

ІНСТИТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

На правах рукопису

**ВОЛКОГОН**  
**Віталій Васильович**

УДК 576.8.579.64.631.8/86

**ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ АЗОТФІКСУЮЧИХ АСОЦІАЦІЙ БАКТЕРІЙ З  
ТРАВАМИ ТА РЕГУЛЮВАННЯ ЇХ АКТИВНОСТІ**

03.00.07 – мікробіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора сільськогосподарських наук



Київ – 1997



Дисертацією є рукопис

Робота виконана в лабораторії біологічного азоту Інституту сільськогосподарської мікробіології та лабораторії ґрунтової мікробіології Інституту землеробства УААН.

Науковий консультант – доктор біологічних наук, професор, академік УААН Пати́ка Володи́мир Пили́пович, директор Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Анти́пчук Аде́ль Фе́дорівна, провідний науковий співробітник Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К.Заболотного

доктор біологічних наук, професор Голо́вко Ера́ст Анато́лійович, завідувач відділу Центрального ботанічного саду НАН України

доктор сільськогосподарських наук Кани́вець Ві́ктор Іва́нович, завідувач лабораторії Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН

Провідна установа – Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м.Київ.

Захист дисертації відбудеться “ 10 ” ЛЮТОГО 1998 року о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.20.01 при Інституті землеробства УААН за адресою: 252205, Київська область, Києво-Святошинський район, смт.Чабани, Інститут землеробства УААН

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту землеробства УААН

Автореферат розісланий “ 8 ” СІЧНЯ 1998 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат с.-г. наук

Л.О.Кравченко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Мікробіологічна фіксація атмосферного азоту є єдиним екологічно чистим шляхом постачання рослинам зв'язаного азоту, при якому принципово неможливе забруднення ґрунтів та водоймищ. Крім того, біологічний азот недорогий, оскільки на активізацію діяльності азотфіксуючих мікроорганізмів потрібні невеликі енергетичні затрати. Тому значення азотфіксуючих бактерій в формуванні і розвитку біоценозів важко переоцінити.

Роль різних груп азотфіксаторів в азотному балансі ґрунтів та живленні рослин азотом вивчена неоднаково. Добре відоме значення бульбочкових бактерій, які асимілюють молекулярний азот атмосфери в симбіозі з бобовими рослинами. Бобово-ризобіальна система здавна використовується в практиці сільського господарства для поліпшення азотного балансу ґрунту. Однак бульбочкові бактерії інфікують тільки бобові культури, причому вибірковість взаємодії висока і допускає застосування певних видів бактерій для конкретних культур. Вказана особливість суттєво обмежує сферу ефективного використання бульбочкових бактерій. Зокрема, їх вплив на зернові та інші небобові культури в сівозміні виявляється на наступний рік після збирання врожаю бобових (Мишустин, Шильникова, 1968; Берестецкий с соавт., 1984; Патица з співр., 1993). Тому бажано мати можливість безпосереднього впливу на небобові рослини з метою підвищення врожайності. Найбільшої уваги заслуговують шляхи управління мікроорганізмами кореневої зони рослин. Цей напрямок розробляється в усіх провідних країнах останні 25-30 років і одержав назву асоціативної азотфіксації (Hardy et. al., 1973). На сьогодні досягнуто певних успіхів в розробці ряду питань даного наукового розділу (Умаров, 1986; Патица з співр. 1993). Однак ряд принципових питань залишаються не вирішеними. Це, зокрема, питання специфічності азотфіксуючих бактерій до вищої рослини і механізмів, що лежать в її основі. Слабо вивченою є аутоекologia асоціативних азотфіксаторів. Не існує також єдиної точки зору щодо шляхів підсилення активності процесу асоціативної азотфіксації.

Вивчення основних елементів механізму формування азотфіксуючих асоціацій "азотфіксуючі бактерії – небобові рослини" дозволить за рахунок активного впливу на їх утворення та функціонування підвищити урожайність культур та долю біологічного азоту в рослинній продукції при одночасному забезпеченні сучасних вимог щодо охорони навколишнього середовища.

**Мета роботи і завдання досліджень.** Мета досліджень – з'ясувати особливості формування азотфіксуючих асоціацій мікроорганізмів з рос-

линами та розробити наукові основи підсилення активності процесу асоціативної азотфіксації за рахунок активізації інтродукованих бактерій та природних їх популяцій.

**В відповідності з цим вирішувались наступні завдання:**

1. Вивчення азотфіксуючих мікроорганізмів кореневої зони небобових рослин на прикладі ряду видів злакових трав, типових для зони помірного клімату.
2. Дослідження особливостей формування азотфіксуючих асоціацій "діазотрофи – злакові трави" з урахуванням джерел надходження бактерій в зону коренів, специфічності, просторових та функціональних взаємовідносин з рослиною.
3. Вивчення аутокології асоціативних азотфіксаторів.
4. Розробка прийомів підсилення надходження біологічного азоту в рослини.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше вивчена таксономічна структура угруповань азотфіксуючих бактерій кореневої зони пажитниці пасовищної, стоколосу безостого, грятниці збірної, тимофіївки лучної, костриці лучної, очеретянки звичайної.

Описано явище ендодіазототрофії азотфіксуючих мікроорганізмів в насінні трав. Показано, що склад діазототрофів-ендодіазототрофів насіння ідентичний складу азотфіксаторів, які колонізують внутрішні тканини коренів відповідних видів рослин. Ендодіазототрофи насіння можуть виступати основним джерелом азотфіксаторів при формуванні азотфіксуючих асоціацій.

Показано, що на формування азотфіксуючих асоціацій при штучній бактеризації мають вплив такі фактори, як розвиток молоді екосистеми та специфічність бактерії до виду рослини.

Показано, що на чисельність і активність природних популяцій асоціативних діазототрофів має суттєвий вплив молібден, а також фітогормони ауксинового та цитокінінового класів, або їх синтетичні аналоги. Вивчено механізм позитивного впливу стимуляторів росту рослин на азотфіксуючу активність бактерій в асоціації з рослинами.

Розширено уявлення про роль мінерального азоту в функціонуванні азотфіксуючих асоціацій. Мінеральні азотні добрива сприяють не тільки "старту" асоціативної азотфіксуючої системи, а й постійно підтримують її в активному функціональному стані при надходженні в зону коренів в дозах, що не перевищують фізіологічного оптимуму для рослин.

Показано, що інокуляція та обробка рослин стимуляторами росту сприяють підвищенню фізіологічного оптимуму азоту для рослин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Сільськогосподарському виробництву рекомендовано високоефективні штами та біопрепарат на їх основі і заходи, які дозволяють активізувати процес азотфіксації в агроценозах, збільшити надходження біологічного азоту в рослини, підвищити їх продуктивність та зекономити більше 20% мінеральних азотних добрив. Матеріали досліджень включені в "Рекомендації Міністерства агропромислового комплексу України та Української академії аграрних наук по ефективному застосуванню біопрепаратів азотфіксуючих та фосформобілізуєчих бактерій в сучасному ресурсозберігаючому землеробстві" (Київ, 1997).

З врахуванням азотфіксуючої активності як тесту екологічної доцільності застосування добрив, розроблено принципово нові науково обґрунтовані рекомендації по створенню високоурожайних травостоїв, які характеризуються екологічною чистотою продукції.

Запропонована методологічна основа для аналітичної селекції активних асоціативних діазототрофів з врахуванням ендодитії азотфіксуючих мікроорганізмів в насінні.

**Особистий внесок здобувача.** Робота виконана автором особисто, а також з залученням співробітників лабораторії біологічного азоту Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, керівником якої є дисертант. Дослідження по таксономічній структурі комплексів азотфіксуючих бактерій проведені спільно з к.б.н. Н.М.Мальцевою; по встановленню значення синтетичних стимуляторів росту рослин в активізації процесу асоціативної азотфіксації – з співробітником Інституту кормів УААН к.с.-г.н. К.П.Ковтун та співробітником науково-інженерного центру "АКСО" Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України к.х.н. П.Г.Дульневим. В проведенні досліджень та їх узагальненні доля автора – 80%.

**Апробація роботи.** Матеріали та основні положення дисертації доповідались на шостому Всесоюзному Бахівському колоквиумі, м.Тбілісі, 1983; Республіканському семінарі "Методичні питання екології ґрунтових мікроорганізмів", м.Київ, 1983; Всесоюзній координаційній нараді "Фіксація азоту мікроорганізмами в ризосфері і на коренях небобових рослин", м.Ялта, 1984; Республіканській конференції "Шляхи підвищення ефективності факторів інтенсифікації сільськогосподарського виробництва", м.Вільнюс, 1986; Всесоюзній школі молодих вчених та спеціалістів "Сучасні проблеми використання біологічного азоту в землеробстві", Нарва-Йїєсуу, 1986; Другій республіканській конференції молодих вчених, аспірантів і спеціалістів "Вклад молодих вчених в інтенсифікацію сільськогосподарського виробництва", м.Харків, 1986; Республіканській конференції "Симбіотрофні азотфіксатори та їх використання в сільському

господарстві", м. Чернігів, 1987; Республіканській конференції "Біологічна фіксація молекулярного азоту і азотний метаболізм бобових рослин", м. Тернопіль, 1991; Конференції "Екологія Полісся: проблеми, сучасність, майбутнє", м. Луцьк, 1993; Першому установчому з'їзді Українського мікробіологічного товариства, м. Одеса, 1993; Першій Всеукраїнській конференції по проблемі "Корми і кормовиробництво", м. Вінниця, 1994; Дев'ятому Бахівському колоквиумі, м. Москва, 1995; 10<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation (St.-Petersburg; 1995); 2<sup>nd</sup> European Nitrogen Fixation Conference (Poznan, 1996); 11<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation (Paris, 1997); Республіканській конференції "Енерго-, і ресурсозберігаючі екологічно безпечні агрохімікати та їх вплив на процес біологічної фіксації молекулярного азоту", м. Київ, 1977; Конференції "Сучасні проблеми охорони ґрунту", м. Київ, 1997; на засіданнях методичної комісії з питань землеробства та рослинництва Інституту землеробства УААН.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 44 експериментальні роботи, у тому числі 20 статей у вітчизняних та зарубіжних журналах і збірниках, 2 авторські свідоцтва та 2 патенти.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів дослідження, 8 розділів викладення результатів досліджень, висновків, списку цитованої літератури (360 першоджерел). Матеріали роботи викладено на 302 сторінках машинопису, з них власне текст займає 254 сторінки. Текст ілюстрований 97 таблицями, 19 рисунками

## ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтована актуальність теми, визначені напрямки досліджень, викладені мета та завдання роботи, її наукова новизна та практичне значення.

### РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В розділі наведено аналіз результатів досліджень вітчизняних та зарубіжних дослідників щодо асоціативних азотфіксуючих бактерій, активності процесу асоціативної азотфіксації та впливу на його протікання ряду екологічних факторів.

## РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами досліджень слугували азотфіксуючі мікроорганізми кончевої зони кормових злакових трав: *Lolium perenne* L. (пажитниці пасошичної, сортів Аргона, Вея, Дрогобичський, Московський-84); *Lolium multiflorum* Lam. Var. *Westerwoldicum* Wittm (пажитниці однорічної, сорт ередкарпатський); *Zerna inermis* (Leys.) (стоколосу безостого, сорт Каровичський); *Dactylus glomerata* L. (грятниці збірної, сорт ВИК-61); *Eleum pratense* L. (тимофіївки лучної, сорт ВИК-5); *Festuca pratensis* Huds (остриці лучної, сортів Йигева-47, Дотнувська-1, Моршанська-1304); *halaroides aruginacea* Rausch (очеретянки звичайної, сорт Донской-18).

Вивчення активності азотфіксації в кореневій зоні рослин проводили в мікровегетаційних, вегетаційних, польових та виробничих дослідах безпосередньо в посудинах для вирощування рослин, та в ґрунтово-рослинних монолітах ацетиленовим методом в модифікації (Волкогон, 1984; 1987). Польові досліди проводили на базі дослідних господарств Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН (ґрунт – дерново-підзолистий пілуватосупісчаний,  $pH_{\text{сол.}}$  – 6,65; вміст гумусу – 0,9-1,1%), Інституту кормів УААН (ґрунт – сірий спідзолений крупнопилуватосупісчаний,  $pH_{\text{сол.}}$  – 5,10; вміст гумусу – 1,6-1,9%), Інституту землеробства тваринництва західних регіонів України (ґрунт – темно-сірий підзолений оглеєний середньосуглинковий,  $pH_{\text{сол.}}$  – 5,50; вміст гумусу – 8-2,6%). Виробничі досліди проводили на сірих лісових ґрунтах дослідного господарства Інституту кормів УААН та Вінницького НВО "Еліта"; черноземі потужному вилугованому середньосуглинковому сумської агрофірми "Насіння"; дерново-підзолистих ґрунтах колгоспів "Червоний прапор" та ім.Кірова Чернігівської обл.

Чисельність різних груп азотфіксуючих мікроорганізмів вивчали в напіврідких середовищах Доберейнер, Ешбі та рідкому – Федорова-Галінінської методом серійних розбавлень з ацетиленовим тестом Villemin et. al., 1974; Okon et. al., 1977; Калининская с соавт., 1981).

Азотфіксуючі мікроорганізми виділяли з ризосферного ґрунту, дмитих коренів, гітосфери, нестерильного та поверхнево стерилізованого насіння загальноприйнятими методами. Бактерії роду *Zospirillum* виділяли по методу Касераса (Caseras, 1982).

Ідентифікацію виділених культур проводили на онові вивчення морфологічних (фазово-контрастна та електронна мікроскопія), культуральних і фізіолого-біохімічних ознак по визначнику Бергі (Bergey, 1984) і оригінальних роботах (Квасников, Писарчук, 1980; Скворцова, 1981; Мирнов с соавт., 1982; Tagand et. al., 1979). Для окремих культур визна-

чали молекулярний відсоток Г+Ц в ДНК методом теплової денатурації по Mundel і Marmur (Белозерский, 1970).

Для вивчення ступеню колонізації асоціативними азотфіксаторами корневих сфер рослин застосовували метод генетичного маркування популяцій (Obaton, 1971). Антибіотикостійкі мутанти одержували по методу Зібальського (Герхардт, 1983), використовуючи градієнт концентрації стрептоміцину в агарі.

Реакцію трав на бактеризацію діазотрофами оцінювали в вегетаційних, польових та виробничих дослідах. Обробку насіння бактеріальними суспензіями проводили з розрахунку  $2-3 \times 10^5$  клітин на одну насінину.

Топографію мікроорганізмів в насінні трав вивчали на ультратонких зрізах в електронному мікроскопі В-S540 "Tesla".

Вплив фітогормонів і їх синтетичних аналогів на активність асоціативної азотфіксації та асоціативні діазотрофи вивчали в умовах вегетаційних та польових дослідів з застосуванням різних концентрацій речовин.

Нітратредуктазну активність рослин під дією рістстимулюючих речовин визначали *in vitro* (Ермаков, 1972).

Кількість хлорофілу в листях трав визначали спектрофотометрично (Гродзинський, Гродзинський, 1973).

Вплив інокуляції, мінерального азоту (окремо і в поєднанні) та інших екологічних факторів на надходження біологічного азоту в рослини вивчали в чотирьох вегетаційних дослідах, застосовуючи методіку ізотопного ( $^{15}\text{N}$ ) розбавлення. Ізотопний склад зразків визначали на мас-спектрометрі МІ-1305. За допомогою ізотопного ( $^{15}\text{N}_2$ ) спектрально-емісійного методу визначали також азотфіксуючу активність ряду штамів діазотрофів в умовах чистої культури.

Вміст азоту в рослинах визначали по К'ельдалю.

Вміст нітратів в зеленій масі трав визначали іонселективним методом (Ягодин, 1987).

Економічне обґрунтування запропонованих прийомів активізації процесу асоціативної азотфіксації проводили згідно методичних рекомендацій (Говорунов з співр., 1991).

Експериментальні дані оброблені статистично (дисперсійний та кореляційний аналізи) за Доспеховим (Доспехов, 1979).

### РОЗДІЛ 3. АЗОТФІКСУЮЧІ МІКРООРГАНІЗМИ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ ЗЛАКОВИХ ТРАВ

Вивчення таксономічної структури угруповань азотфіксуєчих мікроорганізмів кореневої зони шести видів злакових трав показує, що вони багатокомпонентні за складом. Так, в кореневій зоні пажитниці розвиваються представники *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. В зоні коренів стоколосу, крім азоспірил, бацил і мікрококків, активно розвиваються *Alcaligenes paradoxus*. В кореневій зоні гряттиці типовими мікроорганізмами є псевдомонади. Крім цього, з зони коренів даного виду рослин виділені *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Enterobacter* sp. В зоні коренів тимофіївки розвиваються *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. Коренева зона костриці представлена артробактером, псевдомонадами, а також *Erwinia* sp. і *Bacillus polymyxa*. В кореневій зоні очеретянки розвиваються азоспірили, агробактерії, бацили і артробактер.

Наскільки типові для кореневих зон ізольовані мікроорганізми, досить складно виявити при вивченні тільки складу угруповань діазотрофів. Така можливість з'являється при визначенні активності азотфіксації бактерій в асоціації з рослиною (що, певною мірою, дозволяє встановити і ступінь "асоціативності" мікроорганізму). Так, найбільш активно фіксуєчими атмосферний азот в асоціації з рослинами пажитниці є *Azospirillum lipoferum* і *Agrobacterium radiobacter*. Представники інших таксономічних підрозділів – *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp. і *Pseudomonas* sp. в значно меншій мірі фіксують атмосферний азот в асоціації з рослиною, і таким чином, утворюють малопродуктивні асоціації.

Іншими активними азотфіксаторами представлена коренева зона стоколосу. Активні асоціації з рослинами цього виду утворюють представники *Azospirillum brasilense* і *Alcaligenes paradoxus*. Окремі штами *Azotobacter vinelandii* також утворюють активні асоціації з рослинами. Представники *Azospirillum lipoferum*, які активно зв'язують молекулярний азот в чистій культурі, не формують активних асоціацій з стоколосом. Бактерії з родів *Bacillus* і *Micrococcus* при інтродукції їх в кореневу зону стоколосу також не змінюють активності процесу азотфіксації.

В кореневій зоні гряттиці збірної розвиваються псевдомонади, причому серед виділених штамів більшість здатні формувати активні азотфіксуєчі асоціації з рослиною. Ізольовані бацилярні форми, представники родів *Klebsiella*, *Enterobacter* і *Micrococcus* не здатні утворювати активних асоціацій з гряттицею.

Зовсім іншими активними азотфіксаторами представлена коренева зона тимофіївки. З цією рослиною вступають в азотфіксуєчі асоціації

представники *Bacillus subtilis* і *Enterobacter aerogenes*. Штами *Bac.subtilis* при вирощуванні їх в умовах чистої культури слабо фіксують молекулярний азот, але при інтродукції в кореневу зону тимофіївки проявляють найбільшу активність асоціативної азотфіксації серед випробуваних бактеріальних штамів. Присутні в ризосферному ґрунті, ризоплані та гітосфері рослин представники роду *Arthrobacter* не формують активних асоціацій з тимофіївкою. Бактерії роду *Micrococcus* також не утворюють ефективних асоціацій з цією рослиною.

Найбільш активні асоціації з кострицею формують бактерії, які відносяться до *Bacillus polymyxa*. До активних асоціативних діазотрофів слід віднести також і представників роду *Erwinia*, які також як і бацили, розвиваються у всіх вивчених сферах рослин. Представники інших таксономічних підрозділів не утворюють активних азотфіксуючих асоціацій з кострицею.

Серед азотфіксуючих бактерій корневих сфер очеретянки в активні зв'язки з рослиною вступають азоспірили (*A.brasilense*) та агробактерії (*Agrobacterium radiobacter*).

Звертає на себе увагу те, що бактерії роду *Azospirillum* є типовими для очеретянки, пажитниці та стоколосу, але не розвиваються в кореневій зоні гряттиці, тимофіївки і костриці. І навпаки, представників *Bac.subtilis* і *Bac.polymyxa*, які є типовими для тимофіївки та костриці відповідно, не виявлено в кореневій зоні пажитниці, стоколосу чи канарнику.

Бактерії роду *Pseudomonas* досить широко розповсюджені і часто виділяються з корневих сфер різних видів рослин, однак ефективні азотфіксуючі асоціації вони утворюють тільки з гряттицею.

Необхідно відмітити, що чим ближче в просторовому відношенні до корневих тканин рослини, тим вужчий і специфічніший склад комплексів діазотрофів. При цьому гітосферу колонізують, в основному, активні азотфіксатори, які формують найбільш продуктивні асоціації з рослиною. Ілюстрацією цих висновків можуть послужити дані по таксономічній структурі діазотрофів кореневої зони костриці лучної (табл. 1). Отже, гітосфера вивчених видів рослин представлена азотфіксаторами, функціональний зв'язок яких з рослиною, крім просторового, суттєво тісніший, ніж діазотрофів ризоплані та ризосферного ґрунту.

Таблиця 1.

