначали у напіврідких середовищах Доберейнер та Ешбі за методом ацетилен-редукції в модифікації Умарова (1976) у посудинах, об’ємом 30 мл, з 10 мл середовища. Після 72 годин інкубації посудин із середовищем у термостаті ($t=28^\circ\text{C}$) вводили ацетилен на добу. Аналіз вмісту етилену проводили на газовому хроматографі “Chrom-4”.

Ідентифікацію виділених культур проводили на основі вивчення морфологічних (фазово-контрастна та електронна мікроскопія), культуральних та фізіолого-біохімічних ознак за визначником Бергі (Bergey’s, 1984) та оригінальними працями (Квасников, Писарчук, 1980; Tattand et al., 1978).

Амінокислотний склад зерна гречки вивчали на амінокислотному аналізаторі ААА-881. Зразки піддавали гідролізу з 6N HCl на протязі 24 годин до 105°C (Плешков, 1968).

Умови проведення вегетаційних та польових дослідів. Результати перевірки ефективності штамів діазотрофів, суспензії та препаративних форм *A. brasilense* шт. 18-2, одержані в умовах вегетаційних та польових дослідів. Для

постановки вегетаційних дослідів з гречкою використовували посудини з 5 кг ґрунту (дерново-підзолистий ґрунт дослідного господарства ІСГМ (характеристика приведена вище). В посудини вносили суміш Прянишнікова без азоту. Азотні добрива вносили окремо із розрахунку 13 мг/кг ґрунту. Досліди проводили у 5-кратному повторенні.

Чутливість гречки на інокуляцію азоспірилами *A. brasilense* шт.18-2 та іншими діазотрофами вивчали також в умовах польових дослідів на чорноземі вилугованому та світло-сірому суспісчаному ґрунті (характеристики приведені вище). Досліди ставили у 4-кратному повторенні за схемою:

1. $N_{30}P_{30}K_{30}$ – фон.
2. Фон + інокуляція.

Із добрив використовували аміачну селітру, суперфосфат, хлористий калій.

Площа облікової ділянки 10 м² і 25 м² в залежності від дослідів. Насіння гречки обробляли суспензією штаму *A. brasilense* шт.18-2 або різними формами препарату в день посіву.

Економічну ефективність передпосівної інокуляції гречки проводили згідно методичних рекомендацій (Март'янов, 1996).

Математичну обробку одержаних даних проводили використовуючи дисперсійний та кореляційний аналізи (Доспехов, 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

АЗОТФІКСУЮЧІ МІКРООРГАНІЗМИ ТА АКТИВНІСТЬ АЗОТФІКСАЦІЇ В КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ГРЕЧКИ.

Активність процесу азотфіксації в кореневій зоні гречки за нашими спостереженнями досягає значних розмірів і не поступається показникам, відміченим у ризосфері таких культур, як ярий ячмінь та озима пшениця. При вирощуванні цих культур у вегетаційному досліді відмічені найбільш високі показники активності азотфіксації в кореневій зоні гречки. Необхідно відмітити, що нітрогеназна активність під гречкою перевищує показники ґрунту без рослин у 2-3 рази (табл. 1).

В ґрунті без рослин показники азотфіксуючої активності практично не змінювались у часі, тоді як під гречкою (так як і під іншими видами рослин) показники в динаміці змінювались, що свідчить про тісний зв'язок процесу азотфіксації з рослиною.

Ці спостереження започаткували вивчення в наших дослідженнях нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин гречки і мікроорганізмів, які забезпечують цей процес.

З кореневих сфер гречки виділено понад 600 ізолятів, які мали високу азотфіксуючу здатність. Вивчення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей чистих культур дозволило віднести їх до таких

Таблиця 1

Активність азотфіксації в кореневій зоні різних видів рослин
(грунт дерново-підзолистий).

