

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

КОЗАР СЕРГІЙ ФЕДОРОВИЧ

УДК 579.22:631.147

**ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА УПРАВЛІННЯ АКТИВНІСТЮ
ДІАЗОТРОФІВ ЗА ЇХ ІНТРОДУКЦІЇ В АГРОЦЕНОЗИ СОЇ**

03.00.07 «Мікробіологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора сільськогосподарських наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України

Науковий консультант доктор сільськогосподарських наук, професор,
член-кореспондент НААН
Волкогон Віталій Васильович,
Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН,
начальник відділу сільськогосподарської
мікробіології

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Патика Тетяна Іванівна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри ґрунтознавства
та охорони ґрунтів імені М. К. Шукучи

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Пасічник Лідія Анатоліївна,
Інститут мікробіології і вірусології
імені Д. К. Заболотного НАН України,
старший науковий співробітник
відділу фітопатогенних бактерій

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Дем'янюк Олена Сергіївна,
Інститут агроекології
і природокористування НААН,
заступник директора з наукової роботи

Захист відбудеться «06» листопада 2019 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.21 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «04» жовтня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. С. Павлов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Успіхи досліджень щодо ролі ґрунтових азотфіксувальних бактерій у живленні рослин дозволили довести, що ці мікроорганізми сприяють надходженню десятків мільйонів тонн біологічного азоту в ґрунти щорічно (Патика В. П. та ін., 2003). В Україні та інших країнах досліджується можливість інтродукції різних видів діазотрофів у кореневу зону культурних рослин за передпосівної бактеризації насіння (Волкогон В. В. та ін., 2006; Коць С. Я. та ін., 2007; Saharan B. et al., 2011). При цьому одним із найскладніших питань є регулювання активності діазотрофів (Valladares A. et al., 2003; Dixon R. et al., 2004). Так, оптимізація ростової активності цих бактерій в умовах *in vitro* обумовлюється необхідністю отримання технологічних у виготовленні і застосуванні біопрепаратів з високим титром клітин, які б зберігали свою життєздатність і функціональну активність максимально довгий час (Stephens J. H. G., Rask H. M., 2000). Низька чисельність мікроорганізмів в інокулянтах призводить до значного зниження їх ефективності, що зумовлено також зменшенням функціональної (зокрема, азотфіксувальної) активності діазотрофів. Крім того, на їх активність можуть впливати температура, наявність в оточуючому середовищі хімічних сполук різної природи, продуктів життєдіяльності мікро- і макроорганізмів тощо (Abadi D. N., Hagozy M. N., 1995; Стоянова Ю. С., 1997).

Забезпечити високу ростову й функціональну активність, а також ефективність застосування азотфіксувальних бактерій можливо за рахунок регулювання впливу абіотичних чинників, зокрема, шляхом підбору оптимальних поживних середовищ і стабілізації їх фізико-хімічних властивостей за рахунок добавок (Курдиш І. К., 2011; Xiaomei J., 2015). Оскільки у природі азотфіксатори функціонують в асоціаціях, що забезпечує їм низьку перевагу, одним із дієвих біотичних чинників покращення якості інокулянтів може бути використання змішаних культур мікроорганізмів. В окремих роботах (Ferguson B. J., Mathesius U., 2003; Коць С. Я. та ін., 2009; Argaw A., 2012) розглянуто питання поєднання різних видів азотфіксувальних бактерій. Проте через складність питання як у дослідженнях, так і на практиці бактерії використовують переважно в чистих культурах. Спроби поєднання у штучному комплексі мікроорганізмів різних видів не завжди забезпечують успіх, що свідчить про необхідність проведення досліджень, орієнтованих на можливість суміщення різних азотфіксувальних бактерій в інокулюмі для забезпечення їх вищої ефективності.

Отже, сьогодні є актуальним пошук шляхів регулювання ростової і функціональної активності діазотрофів, зокрема *Bradyrhizobium japonicum*, з визначенням умов, які сприяють тривалому збереженню життєздатності цих бактерій та максимальній реалізації їх азотфіксувального потенціалу. Це дозволить виявити нові закономірності життєдіяльності азотфіксувальних бактерій, а також є необхідним для удосконалення мікробних інокулянтів з метою підвищення їх технологічності й ефективності при застосуванні у сучасних технологіях вирощування сільськогосподарських культур.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в лабораторії фізіології мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН за науково-технічною програмою УААН на 2001–2005 рр. «Наукові основи сталих агроєкосистем», завдання «Розробити нові форми бактеріальних препаратів та удосконалити технології виробництва існуючих» (номер державної реєстрації 0101U003750); науково-технічною програмою УААН на 2001–2005 рр. «Землеробство», завдання «Вивчити вплив препаратів нового покоління на поліпшення живлення рослин та зниження ураженості їх грибними хворобами» (номер державної реєстрації 0103U002432); науково-технічною програмою УААН на 2006–2010 рр. «Сільськогосподарська мікробіологія», завдання «Виявити закономірності росту активних штамів ґрунтових діазотрофів у бактеріальній популяції *in vitro*» (номер державної реєстрації 0107U008117), завдання «Визначити оптимальні умови культивування ефективних ґрунтових мікроорганізмів та розробити дослідно-промислові технології виготовлення нових мікробних препаратів» (номер державної реєстрації 0106U004282); науково-технічною програмою НААН на 2011–2015 рр. «Сільськогосподарська мікробіологія», завдання «Розробити ефективні способи регулювання росту і життєздатності ґрунтових діазотрофів у контрольованих умовах» (номер державної реєстрації 0111U000983); науково-технічною програмою НААН на 2016–2020 рр. «Сільськогосподарська мікробіологія», завдання «Дослідити вплив нанокарбоксилатів металів на ростову і функціональну активність азотфіксувальних бактерій з метою їх ефективної інтродукції в агроценози» (номер державної реєстрації 0116U003074), завдання «Дослідити особливості переходу діазотрофів у стан спокою за дії речовин різного хімічного складу» (номер державної реєстрації 0116U003073).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертації – теоретично обґрунтувати та експериментально підтвердити стратегію регулювання ростової й функціональної активності діазотрофів для їх ефективної інтродукції в агроценози сої.

У відповідності до поставленої мети дослідження проводили за наступними завданнями:

– дослідити підходи управління активністю ґрунтових діазотрофів та запропонувати стратегію регулювання ростової й функціональної активності бактерій *B. japonicum* для їх ефективної інтродукції в агроценози сої;

– дослідити вплив культуральної рідини представників діазотрофів на ростову активність бульбочкових бактерій сої в умовах *in vitro*;

– вивчити ростову активність *B. japonicum* та *A. brasilense* в чистих і змішаних культурах;

– дослідити активність продукування фітогормонів і пектинолітичну активність *B. japonicum* та *A. brasilense* в чистій і змішаній культурі;

– здійснити порівняльний аналіз впливу перспективних комплексів діазотрофів та моноінокуляції на активність азотфіксації у кореневій зоні рослин сої;

– створити комплексний інокулянт на основі змішаної культури *B. japonicum* та *A. brasilense*;

– розробити спосіб отримання інокулянта для сої з подовженим терміном зберігання;

– дослідити вертикальну міграцію сполук біогенних елементів за межі кореневмісного шару ґрунту за дії комплексної інокуляції діазотрофами насіння сої;

– вивчити вплив комплексного застосування діазотрофів на продуктивність сої;

– дослідити ефективність передпосівної обробки насіння сої інокулянтами на основі комплексу ризобактерій за основними економічними та енергетичними показниками.

Об'єкт дослідження – процеси ростової і функціональної активності азотфіксувальних бактерій.

Предмет дослідження – теоретико-методологічні та практичні аспекти регулювання активності *B. japonicum* у змішаній культурі за інтродукції в агроценози сої.