Азотфіксуючі мікроорганізми костриці лучної

Мікроорганізми	Активність азотфіксації	
	в чистій культурі, мкмоль $C_2H_4$ /мл середовища за 24 години	в асоціації з рослиною, нмоль $C_2H_4$ /посудину за годину
<i>Ризосферний ґрунт</i>		
Arthrobacter sp., шт. ОП5	31	55
Micrococcus sp., шт. ОП2	25	48
Bacillus polymуха, шт. 431а	216	<u>180*</u>
Erwinia sp., шт. 317б	75	59
————— " ————— шт. ОП8	44	61
Pseudomonas sp., шт. ОП17	38	69
<i>Корені</i>		
Bacillus polymуха, шт. 430б	512	<u>310</u>
————— " ————— шт. 423а	265	<u>205</u>
————— " ————— шт. 428а	310	<u>192</u>
Arthrobacter sp., шт. ОР2	18	54
Erwinia sp., шт. 432б	45	92
————— " ————— шт. 512	61	<u>115</u>
<i>Гітосфера</i>		
Bacillus polymуха, шт. 433а	270	95
————— " ————— шт. 435б	164	<u>198</u>
————— " ————— шт. 438а	152	<u>210</u>
————— " ————— шт. 436а	94	<u>220</u>
————— " ————— шт. 518а	55	<u>140</u>
Erwinia sp., шт. 436б	59	78
Контроль, небактеризовані рослини		51

\*) – підкреслені показники, які суттєво перевищують значення активності азотфіксації в контролі.

Таким чином, угруповання азотфіксуючих бактерій кореневої зони злакових трав багатокomпонентні. В складі комплексу діазотрофів є бактерії, функціональний зв'язок яких з рослиною, крім просторового, суттєво тісніший, ніж інших бактерій. Асоціативні азотфіксатори, що входять до складу угруповань діазотрофів, специфічні до виду рослин.

## РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ДІАЗОТРОФІВ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ ТРАВСТОЯЇ І АЗОТФІКСУЮЧУ АКТИВНІСТЬ В КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ТРАВ

### 4.1. ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ ТРАВ АКТИВНИМИ ШТАМАМИ ДІАЗОТРОФІВ НА АСОЦІАТИВНУ АЗОТФІКСАЦІЮ І УРОЖАЙНІСТЬ КУЛЬТУР.

Ефективність передпосівної бактеризації відселекціонованими штамми азотфіксаторів кореневої зони відповідних видів рослин дуже висока. Активність азотфіксації в кореневій зоні інокульованих рослин зростає в декілька разів, що показано як ацетиленовим, так і ізотопним методами (табл. 2).

Таблиця 2.

Активність азотфіксації в кореневій зоні стоголосу і надходження біологічного азоту в урожай цієї культури при інокуляції азоспірилами (*A. brasilense*, 410)

Варіанти	Нітрогена зна активність, нмоль $C_2H_2/g$ коренів за 1 годину	$^{14}N + ^{15}N$ в рослинах, мг/посуди-ну	$^{14}N$ в рослинах, мг/посудину	Вплив бактери-зації на надходження $^{14}N$ в рослини	
				мг/посуд.	%
45 мг $(NH_4)_2SO_4$	27,3	5,80	3,58	–	–
45 мг $(NH_4)_2SO_4$ + ін.	62,3	6,08	3,86	0,28	7,8
90 мг $(NH_4)_2SO_4$	23,4	8,65	4,04	–	–
90 мг $(NH_4)_2SO_4$ + ін.	79,2	9,75	5,17	1,08	26,7
НІР <sub>05</sub>	15,2	0,17			

Згідно даних польових та виробничих дослідів інокуляція трав активними штамми асоціативних діазотрофів сприяє суттєвому зростанню урожайності та вмісту загального азоту в продукції.

Передпосівна інокуляція рослин активними асоціативними діазотрофами сприяє також суттєвому зростанню насінневої продуктивності, що показано в умовах польових та виробничих дослідів.

В ході проведених досліджень нами відселекціоновано ряд активних штамів асоціативних діазотрофів, одержано два авторські свідоцтва СРСР (№№ 1473345 і 176603), патент СРСР (№1806123) і патент України (№5703).

Ряд штамів є національними стандартами України для окремих видів сільськогосподарських культур. На їх основі створено препарат

діазобактерин для пажитниці пасовищної, стоколосу безостого, пажитниці однорічної.

#### 4.2. ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ІНОКУЛЯЦІЇ ТРАВ.

Проведеними дослідженнями показано, що інокуляція багаторічних трав ефективна лише в першій-другій роки життя рослин. До третього року життя прибавка врожайності і збільшення активності азотфіксації від передпосівної бактеризації, як правило, недостовірні (табл. 3). Відмічені особливості просліджено в усіх проведених дослідах.

Наведена закономірність підтверджена вивченням ступеню колонізації *A. lirofeum* корневих сфер пажитниці пасовищної. Так, в польовому мілкоділянковому досліді з цією культурою, де в схему було включено варіант з інокуляцією мутантом *A. lirofeum*, стійким до стрептоміцину, показано, що в перший рік життя рослин кількість бактерій досягла декількох мільйонів клітин на 1 г коренів (табл. 4), на другий рік чисельність знизилась на декілька порядків і, накінець, на третій рік життя рослин ми відмічали розвиток цих бактерій в межах, при яких вони не можуть бути відповідальними за процес азотфіксації.

В літературі є дані про те, що популяції азоспірил після перезимовки в умовах помірного клімату не могли бути відновленими до первинних розмірів (Noremans et. al., 1988). На наш погляд, падіння чисельності інтродукованих діазотрофів пояснюється не тільки негативним впливом низьких зимових температур. Отримані дані цілком закономірні, якщо їх розглядати з точки зору екологічної рівноваги. Введенням великої кількості клітин бактерії-інокулянту ми спочатку добиваємось змін в складі мікробіоценозу (домінуючим видом в угрупованні мікроорганізмів буде інтродукована бактерія). Однак це не може залишатись постійним, оскільки закономірно вступить в силу такий процес, як розвиток екосистеми, яка, як відомо, прагне до стабільності. І питання тільки в тому, як довго штучний ценоз буде зазнавати змін і на якому стабілізаційному рівні виявиться чисельність внесеного мікроорганізму. В розглянутому випадку за стабілізацію екосистеми потребувалось біля двох років. Стабілізаційний же рівень виявився досить низьким – 3,5 тис. клітин на 1 г коренів.

Таблиця 3.

Ефективність бактеризації пажитниці пасовищної по роках життя рослин,  
мілководілянковий дослід

Варіанти	Урожайність, ц/га	Прибавка до кон- тролю, %	Активність азотфіксації, мкгN/м <sup>2</sup> /год. (середнє за веге- таційний період)
<i>1991 р. (перший рік життя рослин)</i>			
Контроль	112,4	–	152,3
Інокуляція	156,9	39,6	688,0
НІР <sub>05</sub>	24,5		
<i>1992 р. (другий рік життя рослин)</i>			
Контроль	217,0	–	69,7
Інокуляція	236,0	18,3	173,5
НІР <sub>05</sub>	34,2		
<i>1993 р. (третій рік життя рослин)</i>			
Контроль	167,2	–	67,9
Інокуляція	178,1	6,5	74,1
НІР <sub>05</sub>	18,3		

Повторна інокуляція (бактеризація вегетуючих рослин) не зможе принести успіху, оскільки бактерія-інокулянт буде вже змушена зазнавати тиску величезної кількості бактерій-конкурентів, на відміну від ситуації, яка спостерігається при висіві бактеризованого насіння в ґрунт.

Таблиця 4

Ступінь колонізації азоспірилами корневих сфер пажитниці пасовищної  
(мілководілянковий дослід, дерново-підзолистий ґрунт)

Кореневі сфери	Чисельність клітин, тис./г	
	азоспірили на середовищі з стрептоміцином ( <i>A. lipoferum</i> , шт. С-1 <sup>str</sup> )	азоспірили на середовищі без стрептоміцину
<i>Перший рік життя рослин</i>		
Ризосферний ґрунт	20,2	27,3
Корені	13386,5	1672,0
<i>Другий рік життя рослин</i>		
Ризосферний ґрунт	8,5	25,0
Корені	42,3	1390,0
<i>Третій рік життя рослин</i>		
Ризосферний ґрунт	1,4	35,2
Корені	3,5	1050,5

Таким чином, ефект інокуляції багаторічних злакових трав знижується в часі з-за розвитку молодого екосистеми. Суттєва дія інтродукованого штаму на рослину просліджується лише 1-2 роки. Повторна інокуляція не зможе привести до успіху.

Зовсім інша ситуація складається при бактеризації однорічних рослин. Інтродукований в зону коренів мікроорганізм на протязі вегетаційного періоду сприяє збільшенню урожайності (як, між іншим, він спрацьовує і на багаторічних рослинах в перший рік їх життя). Так, в виробничому досліді з пажитницею однорічною, проведеному на базі дослідного господарства Інституту кормів УААН, одержана висока прибавка урожайності зеленої маси (табл. 5). Незавжно замітити, що ефективність бактеризації знижується навіть на протязі одного вегетаційного періоду – від першого укосу до третього. Якщо прибавка урожайності в першому укосі склала 54,7%, то в другому була нижче – 27,9%, до третього укосу знизилась до 6,1%.

Таблиця 5

Вплив бактеризації *A. brasilense*, шт. 410 на урожайність пажитниці однорічної (виробничий дослід, 1993 рік)

Укоси	Варіанти	Урожайність, ц/га	Прибавка	
			ц/га	%
1-й	Контроль	139	–	–
	Інокуляція	215	76	54,7
2-й	Контроль	93	–	–
	Інокуляція	119	26	27,9
3-й	Контроль	66	–	–
	Інокуляція	70	4	6,1
Всього	Контроль	299	–	–
	Інокуляція	404	105	35,1

На прикладі однорічних рослин ми можемо підтвердити зроблене вище допущення про те, що не тільки вплив низьких температур позначається на чисельності інтродукованого штаму. На розвиток популяції буде мати сильний вплив розвиток екосистеми, яка прагне до стабільності.

Таким чином, багаторічні злакові трави чутливі на бактеризацію активними штамами асоціативних азотфіксуючих бактерій, але ефективність цього агрозаходу знижується в часі, по роках життя рослин. Інокуляція є важливим фактором впливу на урожайність однорічних рослин.

### 4.3. СПЕЦИФІЧНІСТЬ АСОЦІАТИВНИХ ДІАЗОТРОФІВ ДО ВИЩОЇ РОСЛИНИ.

При відсутності морфологічно виражених структур, як це має місце в бобово-ризобіальному симбіозі, основним первинним критерієм ефективності асоціацій "діазотрофи – вища рослина" буде, на наш погляд, нітрогеназна активність в кореневій зоні, що дозволяє враховувати характер функціональних відносин мікроорганізмів з рослиною. При цьому дається інтегральна оцінка специфічності, вірулентності і активності штамів. В поєднанні з оцінкою впливу штаму на ріст рослини це може явитись найбільш суттєвим і об'єктивним тестом при з'ясуванні специфічності і ефективності штамів.

При оцінці реакції різних видів злакових трав на такий агрозахід як інокуляція, в наших дослідженнях станувало немалий інтерес вивчення можливості бактеризації рослин представниками однієї таксономічної групи азотфіксуючих мікроорганізмів, оскільки як в технологічному, так і в економічному відношеннях це було б надзвичайно вигідно. В першу чергу ми звернули увагу на бактерії роду *Azospirillum*, як типові активні асоціативні азотфіксатори ряду видів рослин. Вивчення чутливості кормових злакових трав на інтродукцію азоспірил в зону коренів, проведене в умовах вегетаційних та польових дослідів, показує, що крім пажитниці, на інокуляцію *A. lipoferum* позитивно не реагував ні один з вивчених видів трав; на бактеризацію *A. brasilense* були чутливими стоколос, канарник і грятися. Тимофіївка в окремих дослідях не реагувала на бактеризацію азоспірилами, в інших дослідях спостерігали зменшення активності процесу від інокуляції. Інокуляція ж костриці представниками обох вивчених видів азоспірил приводила до зниження нітрогеназної активності в кореневій зоні рослин.