Вид рослини	Активність азотфіксації, мкг N/посудину/годину		
	Дні після посіву		
	30	50	70
Ярий ячмінь	0,323 ± 0,019	0,478 ± 0,026	0,793 ± 0,078
Озима пшениця	0,319 ± 0,016	0,328 ± 0,035	0,315 ± 0,014
Гречка	0,305 ± 0,013	0,580 ± 0,023	0,886 ± 0,028
Грунт без рослин	0,246 ± 0,023	0,260 ± 0,023	0,264 ± 0,026

таксономічних підрозділів: *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp.

Вивчення активності азотфіксації чистих культур дозволило встановити найбільш високі значення азотфіксації у штамів азоспірил – від 5,6 до 10,8 мкг азоту на 1 мл середовища за добу в залежності від штаму. Інші культури мали активність на порядок нижчу.

В зв'язку з тим, серед вивчених культур азоспірили мали найбільшу азотфіксуючу активність, ми також оцінювали їх активність в асоціації з рослинами гречки (табл. 2).

Таблиця 2

Азотфіксуюча активність штамів діазотрофів в асоціації
з рослинами гречки (польовий дослід).

Штами	Азотфіксація, мкг азоту на м ² за годину
Контроль	132,0
<i>Azotobacter chroococum</i> шт.16	132,0
<i>Azospirillum brasilense</i> шт. 233-24	501,4
<i>Azospirillum brasilense</i> шт. 18-2	891,7
<i>Azospirillum brasilense</i> шт. 233-63	527,8
Неідентифікований шт.2	63,9

НСР₀₅ – 117,4

Дані табл.2 свідчать, що штам *A. brasilense* 18-2 в асоціації з рослинами гречки сорту Аеліта забезпечує найбільш високу активність азотфіксації – 891,7 мкг азоту на м² за годину, що у 1,5 рази вище, ніж у інших штамів та у 6,7 разів вище, ніж в контролі. Ці дані свідчать про перспективність штаму *A. brasilense* шт.18-2 як потенційного інокулянту гречки.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що рівень активності азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки суттєво перевищує відповідний показник в ґрунті без рослин. Угрупування азотфіксуючих бактерій кореневої зони гречки представлена різними таксономічними підрозділами (*Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp.). Найбільш активними азотфіксаторами серед них є *Azospirillum brasilense*. Інтродукція азоспірил в кореневу зону гречки сприяє підвищенню активності асоціативної азотфіксації.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ІНОКУЛЯЦІЇ ГРЕЧКИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ШТ.18-2.

Дослідження інтродукції штаму *Azospirillum brasilense* 18-2 в кореневу зону рослин гречки ми почали з вивчення ефективності цього штаму в порівнянні із стандартним штамом *A. brasilense* 107 у вегетаційних та польових дослідах на світло-сірому опідзоленому ґрунті. Для інокуляції насіння використовували 3-х добову культуру бактерій, титр якої складав біля $6 \cdot 10^9$ клітин у 1 мл суспензії, або 200 тис. клітин на 1 насіння. В таблиці 3 наведені результати досліджень із інокуляції гречки сорту Аеліта в одному з польових дослідів.

Таблиця 3

Ефективність передпосівної обробки насіння гречки сорту Аеліта
штамами *A. brasilense* 18-2 і 107
(польовий дослід, світло-сірий опідзолений ґрунт)

Варіанти дослідів	Урожайність, ц/га	Збільшення урожайності	
		ц/га	%
Інокуляція штамом <i>A. brasilense</i> 18-2	10,6	1,6	17,7
Інокуляція штамом <i>A. brasilense</i> 107	9,6	0,6	6,4
Контроль – без інокуляції	9,0	–	–

НСР₀₅ – 0,6

Передпосівна обробка насіння гречки штамом в умовах польових дослідів забезпечує збільшення урожайності на 17,7-18,1% в залежності від дослідів.

Вплив передпосівної обробки насіння гречки азоспірилами нами вивчався також на багатьох сортах гречки. Основна робота проводилась на чорноземі вилугованому малогумусному дослідного поля Подільської державної аграрно-технічної академії (табл. 4).