Методи досліджень: лабораторні (культурально-морфологічні; глибинного культивування; рідкофазної ферментації; світлової та електронної мікроскопії; біохімічних і фізіологічних тестів; генетичного маркування; газохроматографічний) – для визначення фізіолого-біохімічних і культурально-морфологічних властивостей мікроорганізмів, параметрів їхнього росту і фізіологічної активності; вегетаційні та польові – для визначення ефективності використання мікроорганізмів й інокулянтів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур, а також вплив на мікробіологічні параметри ризосферного ґрунту; математично-статистичні – для розрахунку вірогідності отриманих результатів досліджень, залежності між різними чинниками і процесами.

Наукова новизна одержаних результатів. На основі теоретичного обґрунтування і проведених комплексних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів опрацьовано управління ростовою і функціональною активністю діазотрофів за їх комплексної інтродукції в агроценози сої.

За матеріалами наукових досліджень вперше:

– розроблено стратегію регулювання активності ґрунтових азотфіксувальних бактерій для їх ефективної інтродукції в агроценози, яка полягає в поєднанні різних видів діазотрофів, підборі умов їх спільного культивування і застосування для забезпечення позитивної взаємодії за формою коменсалізму, а також у використанні добавок-стабілізаторів, які підвищують життєздатність бактерій;

– досліджено взаємовідносини азотфіксувальних бактерій, які належать до родів *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, та доведено можливість поєднання цих мікроорганізмів у комплементарні пари;

– встановлено, що на ріст популяції *B. japonicum* в умовах *in vitro* істотно впливають метаболіти симбіотичних і асоціативних діазотрофів. Виявлено, що

найвища ростова активність бульбочкових бактерій спостерігається за дії культуральної рідини *A. brasilense*;

– досліджено закономірності росту активних штамів *B. japonicum* та *A. brasilense* в чистих і змішаних культурах, а також розроблено нові поживні середовища для культивування *B. japonicum*;

– визначено умови культивування *B. japonicum* у новому рідкому напівсинтетичному середовищі, що забезпечує збереження життєздатності і функціональної активності мікроорганізмів;

– науково обґрунтовано та експериментально доведено доцільність створення нових мікробних інокулянтів на основі змішаних культур діазотрофів для підвищення врожайності сої, про що свідчить утворення ефективного рослинно-мікробного симбіозу та підвищення активності азотфіксації *B. japonicum*;

– показано, що за поєднання бульбочкових бактерій сої і азоспірил змінюється активність продукування цими мікроорганізмами позаклітинних фітогормонів, а також пектинолітична активність;

– встановлено зменшення втрат вологи, сполук біогенних елементів та водорозчинного гумусу за межі кореневмісного шару ґрунту при вирощуванні сої за впливу передпосівної комплексної інокуляції насіння сої діазотрофами *B. japonicum* та *A. brasilense*.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами досліджень розроблено способи: підвищення ростової активності бактерій; підтримання життєздатності *B. japonicum*; виготовлення бактеріального препарату для бактеризації сої.

Апробовані в роботі підходи використано під час вивчення змішаних культур корисних ґрунтових мікроорганізмів різних видів та створення нових інокулянтів на їх основі. Спосіб підтримання життєздатності *B. japonicum* використано при виготовленні мікробного препарату Ризогуміну.

Результати наукових досліджень використано для підготовки рекомендацій з ефективного застосування мікробних препаратів для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, а також у процесі викладання дисциплін «Мікробіологія», «Сільськогосподарська мікробіологія», «Технології виробництва мікробних препаратів для сільського господарства», «Застосування мікробних препаратів у рослинництві» з наряду підготовки «Агрономія».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Ним опрацьовано відповідну наукову літературу, висунуто робочу гіпотезу і концепцію, обґрунтовано і підготовлено програму досліджень, проведено лабораторні, вегетаційні, польові та виробничі дослідження. У працях, які опубліковані у співавторстві, частка авторства здобувача полягає в плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальненні та опрацюванні результатів, підготовці рукописів до друку. Здобувачем самостійно проаналізовано теоретичні і практичні положення, здійснено математико-статистичну обробку отриманих даних та підготовлено текст дисертації.

Проведення електронно-мікроскопічних досліджень здійснено спільно з провідним інженером В. М. Стрекаловою. Визначення активності продукування мікроорганізмами позаклітинних фітогормонів виконано за допомоги кандидата біологічних наук Н. О. Леонової.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, основні положення та висновки дисертації доповідались та обговорювались на: Міжнародній науковій конференції «Онтогенез рослин, біологічна фіксація молекулярного азоту та азотний метаболізм» (м. Тернопіль, 2001 р.); Міжнародній науковій конференції «Сталий розвиток агроecosystem» (м. Вінниця, 2002 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасного землеробства» (м. Луганськ, 2003 р.); X з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Одеса, 2004 р.); XII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Ужгород, 2009 р.); Міжнародній конференції «Мікробіологія в решении современных проблем сельскохозяйственного производства» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2011 р.); XIII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Ялта, 2013 р.); Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Microbiological aspects of optimization of the production process of cultured crops» (м. Чернігів, 2015 р.); V з'їзді Українського товариства фізіологів рослин (м. Київ, 2017 р.); XV з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Одеса, 2017 р.).

Публікації. Результати досліджень опубліковано в 48 наукових працях, з яких 3 монографії, 15 статей у наукових фахових виданнях України, 8 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, 3 патенти України на корисні моделі, 9 науково-методичних праць та рекомендацій виробництву, 9 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, восьми розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 345 сторінок. Робота містить 54 таблиці та 47 рисунків. Список використаних джерел налічує 604 найменування, у т. ч. 274 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

НАУКОВО-ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ҐРУНТОВИХ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА ЇХ ІНТРОДУКЦІЇ В АГРОЦЕНОЗИ

У розділі здійснено аналіз сучасного стану вивчення питань регулювання активності діазотрофів. Відзначено, що на ростову і функціональну активність азотфіксувальних бактерій впливають як абіотичні, так і біотичні чинники. Здійснено аналіз досліджень, спрямованих на регулювання активності мікроорганізмів за рахунок підбору поживних середовищ, дії хімічних сполук різної природи, температури, вологості. Здійснено огляд джерел літератури щодо використання змішаних культур мікроорганізмів. Показано принципову

можливість досягнення синергічного ефекту при використанні змішаних культур бактерій. Зважаючи на суттєву роль цих мікроорганізмів у живленні сільськогосподарських культур і підвищенні їх урожайності, розглядається перспектива їх використання для інокуляції сої. Наведено обґрунтування доцільності передпосівної бактеризації насіння мікроорганізмами різних видів з урахуванням низки аспектів.

МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА УМОВИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Бактерії, які використано у роботі: *Bradyrhizobium japonicum* М-8, *B. japonicum* 6346, *Azospirillum brasilense* 18-2, *A. brasilense* 410, *A. brasilense* sp.7, *Azotobacter chroococcum* М-70, *A. vinelandii* М-Х, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* 2486, *R. leguminosarum* bv. *viceae* 250a, *R. leguminosarum* 31, *R. radiobacter*=*Agrobacterium radiobacter* 204, *Enterobacter aerogenes* 30-ф, *Pseudomonas fluorescens* В-17. Мікроорганізми отримано з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

У роботі використано сорти: сої – Легенда, Сузір'я, Полтава; пшениці озимої – Поліська 90; жита озимого – Боротьба; ячменю ярого – Гонар. Польові досліді проведено на лучно-чорноземному вилугуваному легкосуглинковому ґрунті. Планування і проведення польових дослідів виконано за Доспеховим (Доспехов Б. А., 1985). Лізиметричні досліді проведено у лізиметричній установці Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, яка має 48 секцій-лізиметрів, розміщених двома паралельними рядами по 24 лізиметри в кожному. Під ними встановлено посудини-приймачі для збирання інфільтрату. Лізиметричні чарунки заповнено ґрунтом (10 м³) послідовно, починаючи з материнської породи з урахуванням потужності генетичного горизонту.

Для проведення лабораторних досліджень ростової активності *B. japonicum* бактерії культивували у рідких напівсинтетичних поживних середовищах, до складу яких входили в різних концентраціях: відвар насіння гороху або люпину, кукурудзяний екстракт, дріжджі пекарські і кормові, меляса, глюкоза, маніт, цукор, (NH₄)₂SO₄, КН₂РО₄×2Н₂О, К₂НРО₄, MgSO₄×7Н₂О, СаСО₃, (NH₄)₂МоО₄. Для відповідних варіантів дослідів до поживних середовищ додавали стерилізовану бактеріальну суспензію досліджуваних діазотрофів з розрахунку 0,1 %, 1,0 %, 3,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 20,0 %, 50,0 % від об'єму середовища.