Виключно негативна реакція костриці на інокуляцію азоспірилами спостерігалась в усіх дослідях, незалежно від сорту рослин та ґрунтово-кліматичних умов (табл. 6).

В свою чергу спроби домогтися позитивних результатів від бактеризації пажитниці, очеретянки і стоколоса асоціативними азотфіксаторами тимофіївки (представники *Bacillus subtilis* і *Enterobacter aerogenes*), а також типовим для костриці кореневим діазотрофом – *Bacillus polymyxa*, також не привели до успіху. Отже у взаємовідносинах азотфіксуючих бактерій з рослиною-хазяїном просліджується висока ступінь специфічності. Це суттєво обмежує застосування передпосівної інокуляції при вирощуванні злакових трав, адже їх, як правило, вирощують в вигляді травосумішок. В цих умовах позитивний ефект від інокуляції одного компоненту травосумішки може нівелюватись невідомою іншого.

Таблиця 6.

Азотфіксуюча активність в кореневій зоні костриці лучної при інокуляції азоспірами (польові досліди)

Сорт	Тип ґрунту	Варіанти	Активність азотфіксації, мкгN/м <sup>2</sup> за годину
Дотнувська - 1	Сірий лісовий опідзолений	Контроль	11,46
		Інокуляція <i>A. brasilense</i> , шт. 410	9,87
Моршанська - 1304	Темно-сірий лісовий опідзолений	Контроль	255,90
		Інокуляція <i>A. lipoferum</i> , шт. С-1	18,51
		Інокуляція <i>A. lipoferum</i> , шт. 4014	17,53

Таким чином, проведені дослідження по інокуляції багаторічних злакових трав свідчать про ряд обмежень в його здійсненні.

По-перше, ефективність інокуляції знижується в часі, що робить необхідним застосування її тільки в разі вирощування рослин на насіння, або на зелену масу чи сіно при умові короткочасного використання угіддя.

По-друге, в силу специфічності азотфіксуючих мікроорганізмів до відповідних видів рослин, бактеризація трав, які вирощуються в сумішках, може стати неможливою в зв'язку з тим, що позитивний ефект від цього прийому може нівелюватись нечутливістю (або негативним ефектом) інших видів трав.

## Розділ 5. РОЛЬ АЗОТФІКСАТОРІВ НАСІННЯ В ФОРМУВАННІ АСОЦІАТИВНИХ ВЗАЄМОВІДНОСИН З РОСЛИНОЮ

З ситуації, що складається з підсилення активності процесу азотфіксації в кореневій зоні багаторічних злакових трав шляхом інокуляції, є можливий вихід – активізація діяльності асоціативного симбіозу, сформованого за рахунок спонтанної мікрофлори. Але термін "спонтанна мікрофлора" традиційно асоціюється з терміном "випадкова мікрофлора", тому погляди дослідників практично не звертаються до проблеми активізації спонтанної мікрофлори. Дійсно, в ґрунті знаходяться різноманітні мікроорганізми, і хоча взаємодія рослини з бактеріями специфічна, здається немає ніякої гарантії, що в асоціацію з коренями овенільної рослини не вступають малоактивні діазотрофи. Однак при цьо-

му, як правило, не враховується ще одне джерело надходження бактерій в кореневу зону рослини – насіння. В літературі ж є дані, які свідчать про наявність азотфіксуючих мікроорганізмів на насінні гібридів кукурудзи (Ruschel, Silva, 1979), рису (Калининская, Редькина, 1981), пшениці (Садыков с соавт., 1986). Вважається, що епіфітні азотфіксуючі мікроорганізми насіння рису та пшениці можуть виступати основним джерелом розвитку діазотрофів в кореневій зоні цих видів рослин.

В своїй роботі ми звернули увагу на вказані обставини і провели детальне дослідження азотфіксуючих бактерій насіння злакових трав. Проведене вивчення діазотрофів насіння показало, що мікроорганізми локалізовані не тільки на поверхні насіння, а й знаходяться під оболонкою насіння, колонізуючи внутрішні тканини (рис. 1).

Виділення та послідуоча ідентифікація діазотрофів з поверхнево стерилізованого насіння дозволила встановити, що склад насінневих діазотрофів співпадає з складом діазотрофів гістосфери відповідних видів рослин (табл. 7). Так, з внутрішніх тканин насіння пажитниці ізольовано *Azospirillum lipoferum* та *Agrobacterium radiobacter*, стоколосу – *Azospirillum brasilense* та *Alcaligenes paradoxus*, грястиці – *Pseudomonas* sp., тимофіївки – *Bac.subtilis* і *Enterobacter aerogenes*, костриці – *Bac.polymyxa* і *Erwinia* sp., канарнику – *Azospirillum brasilense* та *Agrobacterium radiobacter*.

Таблиця 7.

Азотфіксуючі мікроорганізми насіння злакових трав.

Вид рослини	Азотфіксуючі бактерії
Пажитниця	<i>Azospirillum lipoferum</i>
пасовищна	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Стоколос	<i>Azospirillum brasilense</i>
безостий	<i>Alcaligenes paradoxus</i>
Очеретянка	<i>Azospirillum brasilense</i>
звичайна	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Тимофіївка	<i>Bacillus subtilis</i>
лучна	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Грястиця	<i>Pseudomonas</i> sp.
збірна	<i>Bacillus</i> sp.
Костриця	<i>Bacillus polymyxa</i>
лучна	<i>Erwinia</i> sp.

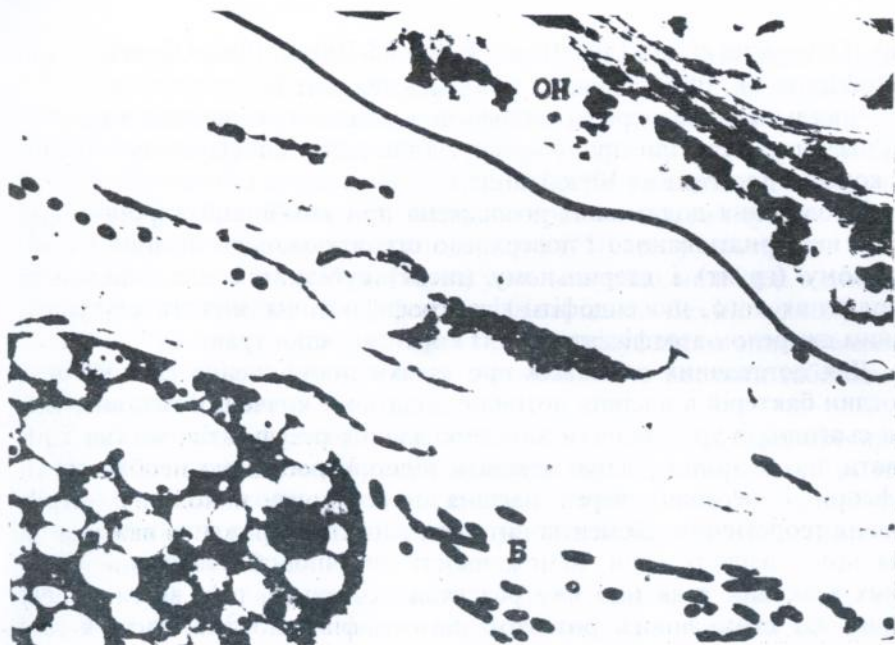


Рис. 1. Ультратонкий зріз периферійної частини насіння пажитниці пасоки (x4000): Б – бактерії; ОН – оболонка насіння.

Одержані дані свідчать, що не тільки епіфітні мікроорганізми можуть бути джерелом розвитку мікроорганізмів в кореневій зоні, але й ендодітні бактерії. Крім того, специфіка колонізації насіння діазотрофами (приуроченість бактерій до певного виду рослин) свідчить про те, що заселення бактеріями насінневих тканин не випадкове. На користь даної точки зору спрацюють також дані дослідів по вивченню можливості проникнення бактерій, ізольованих з внутрішніх тканин насіння (при їх інтродукції в кореневу зону трав) в насіння нової генерації. В дослідях відмічено проникнення в насіння тільки "гомогенних" стрептоміцинстійких штамів.

Навряд чи можна зробити припущення, що виявлені бактерії паразитують в насінні вивчених видів трав, якщо взяти до уваги ту ступінь специфічності бактерій-ендофітів до насіння відповідних видів, а також той позитивний вплив на рослини, який відмічається при інокуляції бактеріями трав. І хоча існує думка, що рослинні тканини можуть бути інфікованими тільки патогенними мікроорганізмами (Красильников, 1958), опубліковані недавно роботи про діазотрофи-ендофіти (в тому числі про облигатні ендодітні азотфіксатори), які заселяють внутрішні тканини

коренів (Dobereiner et. al., 1993; Hurek, Reinhold-Hurek, 1993; Olivares et. al., 1993; Boddey et. al., 1995) в значній мірі спростовують її.

Чисельність діазотрофів-ендофітів в насінні трав невисока (до 100 клітин/насінину), але при пророщуванні вона різко збільшується і на молодих коренях досягає вже  $10^5$  клітин/г.

Проведення додаткових досліджень при комбінації вирощування рослин з нестерилізованого і поверхнево стерилізованого насіння на нестерильному (грунт) і стерильному (пісок) субстратах дало подальші підтвердження того, що ендофіти-діазотрофи насіння можуть слугувати основним джерелом азотфіксаторів для кореневої зони трав.

Для остаточних висновків про шляхи проникнення специфічних для рослин бактерій в насіння потрібне додаткове вивчення питання. Однак на сьогодні, з урахуванням вищевикладених результатів, можна констатувати, що в природі існує механізм відбору рослиною необхідної їй мікрофлори і передачі через насіння наступному поколінню. Крім вирішення теоретичних елементів питання, дані спостереження важливі і в прикладному аспекті: при неможливості штучної бактеризації багаторічних злакових трав (що вже розглядалось вище), слід вести пошук факторів, які стимулюють розвиток діазотрофів-ендофітів насіння для формування повноцінного асоціативного симбіозу.

## **РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ АНТРОПОГЕННИХ ФАКТОРІВ НА ФОРМУВАННЯ АСОЦІАТИВНИХ ВЗАЄМОВІДНОСИН РОСЛИН З ДІАЗОТРОФАМИ**

### **6.1. ВПЛИВ МОЛІБДЕНУ НА ФОРМУВАННЯ АСОЦІАТИВНИХ СИМБІОЗІВ РОСЛИН З СПОНТАННИМИ АЗОТФІКСУЮЧИМИ БАКТЕРІЯМИ.**

Проведені дослідження по вивченню впливу обробки трав молібдатами на процес асоціативної азотфіксації демонструють, що даним заходом досягається суттєве підвищення процесу азотфіксації і продуктивності травостою. Згідно даних, одержаних в п'яти польових дослідях з різними злаковими травами, азотфіксуюча активність і урожайність культур в варіантах з молібденом досягала значень, відмічених в варіантах з інокуляцією активними штамами діазотрофів.