Ефективність інокуляції рослин гречки різних сортів *A.brasilense* 18-2
(польовий дослід, 1988 р.).

Сорти	Варіанти дослідів	Урожайність,	Збільшення урожайності		Азотфіксуюча активність, мкг азоту на м ² .год
		ц/га	ц/га	%	
Галея	контроль	14,5	–	–	113
	інокуляція	16,9	2,4	16,5	154
Рада	контроль	13,7	–	–	140
	інокуляція	14,8	1,1	8,0	179
Аеліта	контроль	14,0	–	–	128
	інокуляція	15,7	1,7	12,1	157
Вікторія	контроль	8,3	–	–	125
	інокуляція	16,9	8,6	103,6	375
Чорноплідна	контроль	10,4	–	–	180
	інокуляція	11,9	1,5	14,4	183
Подолянка	контроль	9,5	–	–	не визначалась
	інокуляція	15,0	5,5	57,9	не визначалась

НСР₀₅ – 2,02

НСР₀₅ – 98,0

При аналізі представлених в табл. 4 даних, необхідно відмітити, що найбільш чутливий на інокуляцію є сорт Вікторія, який збільшує урожайність в порівнянні з контролем на 8,6 ц/га або на 103,6%. Достовірне збільшення урожайності одержано від інокуляції сорту Галея – 2,4 ц/га або 16,5% та сорту Подолянка – 5,5 ц/га або 57,9%. У інших сортів спостерігається тенденція до збільшення урожайності.

Вивчення в польових умовах азотфіксуючої активності в кореневій зоні рослин досліджуваних сортів гречки дозволило встановити достовірне її збільшення (в 3 рази) тільки по сорту Вікторія. У інших сортів спостерігається тенденція до її збільшення (табл.4).

Структура урожаю рослин та технологічні властивості зерна проаналізовані окремо по кожному сорту (табл.4). Слід відзначити, що урожайність в результаті передпосівної обробки насіння гречки бактеріями *A.brasilense* шт.18-2 збільшується, зокрема у сорту Вікторія, за рахунок гілок 2-го порядку, числа суцвіть і в цілому числа зерен на рослині. При використанні дисперсійного аналізу було визначено суттєвий вплив фактору сорту майже на всі показники. Фактор інокуляції має менший вплив, але його дія вплинула в цілому на урожайність та продуктивність рослин, кількість суцвіть та їх

продуктивність, кількість виповнених зерен та кількість зерен на рослині. Ефект від дії двох факторів відбився в цілому на урожайності і, зокрема, на продуктивності суцвіть, кількості зерен у суцвіттях та масі 1000 зерен.

Інтродукція штаму *A.brasilense* 18-2 в кореневу зону різних сортів гречки забезпечує не тільки збільшення урожайності, а й змінює якість зерна гречки, зокрема його амінокислотний склад. Але необхідно відмітити, що цей показник залежить від сорту. Так, в зерні гречки сорту Вікторія із незамінних амінокислот збільшили свій вміст тільки валін на 12,0% та треонін на 168,6%, із заміennих амінокислот: кількість аланіну зросла на 28,2%, аргініну на 15,5%, гістидину на 185,9%. Слід зазначити, що по цьому сорту одержано значне збільшення урожайності (табл. 4), тоді як амінокислотний склад змінився незначно.