При дослідженні впливу нанокарбоксилатів металів на ріст й функціональну активність діазотрофів до поживних середовищ додавали нанокарбоксилати цинку (Zn), купруму (Cu), мангану (Mn), феруму (Fe) та молібдену (Mo), отримані за взаємодії відповідного металу, оксиду металу або гідроксиду металу з лимонною кислотою у водному колоїдному розчині (Косінов М. В., Каплуненко В. Г., 2009).

Оптимізацію середовища здійснювали, використовуючи алгоритм визначення ефектів впливу факторів, що змінюються, на процес сумісного

культивування представників родів *Bradyrhizobium* і *Azospirillum* (Бирюков В. В., Кантере В. М., 1985).

Культивування мікроорганізмів здійснювали глибинно у періодичній культурі в 0,1 л колбах і 3 л скляних бутлях на підвісних мікробіологічних качалках при частоті коливань робочої платформи 220 об./хв і температурі 28 ± 1 °С. Дослідно-промисловою технологією культивування бактерій відпрацьовували в реакторі біологічному БІОР-0,25. Для аерації у реакторі біологічному використовували стерильне повітря, яке очищували за допомогою системи фільтрів ZANDER.

Чисельність і параметри росту мікроорганізмів у бактеріальній суспензії визначали мікробіологічними методами (Перт С. Д., 1978; Шлегель Г., 1987). Зокрема, визначали такі основні параметри росту бактерій: константу швидкості поділу, час генерації, константу швидкості росту, час подвоєння біомаси. Для оцінки взаємодії бактерій використовували симбіотичний індекс (S. I.), який є кількісною мірою впливу однієї культури на іншу й виражається через відношення приросту біомаси культур до початкової її кількості (Печуркин Н. С., 1981).

Визначення активності азотфіксації мікроорганізмів проводили ацетиленовим методом (Hardy R. W. F. et al., 1968) на газовому хроматографі Chrom-4 з полум'яно-іонізаційним детектором. Сорбційні колонки зі сталі заповнювали сорбентом Porapak Q 60–80 mesh. Температура термостату 40 °С. Витрата газів: водню – 15 см³/хв, азоту – 100 см³/хв, повітря – 500 см³/хв.

Електронномікроскопічні дослідження бактерій у чистій і змішаній культурі здійснювали методом негативного контрастування ураніацетатом за використання електронного мікроскопа EM-125 (Україна).

Чисельність представників окремих фізіолого-трофічних груп мікроорганізмів у ризосферному ґрунті рослин визначали шляхом глибинного висіву на агаризовані середовища (Звягинцев Д. Г., 1980): м'ясо-пептонний агар для обліку мікроорганізмів, які використовують органічні форми азоту, крохмало-аміачний агар – для мікроорганізмів, що засвоюють переважно азот мінеральних сполук. Кількість мікроміцетів визначали на підкисленому середовищі Чапека.

Позаклітинні фітогормони ауксини, цитокініни, гібереліни і абсцизову кислоту виділяли із супернатантів культуральних рідин ґрунтових мікроорганізмів шляхом екстракції наступними розчинниками: етилацетатом (ауксини, абсцизова кислота), рН 3,0; етилацетатом (гібереліни), рН 2,5; н-бутанолом (цитокініни), рН 8,0 (Lee I. J., Foster K. R., Morgan P. W., 1998). Екстракти випарювали під вакуумом при 40–45 °С. Сухий залишок перерозчиняли у 80 % етанолі, переносили у мікропробірки. Отримані екстракти використовували для накопичувальної тонкошарової хроматографії з подальшим проведенням якісного і кількісного визначення фітогормонів методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC/MS). HPLC/MS аналіз фітогормональних екстрактів штамів ґрунтових мікроорганізмів виконано у Центрі колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України. Для порівняння

використовували стандартні синтетичні фітогормони *Sigma* (Німеччина) і *Acros Organic* (Бельгія). Пектинолітичну активність визначали за модифікованим методом (ГОСТ 20264.3-81).

Вміст нітратів у промивних лізіметричних водах досліджували дисульфофеноловим методом, амонійного азоту – з реактивом Неслера, водорозчинного P_2O_5 – за Кірсановим, K_2O – полум'яно-фотометричним методом, CaO і MgO – комплексометричним методом, водорозчинного гумусу – за Тюріним (Аринушкина Э. В., 1970).

Вміст хлорофілів *a* і *b* визначали спектрофотометричним методом (Починок Х. Н., 1971). Біометричні показники рослин та врожайність сільсько-господарських культур досліджували за загальноприйнятими методами, описаними в літературі (Доспехов Б. А., 1985; Ермантраут Е. Р., 2010).

Визначення показників економічної ефективності здійснено за використання методик та загальноприйнятих методичних підходів, які ґрунтуються на порівнянні результатів від проведення певного агрозаходу із витратами на його застосування. Для визначення енергетичної ефективності бактеризації витрати усіх видів матеріальних ресурсів та отриманий урожай переводили в енергетичні еквіваленти за методиками (Жученко А. А., Казанцев Э. Ф., Афанасьев В. Н., 1983; Тараріко Ю. О., Несмашна О. Є., Глущенко Л. Д., 2005).

Статистичну обробку виконували за загальноприйнятими у математичній статистиці методиками із застосуванням програм Microsoft Excel, Statistica.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ УПРАВЛІННЯ АКТИВНІСТЮ ҐРУНТОВИХ ДІАЗОТРОФІВ ДЛЯ ЇХ ЕФЕКТИВНОЇ ІНТРОДУКЦІЇ В АГРОЦЕНОЗИ

Визначення підходів управління активністю ґрунтових діазотрофів, у тому числі бульбочкових бактерій сої, є важливим етапом роботи, оскільки дозволяє визначитися зі стратегією подальших досліджень, спрямованих на підвищення ефективності інтродукції азотфіксувальних мікроорганізмів в агроценози. Дослідження, викладені у даному розділі складаються з двох частин: перша – розроблення загальної стратегії регулювання активності діазотрофів; друга – обґрунтування стратегії регулювання активності бульбочкових бактерій сої.

Запропоновано стратегію регулювання активності ґрунтових азотфіксувальних мікроорганізмів, яка ґрунтується на аналізі проведених низки досліджень, якими показано, що у процесі інтродукції в агроценози корисні ґрунтові бактерії піддаються впливу різних чинників, які можуть суттєво вплинути на ростову і функціональну активність мікроорганізмів, а також на їх життєздатність.

Відмічено, що суттєвий вплив на активність ґрунтових мікроорганізмів, у т. ч. діазотрофів, справляють температура і вологість. Вони можуть як сприяти активному розвитку бактерій, так і лімітувати їх ріст, або ж забезпечувати перехід клітин в неактивний стан. Показано, що за впливу несприятливих для азотфіксувальних мікроорганізмів умов – підвищення температури та низької

вологості – ріст і функціональна активність діазотрофів пригнічується. При цьому дія несприятливих фізичних показників може бути використана для індукування утворення у деяких видів бактерій специфічних форм спокою. Переведення мікроорганізмів, не здатних до спороутворення, у стан спокою за дії підвищеної температури і пониженої вологості є проблемним.

Показано, що за дії хімічних речовин різної природи активність ґрунтових мікроорганізмів, зокрема, азотфіксувальних бактерій, може суттєво змінюватися. На прикладі нанокарбоксилатів – перспективних для застосування у біотехнології хімічних речовин, досліджено вплив цитратів Цинку (Zn), Купруму (Cu), Мангану (Mn), Феруму (Fe) та Молібдену (Mo) на ростову активність азотфіксувальних бактерій. Виявлено, що підвищення ростової активності мікроорганізмів досягається за вмісту в поживному середовищі комплексу цих сполук, що підтверджується отриманими показниками (константа швидкості поділу, час генерації клітин бактерій). Крім впливу на ростову активність мікроорганізмів, нанокарбоксилати Феруму (Fe) та Молібдену (Mo) суттєво здатні впливати на азотфіксувальну активність діазотрофів.