Оскільки ацетиленовий метод визначення активності азотфіксації при всіх своїх достоїнствах є непрямим, що базується на відновленні нітрогеназою неприродного субстрату, ми провели додаткове визначення впливу молібдену на формування азотфіксуючих асоціацій, використовуючи метод ізотопного розбавлення з  $^{15}\text{N}$ .

Результати дослідів в значній мірі підтверджують дані, одержані в польових експериментах. Як свідчать дані табл. 8, молібден суттєво стимулює засвоєння рослинами мінерального азоту, особливо якщо в субстраті він є лімітуючим фактором (в досліді спочатку такі умови складаються в варіантах з внесенням 15 мг/кг субстрату). Важливо відмітити, що при цьому, крім підсилення засвоєння рослинами мінерального азоту, збільшується і надходження атмосферного ( $^{14}\text{N}$ ) азоту в рослини.

Слід також акцентувати увагу на тому, що молібден в досліді міг активізувати лише діазотрофи насіння (в варіантах без інокуляції) з-за стерильності субстрату. Отже, в варіантах з застосуванням одного молібдену високий рівень надходження біологічного азоту в рослини забезпечували насіннєві азотфіксатори.

Підвищене засвоєння мінерального азоту і активізація процесу азотфіксації під дією молібдену в значній мірі пояснюється збільшенням абсорбційної здатності кореневої системи і зростанням загальної чисельності азотфіксаторів, оскільки маса коренів в варіантах з молібденом була більшою, ніж в контролі.

Однак, в ряді інших дослідів було показано, що застосування молібдату викликає зростання і питомої чисельності азотфіксаторів, що зв'язано, вірогідно, з енергетичними змінами в рослині. Можливість енергетичних змін в рослині і, відповідно, в кореневих ексудатах під дією молібдену досить вірогідна, якщо врахувати вплив цього елемента на активність процесу фотосинтезу, що відомо з літератури (Володин, 1972).

Активізація процесу азотфіксації в кореневій зоні трав, збільшення чисельності корневих діазотрофів і підвищене засвоєння рослинами мінерального азоту під дією молібдену свідчить про екологічну доцільність цього прийому. Обробка рослин молібденом сприяє активізації і розвитку спонтанних діазотрофів, тому застосування цього мікроелементу може виступати як альтернатива штучній бактеризації в тих випадках, коли проведення останньої неможливе.

## **6.2. ВПЛИВ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ РОСЛИН НА ФОРМУВАННЯ АСОЦІАТИВНОГО СИМБІОЗУ ТА ЙОГО АКТИВНІСТЬ.**

При проведенні дослідження по підборі факторів, які стимулюють процес асоціативної азотфіксації, було виявлено, що цей показник значно збільшують фітогормони, застосовані в концентраціях, які стимулюють розвиток рослин. Серед представників трьох вивчених класів фітогормонів активно стимулювали азотфіксуючу активність в кореневій зоні рослин ауксини та цитокініни. Гібереліни не впливали на активність процесу.

Таблиця 8.

Азотний баланс в рослинах пажитниці, а також урожайність під впливом інокуляції та обробки насіння молібденом.

Дози мінерального азоту, мг/кг піску	Варіанти	Урожайність надземної маси, мг/пос.	Урожайність коренів мг/посудину	Біологічний урожай, мг/посудину	N <sub>заг.</sub> мг/посудину	N <sub>добрив.</sub> мг/посудину	Збільшення надходження мінерального N		<sup>14</sup> N, мг/посудину	Збільшення надходження <sup>14</sup> N	
							мг/посудину	%		мг/посудину	%
15	Контроль	329,5	235,9	565,4	8,33	4,27	–	–	4,06	–	–
	Інокуляція	372,5	259,5	632,0	9,61*	4,76*	0,49	11,5	4,85*	0,79	19,5
	Молібден	410,1	259,3	669,4	9,71*	4,71*	0,49	11,5	4,95*	0,89	21,9
	Молібден+інокуляція	321,6	200,2	529,8	9,12	4,93*	0,66	15,5	4,19	–	–
30	Контроль	488,4	227,8	716,2	14,86	10,00	–	–	4,86	–	–
	Інокуляція	569,8	413,9	983,7*	16,28*	10,84*	0,84	8,4	5,44*	0,58	11,9
	Молібден	523,1	353,9	877,0*	16,13*	10,49*	0,49	4,9	5,64*	0,78	16,0
	Молібден+інокуляція	529,2	442,3	971,5*	16,27*	10,52*	0,52	5,2	5,74*	0,88	18,1

\*) – достовірні зміни в порівнянні з контролем

Оскільки застосування фітогормонів для активізації фіксації молекулярного азоту проблематично по економічних причинах, в подальшому ми досліджували синтетичні аналоги фітогормонів ауксиново-цитокінінової дії. Серед випробуваних стимуляторів росту було відібрано ряд речовин, які найбільш суттєво підвищували нітрогеназну активність (табл. 9).

Таблиця 9.

Вплив синтетичних стимуляторів росту на азотфіксуючу активність в кореневій зоні костриці та стоколосу, вегетаційні досліди

Варіанти	Активність азотфіксації, мкгN/посудину/за годину	
	Костриця	Стоколос
Контроль	0,062	0,058
Інокуляція	0,475	0,240
Рістстимулятори: ДГ-480	0,510	0,211
ДГ-482	0,545	0,315
“Флора-1”	0,452	0,288
“Флора-2”	0,407	0,190
НР <sub>05</sub>	0,050	0,032

Стимулятори росту рослин діють на процес асоціативної азотфіксації як в умовах передпосівної обробки насіння, так і при нанесенні розчинів на вегетуючі рослини, що суттєво розширює сферу їх застосування.

В ряді польових та виробничих дослідів нами показано суттєве зростання активності асоціативної азотфіксації та урожайності травостою від застосування рістстимуляторів.

Підвищення активності процесу азотфіксації та рівня надходження біологічного азоту в рослини під впливом стимуляторів росту рослин підтверджено в досліді з використанням <sup>15</sup>N.

Основні складові механізми впливу вивчених біостимуляторів на процес асоціативної азотфіксації приведені в схемі (рис. 2).

Обробка рослин синтетичними стимуляторами росту має опосередковану дію на активність процесу асоціативної азотфіксації – через рослину. При цьому може активізуватись процес фотосинтезу, що буде сприяти активізації азотфіксації через збільшення надходження асимільованого вуглецю.

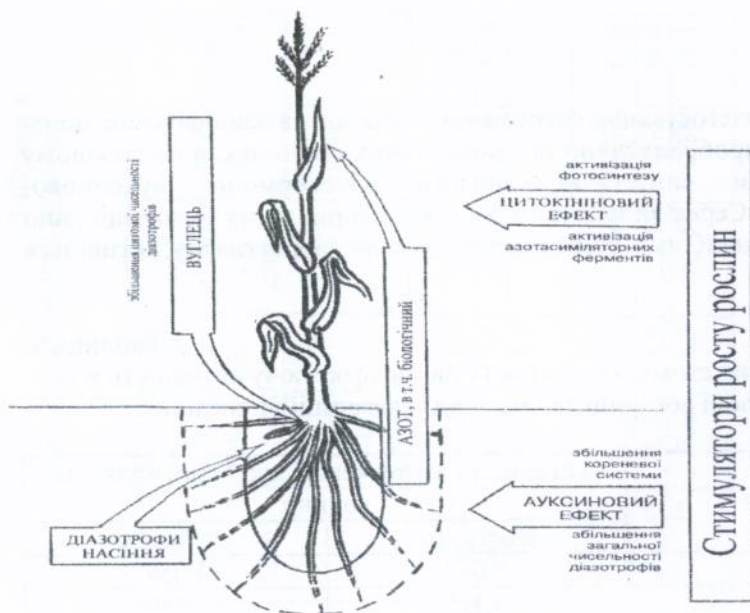


Рис. 2. Схема дії стимуляторів росту рослин на активність асоціативної азотфіксації.

Рістстимулятори, виконуючи своє пряме призначення – підсилювати ріст рослин, – можуть активізувати синтез азотасиміляторних ферментів рослини, що може індукувати через збіднення субстрату по азоту синтез нітрогенази. Крім того, зростає як загальна (за рахунок ауксинового ефекту), так і питома (викликана додатковим притоком вуглецю) чисельність азотфіксаторів, типових для рослини, що забезпечує ефективну змішану аутобактеризацію. І, накінець, в асоціацію з рослиною вступають специфічні для кожного виду рослин діазотрофи.

### 6.3. ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО АЗОТУ НА ПРОЦЕС АЗОТФІКСАЦІЇ В КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ЗЛАКОИХ ТРАВ.

На сьогодні загальноновизнаною є точка зору, згідно якої дози азоту, що не перевищують фізіологічних потреб рослин, не знижують активність асоціативної азотфіксації (Umarov et. al., 1985; Ladha et. al., 1986). Але дане

поняття є скоріше теоретичним, ніж практичним, оскільки фізіологічний оптимум азоту для сільськогосподарських культур буде залежати від виду рослини, фази органогенезу і ряду екологічних умов. Тому, оптимум мінеральних азотних добрив необхідно вивчати і встановлювати безпосередньо для конкретних культур з врахуванням особливостей їх вирощування.

Як показано в наших дослідженнях з травами, внесення мінерального азоту роздрібним способом навіть в невеликих кількостях спочатку знижує нітрогеназну активність асоціативних діазотрофів. Потім, по мірі утилізації добрив, відмічається збільшення розмірів азотфіксації в варіантах з невисокими дозами азоту. З часом стимулювання активності азотфіксації відмічається і в варіантах з більш високими дозами добрив (табл. 10).

Таблиця 10.