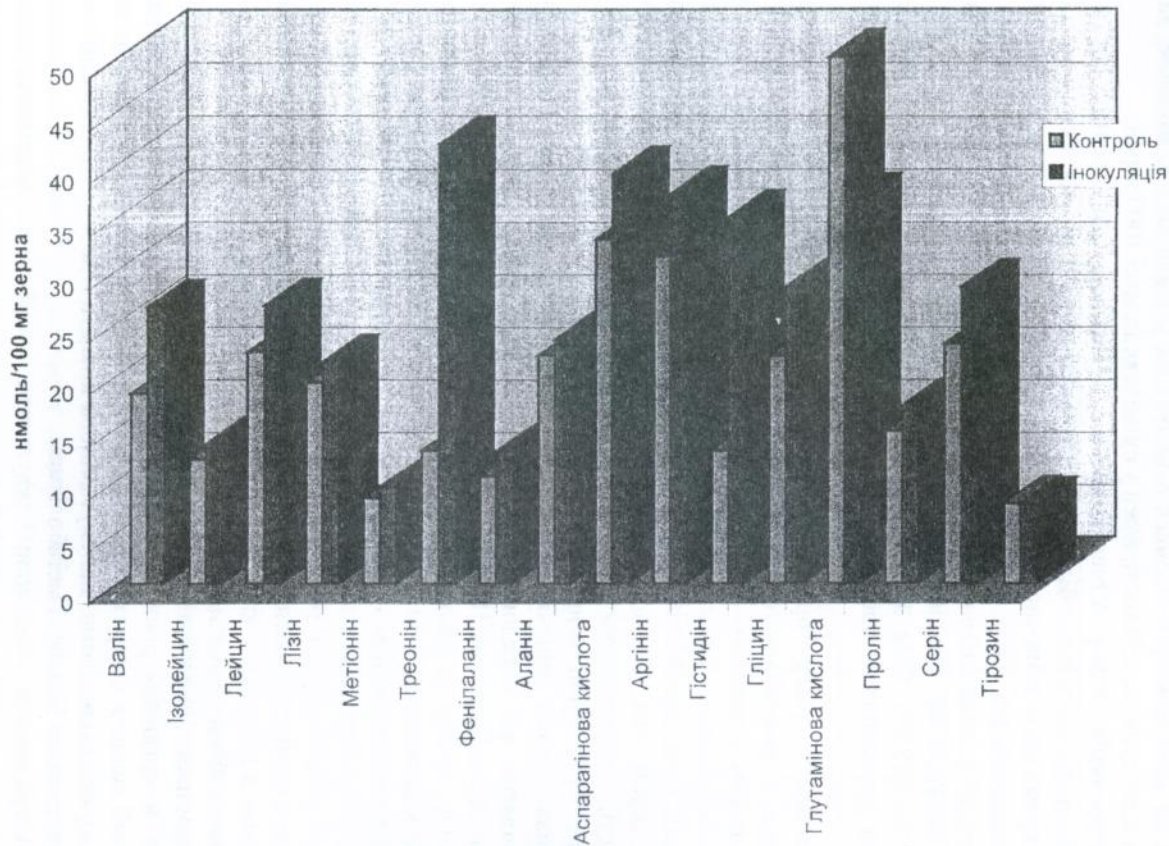
Особливу увагу привертає склад амінокислот в зерні гречки Чорноплідна, в якій збільшується вміст кожної із 7 незамінних амінокислот, особливо валіну і треоніну (відповідно на 45,5% і 228,3%) (мал. 1). Вміст заміennих амінокислот характеризується збільшенням кількості майже всіх амінокислот, крім глутамінової, особливо гістидіну (на 173,6%), гліцину (на 30,3%) і серіну (на 23,8%). По даному сорту не отримано збільшення урожайності, спостерігається тільки тенденція до її підвищення, але зафіксовано переконливі зміни в якості зерна.

Аналіз даних амінокислотного складу гречки різних сортів дозволив нам встановити, що передпосівна обробка насіння гречки азотфіксуючими бактеріями *A.brasilense* шт.18-2 у всіх сортів, крім сорту Аеліта, збільшує рівень валіну, лізину та треоніну. В меншій мірі спостерігається підвищення вмісту таких незамінних амінокислот, як ізолейцину та лейцину у гречки сортів Вікторія, Галея, Чорноплідна.