Крім позитивного впливу певних хімічних сполук на активність азотфіксувальних бактерій слід відзначити і можливу негативну дію різних речовин, зокрема тих, які є основою пестицидів. Проведено порівняльну оцінку токсичності беномілу (фунгіцид Фундазол), а також диніконазолу (фунгіцид Сумі-8ФЛО) щодо представників діазотрофів. Встановлено, що диніконазол здатен інгібувати ріст азотфіксувальних бактерій. Виявлено, що концентрація Фундазолу, яка знижує чисельність бактерій на 50 %, для активних діазотрофів склала 0,90–1,00 г/л, а ЗК₅₀ Сумі-8ФЛО – 0,25–0,28 г/л.

На активність ґрунтових діазотрофів суттєво впливають оточуючі їх живі організми, зокрема, інші мікроорганізми. При цьому між ними виникають різні взаємодії, які можуть впливати на азотфіксувальні бактерії як позитивно (стимулювання їх активності), так і негативно, призводячи до пригнічення їх росту і розвитку.

Негативний вплив мікроорганізмів один на одного відбувається за рахунок антагоністичних взаємовідносин. Спостерігали високу антагоністичну активність бактерій роду *Bacillus*, які використовували у дослідженнях, до більшості тест-бактерій. Виявлено помірну антагоністичну дію бацил щодо представників роду *Arthrobacter*. Найбільш активно штами *Bacillus* проявили антагонізм до представників бактерій роду *Azospirillum*. У використаних у досліді штамів бактерій роду *Bacillus* не виявлено антагоністичної дії до більшості штамів, які представляли рід *Azotobacter*. У більшості випадків спостерігали часткову затримку росту бактерій роду *Pseudomonas*. Більшість штамів *Enterobacter* були стійкими до впливу бацил. Аналіз отриманих даних свідчить про те, що досліджені представники роду *Bacillus* здатні пригнічувати ріст кожного п'ятого штаму діазотрофів, використаних у досліді. З них більш як у 80 % спостерігали зони повного пригнічення росту тест-культур, що вказує на здатність бацил виступати у ролі активних антагоністів. Антагоністичну активність по відношенню до *Bacillus* виявлено у представників родів *Pseudomonas* і *Azotobacter*. Штами *Azospirillum* не проявили антагонізму щодо

бацил. Досліджено антагоністичні відносини штамів азотобактера з представниками родів *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Alcaligenes*. У цілому, штами бактерій роду *Azotobacter* проявили антагоністичну активність у 6,3 % від загальної кількості комбінацій. Після вивчення антагоністичних взаємовідносин діазотрофів із представниками різних таксономічних груп бактерій було підбрано комбінації штамів, які не пригнічують один одного і можуть позитивно впливати на рослини.

Згідно проведених досліджень активність ґрунтових діазотрофів може змінюватись у результаті дії ряду абіотичних і біотичних факторів, зокрема, температури, вологості, органічних і неорганічних хімічних речовини різного походження, а також оточуючих мікроорганізмів. Слід відзначити, що перелік чинників можна розширити, включаючи варіанти, в яких їх поєднано в різноманітних комбінаціях, яких може бути надзвичайно велика кількість. При цьому частина чинників може бути неконтрольованими або ж важко контролюваними. У зв'язку з цим постає завдання розроблення стратегії регулювання активності діазотрофів, яка ґрунтується на необхідності підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, отримання якісної продукції, досягнення економічної і енергетичної ефективності, а також ресурсозбереження.

Запропоновано стратегію регулювання активності *B. japonicum* (рис. 1), яка передбачає вирішення поставленого завдання шляхом отримання інокулянту, що характеризується високим титром і стабільнішою кількістю життєздатних клітин, що дозволяє отримати ефективну азотфіксувальну систему. Досягти цього пропонується шляхом регулювання ростової і функціональної активності бульбочкових бактерій сої за рахунок поєднання діазотрофів та підбору умов їх спільного культивування і застосування для забезпечення позитивної взаємодії за формою коменсалізму, а також шляхом регулювання життєздатності діазотрофів за рахунок внесення добавок-стабілізаторів у середовище.

Для здійснення ефективного регулювання ростової активності корисних ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі бульбочкових бактерій сої, в контрольованих умовах необхідно врахувати низку особливостей цього процесу – це визначення складу відповідних поживних середовищ; їх подальше удосконалення, зокрема, шляхом внесення добавок; вивчення закономірностей росту бактерій у різні періоди культивування. Особливо складним є завдання регулювання ростової активності діазотрофів у змішаній культурі, оскільки необхідно підібрати середовище для сумісного вирощування бактерій, оптимізувати його, а також вивчити залежність ростової активності від початкового співвідношення числа клітин досліджених мікроорганізмів.

РЕГУЛЮВАННЯ РОСТОВОЇ АКТИВНОСТІ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* В УМОВАХ IN VITRO

Порівнюючи криві росту *B. japonicum* у рідких напівсинтетичних поживних середовищах, контрастних за ростом у них мікроорганізмів, виявлено, що за логарифмічною шкалою число клітин у перші 24 год швидше збільшується у середовищі на основі відвару насіння гороху.