Активність асоціативної азотфіксації в залежності від кількості внесеного в ґрунт мінерального азоту,  $\text{мкгN/м}^2/\text{годину}$  (польовий дослід)

Дози азоту, $\text{кг/га}$	Дні після внесення добрив						
	Весняне внесення добрив		Внесення добрив після 1-го укусу		Внесення добрив після 2-го укусу		
	20 дн.	35 дн.	9 дн.	58 дн.	11 дн.	23 дн.	45 дн.
0	64,7	77,5	303,3	224,1	582,5	582,5	111,6
10	70,0	212,0*	283,3	201,6	481,7	572,5	304,2
20	86,8*	168,4*	246,6	1681,7*	459,2	4144,2*	1254,2*
40	185,0*	155,0*	200,0	212,5	414,2	1792,5*	1512,5*
80	50,8	134,2	225,0	111,7	370,0	1243,0	1275,0*
120	50,8	187,5*	108,3	90,0	370,0	851,6	570,8*
160	28,3	134,2	100,0	90,0	335,8	526,6	335,8*
200	28,3	111,6	141,6	78,3	324,2	526,6	111,7
240	33,3	78,3	100,0	78,3	370,0	515,0	100,8
280	28,3	55,8	75,0	78,3	290,8	526,6	78,3
$\text{HIP}_{05}$	20,0	63,3	75,0	1375,0	93,3	788,3	223,3

\*) – достовірне збільшення при 95%-му рівні достовірності

Розрахунок продуктивності азотфіксації показує, що вона найбільш висока в варіантах з дозами мінерального азоту 20, 40 і 80  $\text{кг/га}$  (табл. 11). Не зважаючи на прояви високої активності азотфіксації в варіантах з помірними (і навіть високими) дозами азоту сумарні показники в цьому випадку невисокі з-за короткочасності стимулювання процесу азотфіксації цими дозами. Внесення

азоту в дозі 120 кг/га ще є прийнятним в екологічному відношенні. Дозу азоту 160 кг/га слід вважати екологічно пороговою.

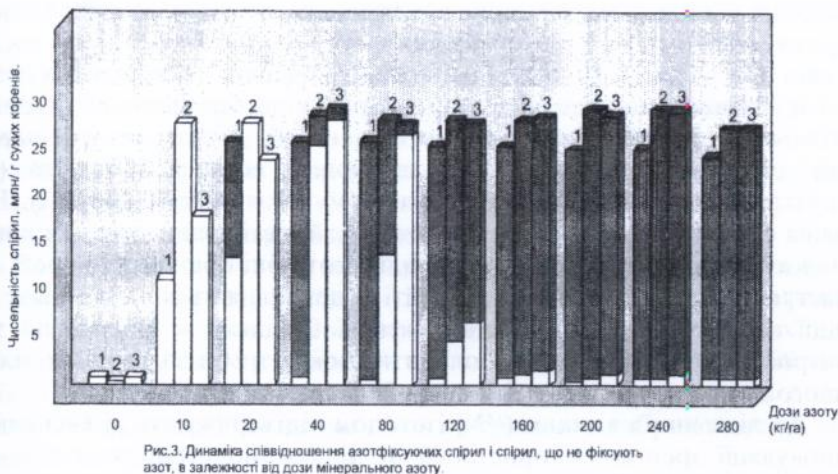
Таблиця 11.

Продуктивність азотфіксації під травами в залежності від кількості азотних добрив (польовий дослід)

Дози азоту, кг/га	Продуктивність азотфіксації, кг/га/150дн.
0	9,19
10	17,07
20	34,69
40	22,51
80	17,97
120	10,44
160	7,34
200	5,81
240	5,51
280	5,87

Приведені дані, а також результати інших дослідів показують, що після вичерпання оптимальних концентрацій добрив активність азотфіксації знижується. Зниження активності досить закономірне, якщо взяти до уваги те, що навіть добре сформована асоціація не здатна забезпечити повне азотне живлення за рахунок азоту атмосфери (Умаров с соавт., 1987). Нормально сформована рослина для підтримки інтенсивних енергетичних процесів і для конструктивного метаболізму буде відчувати потребу в постійній присутності відповідних доз зв'язаного азоту. Тому зниження концентрації азоту нижче фізіологічного оптимуму може привести до зниження інтенсивності фізіологічних процесів, включаючи фотосинтез, що в свою чергу приведе до зниження азотфіксації з-за зменшення надходження асимільованого рослиною вуглецю в кореневу систему.

Відмічені спостереження доповнюють мікробіологічні дослідження. Так, вивчення впливу мінерального азоту на чисельність азоспірил в кореневій зоні пажитниці показує, що внесення добрив як в невисоких, так і в підвищених дозах стимулює розвиток цих мікроорганізмів (щоправда при наявності високих концентрацій азоту нітрогеназна активність азоспірил практично повністю репресована) (рис. 3). Після вичерпання мінерального азоту чисельність азоспірил також, як і активність процесу асоціативної азотфіксації знижується.



□ азотфіксуючі спірилі;      ■ спірилі, що не фіксують азот;

1 - визначення проведено через 25 днів після внесення добрив;

2 - визначення проведено через 40 днів після внесення добрив;

3 - визначення проведено через 55 днів після внесення добрив;

Одержані дані свідчать про те, що мінеральний азот необхідний в діяльності асоціативних азотфіксуючих симбіозів не тільки для “запуску” системи, як стартовий азот. Для підтримки асоціативних азотфіксаторів в активному стані зв’язаний азот постійно повинен бути в ґрунті в невеликих дозах.

Крім визначення оптимальних концентрацій азотних добрив і їх дії на процес асоціативної азотфіксації в часі, нами проведено визначення оптимальних для азотфіксації форм азотних добрив. Оптимальною формою добрив в наших дослідках є вуглеамонійні солі. Позитивна дія їх на асоціативну азотфіксацію більш виражена, ніж при внесенні аміачної селітри, що очевидно пов’язано з тим, що вивчені солі є ще й продуцентами  $\text{CO}_2$ , який може підвищити азотфіксацію через інтенсифікацію фотосинтезу.

#### 6.4. ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО АЗОТУ НА ПРОЦЕС АСОЦІАТИВНОЇ АЗОТФІКСАЦІЇ ПРИ ШТУЧНІЙ БАКТЕРИЗАЦІЇ ТА ОБРОБЦІ РОСЛИН РІСТСТІМУЛЯТОРАМИ.

При вивченні впливу мінерального азоту на ефективність інокуляції нами було звернено увагу, що фізіологічний оптимум азоту для рослин (визначений по тесту ацетиленредукції) при інокуляції суттєво

зростає. Так, в польовому досліді з пажитницею однорічною, проведеному на сірому лісовому ґрунті, оптимум азоту для інокульованих рослин відмічено при внесенні 80 кг/га (для неінокульованих – в варіанті з дозою 40 кг/га). В польовому досліді з травосумішкою “пажитниця пасовищна+стоколос безостий”, проведеному в таких же умовах, оптимальними дозами для інокульованих рослин виявились дози 80-160 кг/га (для неінокульованих – 40 кг/га). Пояснення цьому полягає в наступному. Бактеризація сприяє суттєвому зростанню врожайності трав, тому для конструктивного метаболізму в даному випадку потрібні і більші кількості азоту. Частково потреба в цьому елементі задовольняється за рахунок активізації процесу асоціативної азотфіксації. Оскільки ж інтенсивно зростаючі рослини не в змозі задовольнити свої потреби за рахунок тільки названого джерела, зростають і їх потреби в азоті мінеральному.

Дослідження з важким ( $^{15}\text{N}$ ) ізотопом підтверджують ці висновки – при інокуляції зростає використання не тільки біологічного азоту, а й мінерального (табл. 12).

Таблиця 12

Вплив інокуляції та азотного добрива на надходження мінерального та атмосферного азоту в рослини

№№* варіантів	Вміст загального азоту, мг/посудину	Надходження $^{15}\text{N}$ в рослини, мг/посудину	Використання азоту добрив, %	Надходження атмосферного ( $^{14}\text{N}$ ) азоту, мг/посудину
1	44,85	0,96	60,0	3,24
2	50,69	1,58	98,8	8,44
3	47,22	4,25	61,6	2,32
4	56,54	5,55	80,4	10,34
НІР <sub>05</sub>	2,02	0,26	16,3	

- \*) – 1 – 7,5 мг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + автоклавована культура *Azospirillum*;  
 2 – 7,5 мг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + інокуляція *Azospirillum*;  
 3 – 32,5 мг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + автоклавована культура *Azospirillum*;  
 4 – 32,5 мг  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  + інокуляція *Azospirillum*.

Аналогічна закономірність виникає також і при обробці трав стимуляторами росту рослин.

Таким чином, застосування інокуляції та обробки рослин стимуляторами росту рослин сприяє підвищенню фізіологічного оптимуму мінерального азоту, активності процесу асоціативної азотфіксації та збільшенню коефіцієнту використання мінерального азоту.

## РОЗДІЛ 7. ЕКОНОМІЧНА ОЦІНКА ПРИЙОМІВ АКТИВІЗАЦІЇ АСОЦІАТИВНОЇ АЗОТФІКСАЦІЇ

Аналіз економічної ефективності застосування прийомів активізації процесу асоціативної азотфіксації та підвищення продуктивності травостоїв демонструє їх перспективність. Так, економічний ефект інокуляції трав складає 193 і більше грн./га. Окупність затрат на інокуляцію настає вже в перший рік використання угідь.

Економічний ефект від застосування солей молібдену складає 115 грн./га; стимуляторів росту рослин – 156 грн./га в середньому за три роки.

Розрахунок економічної ефективності внесення різних доз мінерального азоту свідчить, що при збільшенні дози добрив до 80 кг/га росте їх віддача урожаєм; зростає також економічна ефективність додаткової дози. Подальше збільшення дози мінеральних добрив веде до зниження ефективності їх застосування.

## РОЗДІЛ 8. ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.

В розділі зроблено підсумок одержаних в ході проведення досліджень результатів.

### ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що угруповання азотфіксуючих бактерій кореневої зони пажитниці пасовищної, тимофіївки лучної, грястиці збірної, стоколосу безостого, костриці лучної, очеретянки звичайної багатоконпонентні за складом, але специфічні до виду рослини. Для комплексу корневих діазотрофів характерна наявність домінуючих видів бактерій, зв'язок яких з рослиною більш тісний, ніж інших мікроорганізмів. В кореневій зоні пажитниці домінуючими є *Azospirillum lipoferum* і *Agrobacterium radiobacter*, тимофіївки – *Bacillus subtilis* і *Enterobacter aerogenes*, грястиці – *Pseudomonas* sp., стоколосу – *Azospirillum brasilense* і *Alcaligenes paradoxus*, костриці – *Bacillus polymyxa*, очеретянки – *Azospirillum brasilense* і *Agrobacterium radiobacter*.
2. Показано, що чим ближче в просторовому відношенні до корневих тканин рослини, тим вужчий склад азотфіксуючих мікроорганізмів, але при цьому значно зростає відсоток активних діазотрофів; гістосфера рослин представлена, в основному, високоефективними азотфіксаторами.
3. Таксономічний склад діазотрофів, які колонізують внутрішні тканини коренів злакових трав, ідентичний видовому складу азотфіксаторів