Відмічені спостереження свідчать про те, що при інокуляції амінокислотний пул в насінні представлений в основному білковими амінокислотами, оскільки незамінні амінокислоти, як правило, включаються в білки і в меншій мірі присутні в клітинах у вільному стані (Meister, 1965). Це свідчить про те, що інокуляція збільшує поживну цінність білків зерна гречки.

Крім цього, інокуляція насіння призводить до підвищення метаболічної активності в організмі рослин, про що свідчить інтенсивне використання глутамінової кислоти в сортах, представлених в табл. 4 (крім сортів Аеліта та Подолянка), оскільки відомо, що глутамінова кислота є зв'язуючим ланцюгом між вуглеводним та білковим метаболізмом.

Підсумовуючи одержані результати необхідно відмітити, що інтродукція штаму *A.brasilense* 18-2 в кореневу зону різних сортів гречки збільшує урожайність та вміст цінних в харчуванні людини незамінних амінокислот.



Мал.1. Вплив передпосівної обробки насіння гречки сорту Чорноплідна *A. brasiliense* шт. 18-2 на амінокислотний склад зерна.

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ І ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ПЕРЕДІЮСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ ГРЕЧКИ.

Вищеприведені дані базуються на дослідах з інокуляції гречки суспензією азоспірил, виготовленої в лабораторних умовах. Для виходу у виробництво необхідна розробка технологічного регламенту промислового напрацювання препарату.

В ході проведених досліджень, було відпрацьоване середовище для вирощування азоспірил такого складу (г/л):

Маляса	– 20,0
Кукурудзяний екстракт	– 20,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	– 2,0
K_2HPO_4	– 0,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	– 0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,3
CaCO_3	– 1,0
вода водопровідна до 1000,0	
pH	– 6,8-7,2

Це середовище дозволяє досягти титру клітин азоспірил в суспензії біля 7 млрд. в 1 мл.

Крім отримання рідкого інокулому, схема виробництва бактеріального препарату включає підбір оптимального субстрату-носія для бактерій. Найбільш прийнятний з них є торф (Хотянович, 1991). На сьогодні гостро стоїть питання виробництва торф'яних наповнювачів для біопрепаратів в Україні, оскільки виробництво стерильного торфу зосереджено в Росії та Білорусії. В Чернігівській області є декілька родовищ торфів, які мають різні ботанічні характеристики: очеретяно-осокові, осокові, осоково-очеретяні. За нашими даними для виробництва препаратів на основі азоспірил можуть бути використані торфи з торфо-масиву “Убідське” Корюківського району, торфо-масиву “Замглай-центральный” Ріпкинського району та торфо-масиву “Гнилушське” Чернігівського району.

Внесення інокулому з титром 3 млрд./мл до стерильного торфу (табл. 5) дозволяє через 2 тижні зберігання препарату досягти титру 9,2 млрд/г торфу, а після 6 місяців зберігання чисельність клітин дорівнює 1 млрд/г торфу, що відповідає вимогам до препаратів (Хотянович, 1991).

Нами розроблені лабораторний та дослідно-промисловий регламенти для виробництва бактеріального препарату, який одержав назву “діазо-бактерин”.

Вплив строку зберігання на життєдіяльність клітин
A.brasilense шт.18-2 в торфі (млрд/г торфу)

Штам	Строки зберігання			
	2 тижні	2 місяці	3 місяці	6 місяців
A.brasilense 18-2	3,0 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,4

Необхідними умовами виробництва біопрепаратів є відсутність токсичності використаного штаму та субстрату-носія. Штам A.brasilense 18-2 і торф'яна форма препарату на основі A.brasilense шт.18-2 пройшли токсикологічну оцінку в Українському науковому гігієнічному центрі. Результати токсикологічної оцінки препарату дозволяють рекомендувати його для реєстрації в Державній міжвідомчій комісії України у справах випробування засобів захисту та регуляторів росту рослин та добрив.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ AZOSPIRILLUM BRASILENSE ШТ.18-2

Розроблені експериментальні партії препарату діазобактерину (рідка та торф'яна форми) випробовували в різних ґрунтово-кліматичних зонах України на районованих й перспективних сортах гречки.