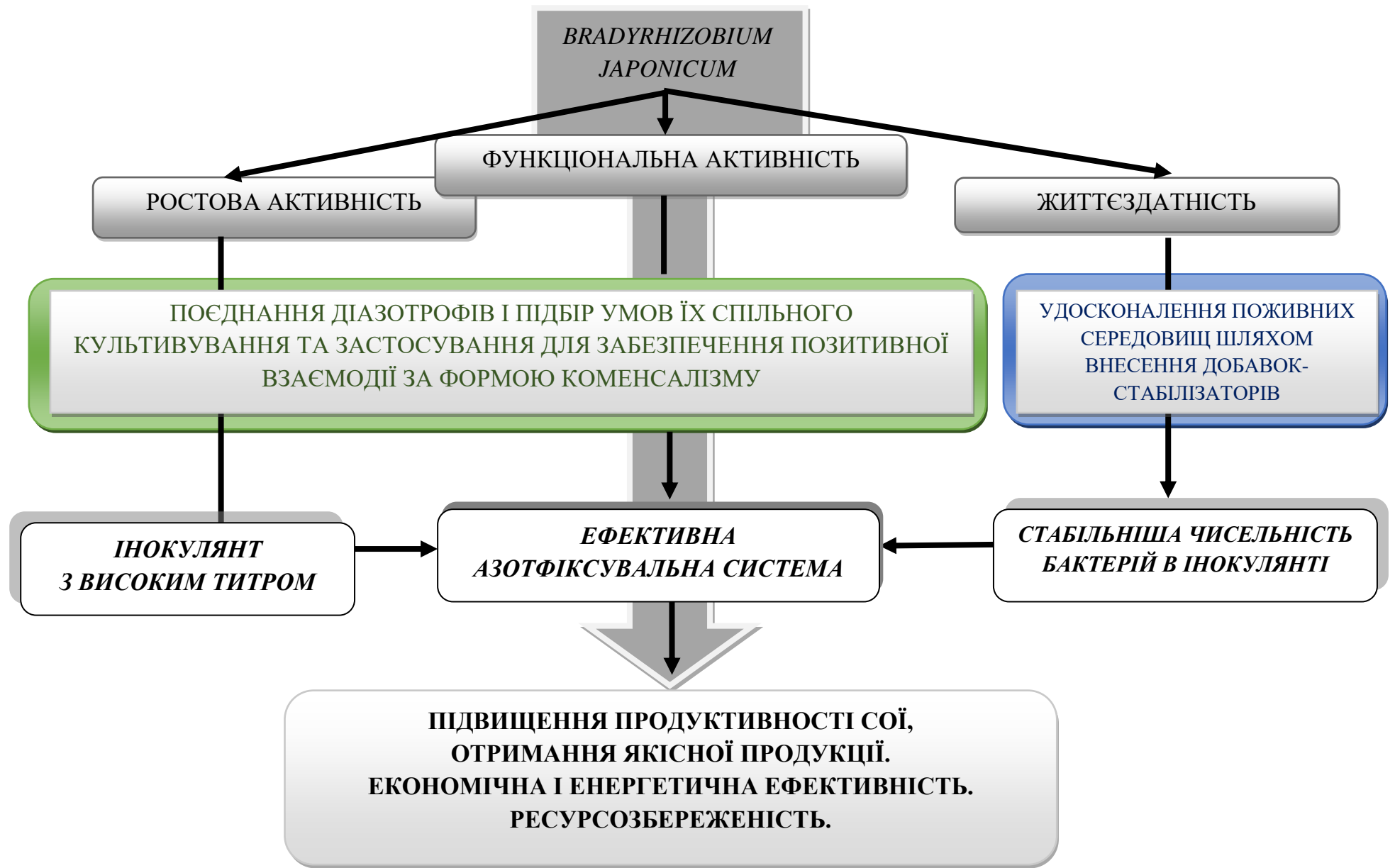


Рис. 1. Стратегія регулювання активності *Bradyrhizobium japonicum*

Представлені дані свідчать про те, що у цьому середовищі раніше закінчується фаза експоненціального росту і починається стаціонарна фаза. Константа швидкості поділу клітин *B. japonicum* у перші 24 год при вирощуванні у середовищі з відваром гороху майже у три рази більша, ніж у середовищі на основі кукурудзяного екстракту та дріжджів пекарських. У фазу експоненціального росту цей показник стає однаковим.

У наступний період відбувається зменшення константи поділу, навіть до негативних показників, що свідчить про настання стаціонарної фази з переходом у фазу деградації, коли клітини починають гинути. Дану закономірність росту бульбочкових бактерій підтверджують показники тривалості генерації. Отримані дані свідчать про те, що тільки після трьох діб культивування цей показник росту *B. japonicum* у середовищі з кукурудзяним екстрактом і дріжджами пекарськими був більшим порівняно з варіантом середовища на основі відвару гороху. В обох середовищах тривалість генерації була найменшою у часовий проміжок з 48 по 72 год.

Отримані результати досліджень свідчать, що вища чисельність клітин *B. japonicum* у технологічнішому середовищі на основі відвару гороху, досягається за рахунок інтенсивнішого росту бактерій у лаг-фазі, на що вказують криві росту цих мікроорганізмів, більша константа швидкості росту та менша тривалість генерації.

Регулювання росту мікроорганізмів можливе за рахунок внесення добавок на основі стерильних сполук бактеріального походження (Louis Saldivar із співавторами, 1992). Також відомий спосіб використання для підвищення росту анаеробних і аеробних бактерій добавки попередньо оброблених іонізуючим випромінюванням ліофілізованих бактерій (Eli Eshet Eisenberg, 1991), які нездатні до розмноження, але препарати зберігають багато продуктів їхнього метаболізму – ферментів і біологічно активних сполук. Дослідження впливу продуктів життєдіяльності бактерій різних видів на ріст діазотрофів фактично відсутні. У зв'язку з вищезазначеним вивчено вплив на ріст *B. japonicum* метаболітів, які містяться в стерилізованій суспензії інших ризобактерій.

Вивчено ростову активність бульбочкових бактерій шляхом додавання продуктів метаболізму, які містяться в стерильній культуральній рідині інших видів азотфіксувальних мікроорганізмів – представників родів *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* (рис. 2).

Виявлено, що невисокі концентрації стерильної культуральної рідини не мали істотного впливу на щільність популяції, тоді як додавання її з розрахунку більше 10 % загального об'єму середовища сприяло істотному зниженню цього показника. Найвищий стимулювальний ефект виявлено при додаванні стерилізованої суспензії *A. brasilense* з розрахунку 5 % від об'єму середовища. При цьому щільність популяції збільшувалася від 1,2 до 2,2 раза у порівнянні з контролем.

При змішаному культивуванні бульбочкових бактерій сої та азоспірил відбувається накопичення мікробних метаболітів у середовищі. При цьому, екзометаболіти мікроорганізмів поступово впливають безпосередньо на ріст

популяції і життєдіяльність клітин бактерій іншого виду. Досліджено ростову активність популяцій *B. japonicum* та *A. brasilense* на початку лаг-фази, а також здійснено порівняльний аналіз кривих росту цих діазотрофів за різної концентрації їхніх клітин.

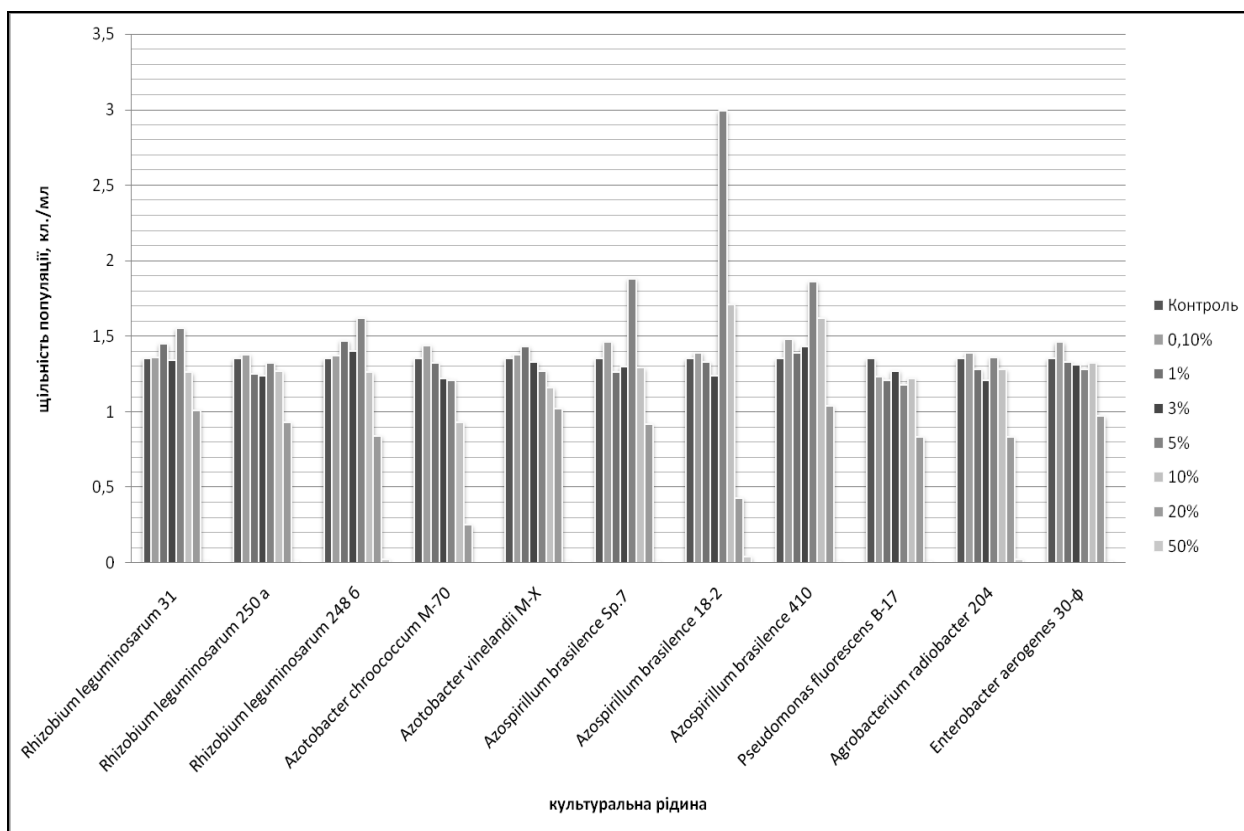


Рис. 2. Вплив продуктів метаболізму діазотрофів на ріст *B. japonicum* M-8

Враховуючи різні вимоги *B. japonicum* та *A. brasilense* до джерел живлення, одним із завдань досліджень було розроблення поживного середовища, за використання якого можна досягти високої ростової активності обох штамів (табл. 1). Дослідили параметри росту *B. japonicum* та *A. brasilense* в експериментальному поживному середовищі.