- насіння відповідних видів рослин. Активні асоціативні азотфіксатори знаходяться як ендofіти в міжклітинниках алейронового шару та ендосперму насіння трав. При проростанні насіння ці бактерії здатні до формування активних азотфіксуючих асоціацій з рослиною. Ендofіти-азотфіксатори можуть виступати основним джерелом надходження діазотрофів в кореневу зону рослин при створенні азотфіксуючих асоціацій.
4. На основі системи знань по ендofітії азотфіксуючих бактерій в насінні розроблена методика селекції активних штамів асоціативних діазотрофів, яка полягає в виділенні бактеріальних культур із насіння після попереднього знищення банальної мікрофлори шляхом поверхневої стерилізації насіння.
  5. З зони коренів та насіння злакових трав виділено понад три тисячі бактеріальних культур, з яких біля 10% є активними асоціативними азотфіксаторами. Інтродукція цих штамів в зону коренів відповідних видів рослин сприяє підвищенню активності процесу асоціативної азотфіксації, ступеню надходження біологічного азоту в рослини та збільшенню врожайності культур на 15-20%.
  6. Передпосівна інокуляція багаторічних злакових трав активними штамми асоціативних азотфіксаторів ефективна лише в перші два роки життя рослин та при вирощуванні їх на насіння. На третій рік життя рослин післядія інокуляції зменшується до рівня недостовірних показників. Ефект затухання в часі дії інокуляції полягає в направленості розвитку молододі екосистеми, яка прагне до стабільності і в ході розвитку приводить чисельність клітин інтродукованого штаму до певного стабілізаційного рівня, при якому мікроорганізм не зможе забезпечити збільшення активності процесу асоціативної азотфіксації.
  7. Передпосівна бактеризація насіння однорічних рослин активними штамми асоціативних азотфіксаторів є перспективним агроприємом, оскільки інтродукований штам, не дивлячись на поступове зменшення чисельності клітин в кореневій зоні рослин, встигає здійснити позитивний вплив на урожайність рослини.
  8. Інокуляція сумішки злакових трав не приводить до підвищення продуктивності рослин, оскільки ефект від інокуляції одного компоненту сумішки може нівелюватись невідозвою іншого з-за специфічності бактерій до виду рослини.
  9. На основі експериментально отриманих і наявних в літературі даних пояснюється роль молібдену в підвищенні активності процесу асоціативної азотфіксації. Показано, що молібден може позитивно впливати на асоціативні діазотрофи не тільки через пряму участь в формуванні ферментного азотфіксуючого комплексу бактерій, а й опосередковано – через рослину, що приводить до збільшення питомої чисельності бактерій.

Одним з основних факторів, відповідальних за формування активних азотфіксуючих асоціацій, є фітогормони ауксинового та цитокінінового класів, або їх синтетичні аналоги. Дані речовини діють на асоціативні азотфіксатори опосередковано – через рослину.

Механізм дії стимуляторів росту рослин на процес асоціативної азотфіксації зводиться до декількох основних моментів: збільшення кореневої системи, а відтак і ніші для заселення азотфіксаторами; інтенсифікації хлоропластогенезу, що приводить до одержання додаткової енергії для розвитку і активізації діазотрофів; індукції синтезу азотасиміляторних ферментів рослини, що може привести до більш швидкого зниження концентрації зв'язаних форм азоту в кореневій зоні до оптимальних показників, які не гальмують синтез нітрогенази в клітинах діазотрофів.

Рістстимулятори активізують асоціативну азотфіксацію як в разі передпосівного обробітку насіння, так і при нанесенні їх розчинів на вегетативну масу рослин, що ставить їх в розряд найефективніших факторів впливу на процес асоціативної азотфіксації при вирощуванні злакових трав в суміші, або в умовах різнотрав'я на природньо сформованих угіддях. Застосування синтетичних рістстимуляторів для передпосівного обробітку насіння чи обприскування надземної маси сприяє збільшенню урожайності травостоїв на 15-35%.

Показано, що мінеральний азот виступає не тільки фактором “старту” азотфіксуючої системи, а й прийомом підтримки її в активному стані через забезпечення конструктивного та енергетичного метаболізму. Зниження концентрації азоту в ґрунті нижче фізіологічного оптимуму приводить і до зниження активності процесу азотфіксації.

Розроблена система раціонального використання мінеральних азотних добрив під злакові трави з використанням тесту азотфіксуючої активності як фактору визначення екологічної доцільності їх застосування. Використанням цієї системи в умовах вирощування трав на дерново-підзолистих та сірих лісових ґрунтах обґрунтовано внесення мінеральних азотних добрив роздільним способом в дозах до 80 кг/га, екологічно прийнятним є збільшення дози азоту до 120 кг/га. Доза азоту 160 кг/га є екологічно пороговою. Подальше підвищення концентрації мінерального азоту в ґрунті є недоцільним.

Фізіологічний оптимум мінерального азоту для рослин зростає при інокуляції та обробці рослин рістстимуляторами, що є економічно і екологічно вигідним, оскільки при цьому зростає коефіцієнт використання добрив рослинами і значно зменшується ризик надлишкового надходження азотних сполук в водоймища та атмосферу.

16. Економічний ефект від застосування інокуляції трав складає 193 грн./га і більше; молібдену – 115 грн./га; стимуляторів росту рослин – 156 грн./га. При внесенні мінеральних азотних добрив до 80 кг/га зростає їх економічна ефективність. Подальше збільшення дози мінерального азоту веде до зниження ефективності його застосування.

### РЕКОМЕНДАЦІЙ ВИРОБНИЦТВУ

При вирощуванні злакових трав в чистому вигляді на зелену масу чи насіння слід застосовувати передпосівну інокуляцію активними штамми азотфіксуючих бактерій. Зокрема для пажитниці однорічної, пажитниці пасовищної та стоколосу безостого – бактеріальний препарат діазобактерин. Застосування інокуляції сприяє підвищенню активності процесу асоціативної азотфіксації, засвоєнню рослинами біологічного азоту та збільшенню урожайності культур на 15-20%.

В умовах вирощування трав в сумішці, або на природньо сформованих угіддях для підвищення інтенсивності процесу асоціативної азотфіксації та надходження біологічного азоту в рослини слід застосовувати солі молібдену, або стимулятори росту рослин ауксинової та цитокінінової дії. Застосування рістстимуляторів є економічно вигідним агроприйомом, оскільки урожайність трав при цьому зростає до 35%; гектарна ж доза їх не перевищує 10 г при ціні 1 га/порції біля 1,5 грн.

Для одержання екологічно чистої продукції при вирощуванні злакових трав на дерново-підзолистих та сірих лісових ґрунтах необхідно вносити мінеральний азот в дозах, що не перевищують 160 кг/га при внесенні добрив роздрібним способом. Інокуляцію та обробку стимуляторами росту рослин доцільно застосовувати в поєднанні з внесенням мінерального азоту. При цьому суттєво зростає ефективність використання рослинами добрив, що важливо як в економічному, так і в екологічному відношеннях.

### ОСНОВНІ РОБОТИ, НАДРУКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙ.

1. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В. Азотфиксирующая бактерия *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) в почве, ризосфере и ризоплане сельскохозяйственных растений // Микробиол. ж. – 1984. – 46, №1. – С.6-8.
2. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В. Активность азотфиксации в корневой зоне небобовых растений // Микробиол. ж. – 1985. – 47, №3. – С.18-22.

3. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В. Активность процесса азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы в ризосфере и на корнях небобовых культур // Бюл. ВНИИСХМ. – 1985. – №42. – С.44-48.
4. Волкогон В.В., Осецкий С.И. Влияние минерального азота на активность процесса азотфиксации в ризоплане кормовых злаков // Бюлл. ВНИИСХМ. – 1986. – №43. – С.37-41.
5. Волкогон В.В. Влияние азотного удобрения на активность азотфиксации в зоне корней райграса и костреца // Исп. достиж. микробиол. науки в повыш. эффективности земледелия. – Киев. – 1989. – С.28-29.
6. Волкогон В.В., Хальчицкий А.Е., Миняйло В.Г., Онищенко Л.И., Лемешко С.В. Азотфиксирующие микроорганизмы корневой зоны райграса пастбищного и костреца безостого // Микробиол. ж. – 1991. – 53, №6. – С. 3-8.
7. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В., Миняйло В.Г., Шевчук Е.Н., Макаренко П.С., Назаров С.Г., Краснобрыжий Н.Я. Препараты азотфиксирующих микроорганизмов и повышение продуктивности травостоя // Вісник аграрної науки. – 1992. – №8. – С.38-41.
8. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В., Надкерничная Е.В., Лохова В.И., Лемешко С.В. Азотфиксирующая активность азоспирилл в ассоциации с растениями некоторых видов злаковых культур // Экология и биотехнология азотфиксирующих почвенных микроорганизмов. – С.-Пт. – 1991. – С.66-73.
9. Волкогон В.В., Мамчур А.Е., Лемешко С.В., Миняйло В.Г. Азоспириллы – эндофиты семян злаковых растений // Микробиол. ж. – 1995. – 57, №1. – С.14-18.
10. Мальцева Н.Н., Волкогон В.В., Надкерничная Е.В. Азотфиксирующие ассоциации азоспирилл и некоторых видов злаковых культур // Микробиол. ж. – 1995. – 57, №1. – С.24-30.
11. Волкогон В.В., Миняйло В.Г., Лемешко С.В., Онищенко Л.И. Специфичность взаимодействия бактерий рода *Azospirillum* со злаковыми травами // Микробиол. ж. – 1995. – 57, №3. – С.9-15.
12. Волкогон В.В., Дульнев П.Г., Ковтун Е.П., Носовец Е.И., Онищенко Л.И. Влияние фитогормонов и их синтетических аналогов на активность ассоциативной азотфиксации // Микробиология. – 1996. – 65, №6. – С.850-854.
13. Волкогон В.В., Миняйло В.Г., Онищенко Л.И., Носовец Е.И., Шевчук Е.Н. Влияние молибдена на активность процесса ассоциативной азотфиксации // Физиология и биохимия культурных раст. – 1997. – 29, №1. – С.32-36.