Ефективність рідкої форми препарату нами вивчалась у виробничих посівах на гречці сорту Вікторія в Хмельницькій області на чорноземі опідзоленому та сорти Аеліта і Крупинка в Тернопільській області на чорноземі типовому потужному малогумусному (табл. 6).

Таблиця 6

Ефективність рідкої форми препарату у виробничих дослідах з гречкою різних сортів.

Місце проведення дослідів	Сорт гречки	Варіанти дослідів	Площа, га	Урожайність, ц/га	Збільшення урожайності	
					ц/га	%
Хмельницька обл., Чемеровецький район колгосп ім.Кірова	Вікторія	контроль	17,0	18,8	—	—
		інокуляція	2,0	22,5	3,7	19,7
Тернопільська обл., ВО "Гречка" колгосп "Іскра"	Аеліта	контроль	5,0	25,6	—	—
		інокуляція	40,0	27,7	2,1	8,2
	Крупинка	контроль	20,0	24,0	—	—
		інокуляція	45,0	25,6	1,6	6,7

Результати польових та виробничих досліджень випробування рідкої форми препарату на основі *A.brasilense* шт.18-2, дозволяють зробити висновок, що збільшення урожайності складає 1,6-3,7 ц/га в залежності від сорту гречки та ґрунтово-кліматичних умов вирощування. Слід зазначити, що рідка форма препарату має невеликий строк зберігання і не завжди може бути зручною в сільськогосподарському виробництві.

Ефективність торф'яної форми препарату вивчалась у виробничих посівах на гречці сорту Вікторія в Хмельницькій області, Зінківському районі на чорноземі вилугованому малогумусному (табл. 7).

Таблиця 7

Ефективність препарату у виробничих дослідах з гречкою сорту Вікторія.

Місце проведення дослідів	Варіанти дослідів	Площа, га	Урожайність, ц/га	Збільшення урожайності	
				ц/га	%
Хмельницька обл., Зінківський район колгосп ім.Артема	контроль	15,0	9,0	–	–
	інокуляція	2,0	10,8	1,8	20,0

В результаті інокуляції насіння гречки сорту Вікторія одержано збільшення урожайності на 1,8 ц/га (20,0%).

Вплив торф'яної форми препарату на урожайність гречки сортів Галія і Космея нами вивчався також в умовах зрошування на темно-каштановому ґрунті Херсонської області, Іванівського району. При застосуванні діазобактерину гречка сорту Космея збільшила урожайність на 6,2 ц/га, сорту Галія – на 3,0 ц/га.

Отримані в польових та виробничих дослідах результати випробувань торф'яної форми препарату на основі *A.brasilense* 18-2 показують, що в залежності від сорту гречки та ґрунтово-кліматичних умов вирощування збільшення урожайності складає від 1,1 ц/га до 3,0 ц/га.

Торф'яна форма препарату та строк його зберігання (до 6 місяців) дозволяють значно раніше та на більш велику відстань транспортувати препарат.

ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ ГРЕЧКИ.

Аналіз економічної ефективності вирощування гречки показав, що найвищі її показники отримані в варіанті, де застосовувався бактеріальний препарат діазобактерин. Чистий прибуток складає 255,2 грн. з 1 га посівів, рентабельність – 60,0%, окупність – 1,6 грн., тоді як на контролі відповідно 180,0 грн., рентабельність – 42,9%, окупність – 1,4 грн.