Встановлено, що за культивування діазотрофів в поживних середовищах із різними концентраціями його складових, бульбочкові бактерії сої мали неоднакову ростову активність. Так, у результаті визначення оптимальних концентрацій джерела азотного живлення встановлено, що найвища ростова активність *B. japonicum* M-8 була за їх культивування в поживному середовищі з концентрацією $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 г/л. При зменшенні концентрації діамонію сульфату в поживному середовищі, чисельність бульбочкових бактерій сої знижувалася. Слід відмітити, що культивування *B. japonicum* M-8 сумісно з *A. brasilense* 18-2 у поживному середовищі зі збільшеними концентраціями джерела азоту, призвело до зниження чисельності бульбочкових бактерій на 8–32 %. Але за культивування *B. japonicum* M-8 сумісно з *A. brasilense* 410, при збільшенні концентрацій діамонію сульфату, спостерігали лише тенденцію до зменшення чисельності бульбочкових бактерій.

**Склад напівсинтетичних поживних середовищ
для культивування *B. japonicum* та *A. brasilense***

Поживне середовище	Компонент середовищ										
	Відвар насіння гороху	Кукурудзяний екстракт	Глюкоза	Меляса	Сахароза	Кормові дріжджі	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	CaCO_3
для культивування <i>B. japonicum</i>	x*	–	x	–	x	–	x	x	x	x	x
для культивування <i>A. brasilense</i>	–	x	–	x	–	–	x	x	x	x	x
для змішаного культивування <i>B. japonicum</i> та <i>A. brasilense</i>	–	–	x	x	–	x	x	x	x	x	x

Примітка. *Компонент входить до складу поживного середовища

Дані, отримані в результаті визначення оптимальних концентрацій сполук фосфору, свідчать, що найвища ростова активність *B. japonicum* М-8 була за їх культивування в поживному середовищі з концентраціями $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ від 0,15 до 0,35 г/л.

Визначено оптимальні концентрації джерел вуглецю: меляси й глюкози. Найвищу ростову активність *B. japonicum*, культивованих сумісно з *A. brasilense*, спостерігали у варіантах із концентрацією як меляси, так і глюкози від 10,0 до 20,0 г/л.

Для культивування *B. japonicum* М-8 сумісно з *A. brasilense* підібрано поживне середовище, яке містить дріжджі кормові. Проведені дослідження свідчать, що ефективними виявилися досліджувані концентрації від 2,0 і 9,0 г/л.

Також вивчено вплив на ріст діазотрофів різних концентрацій у поживному середовищі $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, який у невеликих кількостях необхідний ризобіям для підтримання структури їх клітин і функціонування ферментних систем. Доцільно використовувати даний компонент у кількості 0,1 г/л.

При вивченні впливу різних концентрацій CaCO_3 встановлено, що для *B. japonicum* М-8, культивованих із *A. brasilense* 18-2, оптимальною є концентрація даного компоненту поживного середовища в діапазоні від 0,5 до 3,0 г/л, а для бульбочкових бактерій сої, культивованих сумісно з *A. brasilense* 410 – від 0,5 до 1,5 г/л. Оскільки в зазначених варіантах титр *B. japonicum* М-8 змінювався в межах похибки, доцільним є внесення карбонату кальцію в поживне середовище в кількості 0,5 г/л.

У результаті проведених досліджень запропоновано оптимізоване поживне середовище для культивування *B. Japonicum* М-8 сумісно з азоспірами.

Вивчено зміни чисельності бульбочкових бактерій і азоспірил на початку лаг-фази у чистій і змішаній культурі (рис. 3). Виявлено, що протягом перших шести годин при періодичному культивуванні відбувається зменшення чисельності життєздатних клітин. Найбільше зниження кількості бактерій – у

28 разів – виявлено при культивуванні *B. japonicum* М-8 у чистій культурі. Чисельність *A. brasilense* 18-2 зменшилась у 6,2 раза.

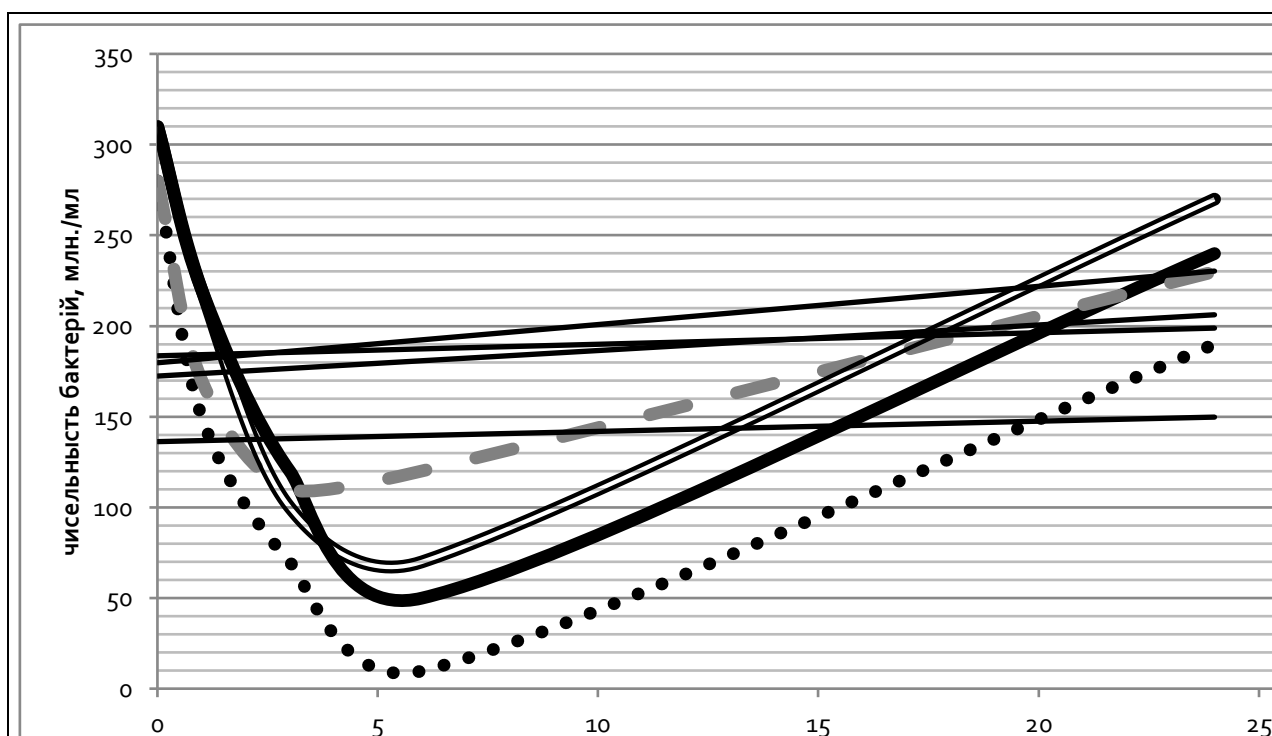


Рис. 3. Динаміка росту *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 на початку лаг-фази у чистій (чк) і змішаній культурі (зк)

Культивування діазотрофів у змішаній культурі значною мірою нівелює дію стресових факторів на ріст досліджуваних азотфіксувальних бактерій. Так, у змішаній культурі чисельність *B. japonicum* М-8 максимально знизилася у 2,5 раза, а *A. brasilense* 18-2 – у 4,4 раза.

Наведені дані свідчать про те, що змішане культивування *B. japonicum* та *A. brasilense* на порядок зменшує дію стресових факторів (зміна консистенції середовища, концентрації поживних речовин, умов культивування тощо) на ріст бульбочкових бактерій сої. Виявлено істотніший вплив екзометаболітів азоспірил щодо ростової активності бульбочкових бактерій у порівнянні з впливом метаболітів *B. japonicum* на ріст популяції *A. brasilense*.