14. Вилесов Г.И., Давыдова О.Е., Мальцева Н.Н., Дульнев П.Е., Волкогон В.В., Черняева И.И. Биологическая фиксация молекулярного азота при использовании аммонийно-карбонатных соединений // Микробиол. ж. – 1997. – 54, №4. – С.54-57.
15. Волкогон В.В. Влияние стимуляторов роста растений на активность процесса ассоциативной азотфиксации // Микробиол. ж. – 1997. – 59, №4. – С.70-78.
16. Волкогон В.В. Методичні рекомендації по визначенню активності азотфіксації в ґрунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом. – Чернігів: ЦНТИ. – 1997. – 12 с.
17. Волкогон В.В. Эффективность бактериализации злаковых трав азоспириллами // С.-х. биология. – 1997. – №5. – С.73-78.
18. Патица В.В., Волкогон В.В. Можливості використання біологічного азоту в сучасному землеробстві // Зб. наук. праць Інституту землеробства УААН. – 1997. – вип.2. – С.72-75.
19. Волкогон В.В. Вплив інокуляції та рістстимуляторів на фізіологічний оптимум мінерального азоту для рослин // Зб. наук. праць Інституту землеробства УААН. – 1997. – вип. 2. – С.85-88.
20. Волкогон В.В. Приемы регулирования активности ассоциативной азотфиксации // Бюл. Инст. сільськогосп. мікробіології. – 1997. – №1. – С.17-19.
21. А.с. 1473345 СССР, МКИ С12N 1/20. Штамм бактерий *Azospirillum lipoferum* для производства бактериального удобрения под райграс пастбищный // Н.Н.Мальцева, В.В.Волкогон (СССР) – №4235397/10-13; Заявлено 27.04.87. Без опубл.
22. А.с. 1796603 СССР, МКИ С05F 11/08, С12N 1/12. Штамм бактерий *Azospirillum brasilense* для производства бактериального удобрения под козлец безостый / В.В.Волкогон, Н.Н.Мальцева, Л.И.Онищенко, В.Г.Миняйло, Т.В.Харченко, С.В.Лемешко, Е.Н.Шевчук (СССР) – №4893865/13; Заявлено 25.12.90. Опубл. 23.02.93. Бюл. №7. – 4с.
23. Пат. 1806123 СССР, МКИ С05F 11/08, С12N 1/20. Штамм бактерий *Azospirillum lipoferum* для производства удобрения под райграс пастбищный и козлец безостый / В.В.Волкогон, Н.Н.Мальцева, Л.И.Онищенко, В.Г.Миняйло, Т.В.Харченко, С.В.Лемешко, Е.Н.Шевчук (СССР) – №4916559/13; Заявлено 05.03.91. Опубл. 30.03.93. Бюл. №12. – 6с.
24. Пат. 5703 Україна, МКИ С05F 11/08, С12N1/20. Штамм бактерій *Azospirillum lipoferum* В-37 для виробництва добрив під райграс пасовищний і стоколос базостий / В.В.Волкогон, Н.Н.Мальцева, Л.І.Онищенко, В.Г.Міняйло, Т.В.Харченко, С.В.Лемешко, Є.М.Шевчук (Україна) – №4916558/13; Заявл. 24.6.93; Опубл. 28.12.94, Бюл. №7-1. – 6с.
25. Волкогон В.В. Отзывчивость райграса пастбищного на предпосевную инокуляцию семян азоспириллами // Матер. респ. конф. (Вильнюс, 1986). – Вильнюс. – 1986. – С.70-71.

26. Волкогон В.В. Влияние инокуляции райграса пастбищного азоспириллами на режим азотного питания растений // Симбиотроф. азотфиксаторы и их исп. в сель. хоз. Респ. конф. (Чернигов, 1986). – Киев. – 1986. – С.77-79.
27. Волкогон В.В. Экологические исследования бактерий рода *Azospirillum* // Микроорганизмы в сель. хоз. 3-я Всес. конф. (Москва, 1986). – Москва. – 1986. – С.90-91.
28. Волкогон В.В. Влияние минерального азота на diaзотрофы зоны корней райграса и костреца // Микроорганизмы в сельс. хоз. Респ. конф. (Кишинев, 1988). – Кишинев. – 1988. – С.123-124.
29. Волкогон В.В., Мальцева Н.Н., Миняйло В.Г., Онищенко Л.И., Шевчук Е.Н., Кисель А.И., Лень В.С. Оптимизация азотного питания злаковых трав // Тез. докл. 3-го съезда почвов. и агрохим. УССР. – Харьков. – 1990. – С.28-29.
30. Волкогон В.В., Миняйло В.Г., Лемішко С.В. Вплив асоціативних діазотрофів на продуктивність райграсу пасовищного та стоколосу безостого // Біол. фіксація молек. азоту і азотний метаболізм боб. рослин. Респ. конф. (Тернопіль, 1991). – Київ. – 1991. – С.16.
31. Миняйло В.Г., Волкогон В.В. Роль молибдена в регулировании активности ассоциативной азотфиксации. // Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Всес. конф. (Москва, 1992). – Пушкино. – 1992. – С.136.
32. Волкогон В.В., Мамчур А.Е., Лемешко С. В. Азоспириллы в семенах злаковых трав // Микроорганизмы в сельском хозяйстве. Всес.конф. (Москва, 1992). – Пушкино. – 1992. –С.31-32.
33. Волкогон В.В., Миняйло В.Г., Кутова Н.О. Застосування солей молібдену для підвищення продуктивності злакового травостою // Екологія Полісся: проблеми, сучасність, майбутнє. Матеріали конф. (Луцьк, 1993), част. I. – Харків. – 1993. – С.110-111.
34. Волкогон В.В., Ковтун К.П. Застосування біостимуляторів росту – ефективний прийом забезпечення рослин біологічним азотом // Матеріали I-ї Всеукр. Конф. по проблемі “Корми і кормовий білок “. – Вінниця. – 1994. – С.241-243.
35. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксаторы корневой зоны кормовых злаков // Микробиол. ж. – 1994. – 56, №2. – С.40-41.
36. Волкогон В.В., Ковтун К.П., Миняйло В.Г. Влияние ростстимулирующих веществ на азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. ж. – 1994. – 56, №1. – С.41.
37. Volkogon V.V., Lemeshko S.V., Mamchur A.E., Volkogon E.I. The peculiarities of forming associations “grasses – diazotrophs” // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. I.A. Tikhonovich et.al. (eds.). – Kluwer Academic Publishers. – 1995. – P.782.

38. Volkogon V.V. Diazotrophs seed participation in the forming of associations with plants. // Workshop on associative interactions of nitrogen-fix. bacteria with plants (Saratov, 1995). Abstr. – Saratov, 1995. – P.52.
39. Volkogon V.V. The ways of potential increase for nitrogen-fixing activity in grasses root zone // 2<sup>nd</sup> European Nitrogen Fixation Conference “Biol. Fixation of Nitrogen for Ecology and sustainable Agriculture” (Poznan, 1996). – Poznan. – 1996. – P.185.
40. Vilesov G., Davydova O., Manuilsky V., Maltseva N., Dulnev P., Volkogon V., Tchernyaeva I. Biological fixation of molecular nitrogen by legumes and cereals while using agrochemical vidaks // 2<sup>nd</sup> Eur. Nitrogen Fix. Conf. (Poznan, 1996). – Poznan, 1996. – P.201.
41. Volkogon V.V. Influence of plant growth promoting at associative nitrogen-fixing activity // 7<sup>th</sup> Int. Symp. on BNF with Non-Legumes (Faisalabad, 1996) – Faisalabad, 1996. – P.138.
42. Волкогон В.В. Оцінка засобів підвищення потенціалу азотфіксуючої активності в кореневій зоні трав // Наслідки наук. пошуку молод. вчених-аграрників в умовах реформування АПК. Матер. міжнар. конф. – Чабани. – 1996. – С.28.
43. Волкогон В.В. Увеличение продуктивности райграса однолетнего // Информ. листок. – Черниговский ЦНТИ. – 1996. – 3с.
44. Vilesov G.I., Davydova O.E., Maltseva N.N., Dulnev P.G., Volkogon V.V., Activity of biological nitrogen fixation while using new agrochemical // 11<sup>th</sup> Int. Congr. on Nitrogen Fixation (Pariz, 1997): Abstr. – Pariz, 1997. – P.76.

Волкогон В.В. Особливості формування азотфіксуючих асоціацій бактерій з травами та регулювання їх активності.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія, – Інститут землеробства УААН, Київ, 1998.

Захищається 44 роботи, які містять матеріали досліджень угруповань азотфіксуючих бактерій кореневої зони шести видів багаторічних злакових трав – пажитниці, тимофіївки, грястиці, костриці, стоколоса, очеретянки. Показано, що внутрішні тканини насіння рослин колонізовані специфічними до виду рослин діазотрофами, які можуть виступати основним джерелом мікроорганізмів для кореневої зони. Встановлено, що ефективність інокуляції знижується в часі. Асоціативні азотфіксатори специфічні до виду рослин, тому при вирощуванні трав в суміші позитивний ефект від інокуляції одного компонента може нівелюватись невідомою іншого. На формування і активність азотфіксуючих асоціацій впливають солі молібдену, фітогормони та їх синтетичні аналоги, мінеральний азот. Азотні добрива є не тільки фактором “старту” азотфіксуючих асоціацій, а й постійно необхідні в невисоких концентраціях. Інокуляція і стимулятори росту сприяють збільшенню фізіологічного оптимуму азоту для рослин.

Ключові слова: асоціативна азотфіксація, діазотрофи, інокуляція, ендодіти насіння, екосистема, молібден, фітогормони, стимулятори росту рослин, мінеральний азот.

Волкогон В.В. Особенности формирования азотфиксирующих ассоциаций бактерий с травами и регулирования их активности.

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.07 – микробиология. Институт земледелия УААН, Киев, 1998.

Защищается 44 работы, содержащие материалы исследований сообществ азотфиксирующих микроорганизмов корневой зоны шести видов многолетних злаковых трав – райграса, тимофеевки, ежи, овсяницы, костреца, канареечника. Показано, что внутренние ткани семян растений колонизированы специфическими к виду растения диазотрофами, которые могут служить основным источником микроорганизмов для корневой зоны. Установлено, что эффективность инокуляции снижается во времени. Ассоциативные азотфиксаторы специфичны к виду растения, поэтому при выращивании трав в смеси положительный эффект от инокуляции одного компонента может нивелироваться неотзывчивостью другого. На формирование и активность азотфиксирующих ассоциаций влияют соли молибдена, фитогормоны и их синтетические аналоги, минеральный азот. Азотные удобрения служат не только фактором “старта” азотфиксирующих ассоциаций, но постоянно необходимы в невысоких концентрациях. Инокуляция и стимуляторы роста способствуют увеличению физиологического оптимума азота для растений.

Ключевые слова: ассоциативная азотфиксация, диазотрофы, инокуляция, эндодиты семян, экосистема, фитогормоны, стимуляторы роста растений, минеральный азот.

Volkogon V.V. The peculiarities of forming nitrogen fixation associations of bacterias with grasses and of regulating their activity.

Dissertation submitted for the degree of Doctor of Sciences, specialization 03.00.07 – microbiology, Institute of Agriculture of the UAAS, Kiev, 1998.

The material of 44 scientific publications on investigations of nitrogen fixated microorganisms associations of root zone of six types of perennial cereals grasses – *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Dactylus glomerata*, *Festuca pratensis*, *Zerna inermis*, *Phalaroides aruginacea*. It has been shown that internal tissues of plants' seeds are colonized by specified towards the type of a plant diazotrophes, which can be the main source of microorganisms for root zone. It has been established that inoculation efficiency is becoming lower in time. Associative nitrogen fixators are specified towards the types of plant, that's why while growing mixed grasses positive effect of inoculation of one component can be levelled by unsympathy of another one. Molibdenum salts, phytohormones and their synthetical analogys, mineral nitrogen influence on the forming and activity of nitrogen fixing associations. Nitrogen fertilizers serve not only as a factor of "start" of nitrogen fixating association, but they are constantly needed in low concentrations. Inoculation and stimulators of growing promote the increase of physiological optimum of nitrogen for plants.

Key words: associative nitrogen fixation, diazotrophs, inoculation, ecosystem, molibdenum, phytohormones, plants' growth stimulators, mineral nitrogen.

РНО «РТВ». ЗАК. 7. ТИР. 100 ЭКЗ.  
30.12.1997  
УМ. ДРУК. АРК. 2,0

1124007

AB 39.509

**AB 39.509**