1. Показано, що рівень активності азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки в 2 і більше разів вище відповідного показника в ґрунті без рослин і не поступається показникам, відміченим у ризосфері ярового ячменю та озимої пшениці.
2. З ризосфери гречки виділено понад 600 ізолятів бактеріальних культур, які мали високу азотфіксуючу активність. Вони представлені різними таксономічними підрозділами, домінуючими з яких є: *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*.
3. Встановлено, що найбільш високі показники азотфіксації (до 10 мкг азоту і більше на 1 мл середовища за добу в залежності від штаму) мають бактерії роду *Azospirillum*.
4. Штам *A.brasilense* 18-2 в асоціації з рослинами гречки сорту Аеліта забезпечує найбільш високу активність азотфіксації до 890 мкг азоту на м² за годину, що у 1,5 рази вище, ніж у інших штамів та у 6 разів вище показників контролю.
5. Інтродукція штаму *Azospirillum brasilense* 18-2 в кореневу зону різних сортів гречки позитивно впливає на структуру врожаю та його якість, збільшує на 15-20% і більше продуктивність рослин.
6. На основі високоефективного штаму *A.brasilense* 18-2 розроблено лабораторний та дослідно-промисловий регламенти випуску рідкої та торф'яної форм біопрепарату діазобактерину. Прибавка врожаю гречки від інокуляції зазначеним біопрепаратом складає 1,1-3,0 ц/га в залежності від сорту та ґрунтово-кліматичних умов вирощування.
7. Встановлено, що більш технологічною і ефективною при використанні є торф'яна форма. Термін зберігання її складає до 6 місяців, рідкої – до 10 діб.
8. Економічний ефект від передпосівної обробки насіння гречки біопрепаратом діазобактерином на 1 га посівів складає 75,2 грн., рентабельність збільшується на 17,1%.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.

1. Виробництву пропонується дослідно-виробничий регламент одержання біопрепарату на основі *Azospirillum brasilense* шт.18-2 в торф'яному субстраті.
2. Для підвищення урожайності гречки та поліпшення якості продукції рекомендується передпосівна інокуляція насіння біопрепаратом діазобактеріном на основі *Azospirillum brasilense* 18-2.
3. Передпосівна бактерізація насіння гречки здійснюється в день посіву чи за добу до нього. Застосування рідкої препаративної форми передбачає використання 300 мл бактеріальної суспензії, торф'яної – 200 г препарату на гектарну норму насіння.

РОБОТИ, ОПУБЛКОВАНІ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Malceva N.N., Nadkernichnay E.V., Lochova V.I. The buckwheat associative nitrogen fixation. // Proceedings of the 4th International symposium of buckwheat. – Orel. – 1989. – P. 431-437.
2. Лохова В.І., Алексєєва О.С. Препарат діазорф сприяє підвищенню врожайності гречки. // Міжвідомчий збірн. наук. робіт “Вчені-аграрники – сільськогосподарському виробництву”. – Чернівці. – 1993. – С. 145-146.
3. Лохова В.І. Біологічна азотфіксація в кореневій зоні рослин гречки. // Праці міжнар. конфер. “Наслідки наукових пошуків молодих вчених-аграрників в умовах реформування АПК” (Чабани, 1996). – Част. I. – Чабани. – 1996. – С.24.
4. Алексєєва О.С., Рарок В.А., Лохова В.І. Використання препарату діазобактерину для одержання екологічно чистого високоякісного зерна гречки. // Збірн. наук. праць Уманської с.-г. академії. Київ. – 1997. – С.39-42.
5. Волкогон В.В., Лохова В.І. Азотфіксуючі мікроорганізми кореневої зони рослин гречки. // Збірник наук. праць Інституту землеробства УААН. – вип.2. – 1997. – С.79-81.
6. Рекомендації по ефективному застосуванню препаратів азотфіксуючих та фосформобілізуючих бактерій у сучасному ресурсозберігаючому землеробстві. // Київ.: ЦНТІ. – 1997. – 20 с.
7. Бактеріальний препарат діазобактерин. // Інформ. листок. – Чернівці.: ЦНТІ. – 1997. – 3 с.
8. Надкерничная Е.В., Лохова В.И., Борщ В.Т., Банько В.Н. Активность азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы в ризосфере и на корнях различных сортов гречихи. // Республ. конфер. “Симбиотрофные азотфиксаторы и их использование в сельском хозяйстве” (Чернигов, 1987) – К.: 1987. – С.82.