У попередніх досліджах виявлено взаємний позитивний вплив *B. japonicum* та *A. brasilense* на їхній ріст у контрольованих умовах при рекомендованій початковій концентрації клітин. Однак, суттєвий вплив при змішаному культивуванні може мати початкове співвідношення клітин *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* у середовищі. У зв'язку з цим, постало завдання вивчити закономірності росту цих діазотрофів у змішаній культурі за різної вихідної концентрації клітин.

При мінімальній концентрації клітин зазначених діазотрофів спостерігається повільний ріст бульбочкових бактерій. При цьому найсуттєвіша різниця між чисельністю клітин *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 відмічається через 48 год, і становить 2,0 млрд/см³. Чисельність азоспірил при цьому перевищує кількість бульбочкових бактерій сої у п'ять разів. Аналізуючи

подальшу динаміку росту азотфіксувальних бактерій, слід відзначити зближення показників їхньої чисельності. Кінцеве співвідношення *V. japonicum* та *A. brasilense* знаходиться на рівні 1:1,3.

За сумісного культивування бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 титр мікроорганізмів збільшується протягом усього періоду культивування, проте чисельність азоспірил незначно перевищує кількість клітин *V. japonicum* М-8. Слід зазначити, що титр *A. brasilense* 410 був нижчим у порівнянні з *A. brasilense* 18-2, при цьому чисельність *V. japonicum* М-8 була вищою при культивуванні даного штаму з *A. brasilense* 410, ніж із *A. brasilense* 18-2.

При мінімальній початковій концентрації *V. japonicum* М-8 та середній *A. brasilense* 18-2 виявлено таку ж закономірність росту бульбочкових бактерій. Чисельність азоспірил у експоненціальну фазу росту перевищувала кількість *V. japonicum* у 8,5 раза. Кінцеве співвідношення *V. japonicum* та *A. brasilense* становило 1:1,6. Чисельність *A. brasilense* 410 була нижчою, ніж *A. brasilense* 18-2, і в експоненціальній фазі росту мікроорганізмів перевищувала титр бульбочкових бактерій у 1,6 раза, а кінцеве співвідношення становило 1:1,06.

За мінімальної (0,082 млрд/см³) початкової концентрації *V. japonicum* М-8 та максимальної (0,680 млрд/см³) *A. brasilense* виявлено дуже повільне зростання чисельності бульбочкових бактерій. Чисельність азоспірил у всі фази росту перевищувала чисельність бульбочкових бактерій.

Іншу закономірність спостерігали при середній (0,272 млрд/см³) початковій концентрації *V. japonicum* М-8 та мінімальній *A. brasilense* 18-2. Виявлено, що в перші 24 год чисельність бульбочкових бактерій була вищою у порівнянні з азоспірилами (рис. 4 А, Г).

При середній початковій концентрації *V. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 18-2 виявлено велику різницю чисельності бактерій через 48 год їх культивування. Чисельність азоспірил у експоненціальну фазу росту перевищувала цей показник у *V. japonicum* у 6,1 раза (рис. 4 Б). Через 72 год культивування бактерій їхня чисельність зрівнялася. При культивуванні *V. japonicum* М-8 з *A. brasilense* 410 у тому ж співвідношенні не спостерігалось істотної різниці в чисельності мікроорганізмів протягом усього періоду культивування (рис. 4 Д).

За культивування *V. japonicum* М-8 з максимальною кількістю азоспірил, спостерігали найбільшу різницю в титрі цих бактерій. Так, в експоненціальній фазі росту мікроорганізмів чисельність *A. brasilense* 18-2 перевищувала показник *V. japonicum* М-8 в 11 разів, а за культивування бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 ця різниця була істотно меншою (у 3 рази).

При співвідношенні *V. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 18-2 max:min чисельність бульбочкових бактерій по завершенні періоду культивування у змішаній культурі перевищувала чисельність *A. brasilense* 18-2 втричі, тоді як за культивування з *A. brasilense* 410, кількість азоспірил була такою ж, як і бульбочкових бактерій. За змішаного культивування *V. japonicum* М-8 і *A. brasilense* у співвідношенні max:mid, чисельність бульбочкових бактерій перевищувала кількість бактеріальних клітин *A. brasilense* 18-2 протягом усього періоду культивування й кінцеве співвідношення мікроорганізмів становило

3:1. Водночас, за культивування бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 цей показник становив 1,3:1.

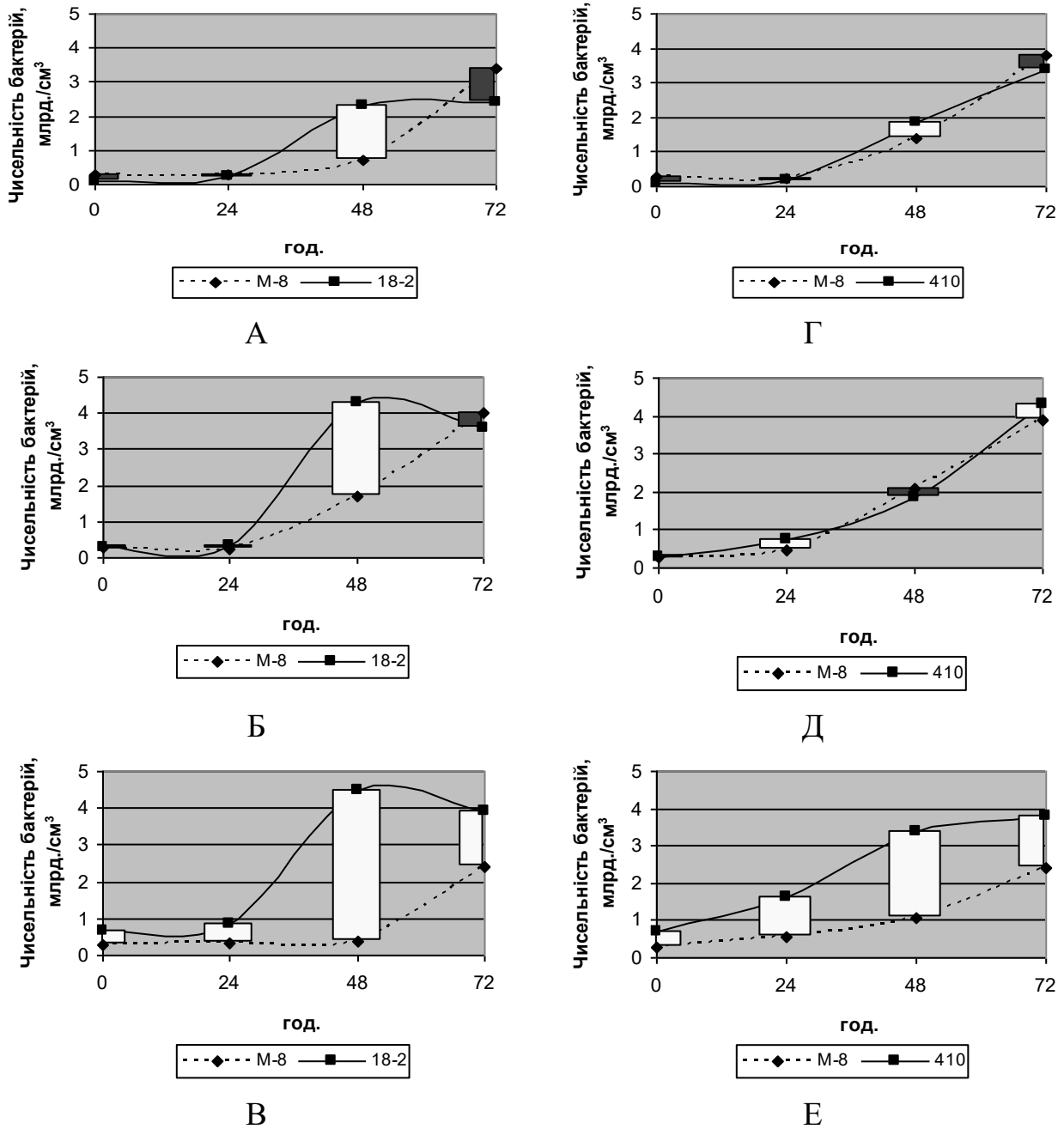


Рис. 4. Динаміка росту діазотрофів у змішаній культурі:
 А – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 18-2 – 3,3:1 (mid:min);
 Б – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 18-2 – 1:1 (mid:mid);
 В – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 18-2 – 1:2,5 (mid:max);
 Г – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 410 – 3,3:1 (mid:min);
 Д – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 410 – 1:1 (mid:mid);
 Е – співвідношення *V. japonicum* M-8 та *A. brasilense* 410 – 1:2,5 (mid:max)

При початковому співвідношенні бактерій max:max, чисельність *V. japonicum* M-8 була нижчою у порівнянні з азоспірилами протягом усього

періоду культивування. Кінцеве співвідношення *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 18-2 становило 1:2,3, а з *A. brasilense* 410 – 1:1,3, що свідчить про те, що досліджувані штами азоспірил володіють більш високою ростовою активністю у порівнянні з *B. japonicum* М-8.