9. Лохова В.И., Бочкарев А.Н., Марусяк И.М. Применение препарата азотфиксирующих бактерий под гречиху. // Межрегион. науч-практ. конфер. "Экологические проблемы аграрного производства" (Днепропетровск, 1992). – Днепропетровск: 1992. – С.145.
10. А.С. 1538469 СССР, МКИ С 05 11/08, С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Azospirillum brasilense* для производства бактериального удобрения под гречиху. / В.И.Лохова, Е.В.Надкерничная (СССР) – №4223845. – Заявлено 2.11.1987. Опублик. 15.09.1989. Бюл. №9. – 5с.

АННОТАЦИЯ

Лохова В.И. Азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы гречихи и их влияние на продуктивность растений. – Рукопись
Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.07 – микробиология. Институт земледелия УААН, Чабаны – 1997.

Изучена активность азотфиксации в корневой зоне растений гречихи. Исследован таксономический состав азотфиксаторов в ризосфере и корнях гречихи. Среди выделенных культур особый интерес представляют бактерии рода *Azospirillum*. Интродукция активного штамма *A. brasilense* 18-2 в корневую зону растений гречихи разных сортов способствует увеличению урожайности гречихи и изменению качества белка в зерне гречихи. Разработан опытно-промышленный регламент для промышленной наработки препарата. Создан бактериальный препарат для предпосевной обработки семян гречихи, который увеличивает урожайность этой культуры на 1,1-3,0 ц/га, согласно исследованиям, проведенным в различных почвенно-климатических зонах Украины.

Ключевые слова: азотфиксация, ассоциация, гречиха, азоспириллы, инокуляция, бактериальный препарат.

АНОТАЦІЯ

Лохова В.І. Азотфіксуючі мікроорганізми ризосфери гречки та їх вплив на продуктивність рослин. – Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеню кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 – микробиологія. Інститут землеробства УААН, Чабани – 1997.

Вивчено активність азотфіксації в кореневій зоні рослин гречки. Досліджено таксономічний склад азотфіксаторів в ризосфері і корінні гречки. Серед виділених культур особливий інтерес представляють бактерії роду *Azospirillum*. Інтродукція активного штаму *A. brasilense* 18-2 в кореневу зону

рослин гречки різних сортів забезпечує збільшення урожайності гречки та змінення якості білку в зерні гречки. Розроблений дослідно-промисловий регламент для виробничого напрацювання препарату. Створений бактеріальний препарат для передпосівної обробки насіння гречки, який збільшує урожайність цієї культури на 1,1-3,0 ц/га згідно дослідженням, проведеним в різних ґрунтово-кліматичних зонах України.

Ключові слова: азотфіксація, асоціація, гречка, азоспірили, інокуляція, бактеріальний препарат.

ABSTRACT

Lochova V.I. Nitrogen-fixing microorganisms of the rhizosphere buckwheat and their influence on productivity of the plant. – Manuscript.

Thesis for a Candidate's degree (Agriculture) on speciality 03.00.07 – microbiology. The Institute of Agriculture UAAS, Chabany, 1997.

The nitrogen - fixing activity in the buckwheat root zone has been studied. The taxonomic structure of the nitrogen fixator in buckwheat root spheres has been investigated. The bacteria of Azospirillum genus are of special interest among them. Inoculation of active strains A.brasilense 18-2 in buckwheat root zone of different cultivars promotes the increasing of plant productivity and protein content in buckwheat grain.

The experimental-industrial technology for receiving preparation has been developed. Bacterium preparation for pre-sowing treatment of buckwheat, which increases the crop capacity on 1.1-3.0 c/ga, according to reseachs in different soil-climatic zone Ukraine has been created.

Key words: nitrogen-fixing, association, buckwheat, azospirillas, inoculation, bacterium preparation.

AB 38.826