Аналіз отриманих даних засвідчує, що найвищу чисельність досліджуваних бактерій спостерігали за середньої початкової концентрації клітин (0,272 млрд/см³) кожного виду при вихідному співвідношенні 1:1. Виявлено істотніший вплив азоспірил на ростову активність бульбочкових бактерій у порівнянні з впливом *B. japonicum* на ріст *A. brasilense*.

Одним із показників сумісності мікроорганізмів є симбіотичний індекс. Для *B. japonicum* М-8 цей показник перевищував 1,00 в усіх варіантах, що свідчить про доцільність культивування ризобій з азоспірилами. Винятком є варіанти з середньою та максимальною кількістю бульбочкових бактерій сої у співвідношенні з азоспірилами 1:2,5 та 1:1 відповідно, оскільки для азоспірил цей показник нижче 1, що свідчить про інгібувальний вплив на них *B. japonicum* М-8 у зазначених співвідношеннях.

Найвищий показник (2,91) отримано за культивування бульбочкових бактерій у співвідношенні з азоспірилами 1:1 при внесенні їх у середній концентрації. У *A. brasilense* 18-2 симбіотичний індекс був найвищим за їх культивування з ризобіями у співвідношенні 2,5:1 при їх внесенні в середній та високій концентрації (1,97 та 1,89 відповідно). Аналогічні дані отримано за культивування *B. japonicum* М-8 з *A. brasilense* 410 (табл. 2).

Таблиця 2

**Симбіотичний індекс *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410
за сумісного культивування**

Варіанти досліджу (початкове співвідношення клітин <i>B. japonicum</i> : <i>A. brasilense</i>)	Симбіотичний індекс	
	<i>B. japonicum</i> М-8	<i>A. brasilense</i> 410
min:min	3,77	3,44
min:mid	3,34	3,32
min:max	2,99	2,78
mid:min	3,56	3,64
mid:mid	3,73	4,16
mid:max	2,66	2,76
max:min	4,19	3,32
max:mid	4,22	3,66
max:max	3,95	3,18

Отримані результати свідчать, що регулювання ростової активності *B. japonicum* шляхом сумісного культивування з азотфіксувальними бактеріями *A. brasilense* є ефективним, оскільки при цьому досягається синергічний ефект. Вплив азоспірил на ріст бульбочкових бактерій сої в контрольованих умовах інтенсивно проявляється, починаючи з лаг-фази. При цьому необхідно враховувати, що на сумісний ріст зазначених діазотрофів суттєво впливає склад поживного середовища, яке повинно відповідати потребам мікроорганізмів різних видів. Також важливим фактором, який може мати вирішальний вплив

на ріст азотфіксувальних бактерій, є початкове співвідношення клітин у середовищі.

ВПЛИВ ПОЛІМЕРІВ Й ГУМІАРАБІКУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ

У період часу від отримання інокулянту і до попадання бульбочкових бактерій сої в кореневу зону рослин відбувається зниження чисельності життєздатних клітин діазотрофів. І хоча для утворення ефективного симбіотичного апарату теоретично достатньо щоб з сотень тисяч клітин бактерій, які наносяться на насінину, вижило кілька десятків діазотрофів (або навіть менше за умови їх розмноження в ризосфері рослин), але за несприятливих зовнішніх умов не завжди можна досягти навіть цього. Тому необхідно забезпечити максимальне виживання *V. japonicum* на всіх етапах їх інтродукції в агроценози. Для цього перевірено різні хімічні сполуки як добавки у середовище і підібрано оптимальні для забезпечення підтримання життєздатності бактерій під час зберігання, а також вивчено вплив хімічних сполук на збереженість діазотрофів на насінні.

При культивуванні бактерій у рідкому поживному середовищі часто спостерігається його хімічна і фізична неоднорідність: утворення та розпад мікро- і макрочастинок, осад нерозчинних сполук тощо. Все це може суттєво вплинути на ріст мікроорганізмів, а також збереження їхньої життєздатності. Існує ряд хімічних сполук-стабілізаторів, які при додаванні у середовище зменшують зміни фізичних і хімічних властивостей речовин при зберіганні або застосуванні. В основному ці стабілізатори використовують при виробництві харчових продуктів, а також у хімічній промисловості. Дані щодо досліджень впливу цих сполук на ріст і функціональну активність ґрунтових діазотрофів, у т. ч. бульбочкових бактерій сої, практично відсутні.

У зв'язку з цим вивчено вплив поліетиленгліколю, гуміарабіку та альгінату натрію на ростову активність *V. japonicum* при глибинному культивуванні у напівсинтетичному середовищі. Виявлено, що жодна з досліджуваних добавок не стимулювала ріст ризобій. Відмічено інгібуючий вплив стабілізатора поліетиленгліколю на ростову активність *V. japonicum*: при цьому виявлено зниження щільності бактеріальної популяції при збільшенні концентрації цієї добавки.

Вищу чисельність діазотрофів спостерігали при додаванні стабілізатора гуміарабіку, але й вона була меншою на 33–44 % щодо контролю. Найвищу чисельність *V. japonicum* виявлено при вмісті 0,3 % цього стабілізатора від об'єму середовища. Найвищі показники отримано у варіантах із альгінатом натрію. За зберігання бульбочкових бактерій найвищим титр цих мікроорганізмів був через 2 місяці у варіанті з 0,2 % альгінату натрію – у 11,5 раза більше в порівнянні з контролем.

Подальші дослідження проводили з альгінатом натрію у концентрації 0,2 %. У дослідно-промислових умовах відпрацьовано технологію культивування *V. japonicum* у реакторі біологічному БИОР-0,25. У результаті досягнуто титр ризобій, культивованих із альгінатом натрію, на рівні

4,0 млрд кл./мл. В подальших дослідженнях перевіряли життєздатність цих бактерій протягом п'яти місяців. Встановлено, що навіть через чотири місяці зберігання культура *B. japonicum* є придатною для передпосівної бактеризації сої, оскільки титр становив 2,1 млрд кл./мл. Слід зазначити, що титр бульбочкових бактерій сої, культивованих без альгінату натрію, вже через два місяці був нижче 1,0 млрд кл./мл.

Найбільш технологічною і зручною є рідка форма препарату, однак її недоліком є короткий термін зберігання. У зв'язку з цим дослідили вплив на збереження бактерій, культивованих в чистих та змішаних культурах, різних умов щодо доступу повітря, а також полімерної добавки альгінату натрію в концентрації 0,2 %. Встановлено, що в мікроаерофільних умовах в суспензії клітини *B. japonicum* М-8 зберігають життєздатність краще, ніж без доступу повітря. Концентрація клітин бактерій у першому випадку більша в 1,5–2 рази.

Досліджено вплив сумісного культивування бульбочкових бактерій із азоспірилами на титр *B. japonicum* М-8 у порівнянні з чистою культурою в умовах збереження. Встановлено, що у змішаних культурах титр бульбочкових бактерій вищий, ніж у чистій культурі. Зберігання змішаної культури дало таку ж закономірність, що і в чистій культурі: титр клітин бактерій в мікроаерофільних умовах був більший приблизно в 1,5–2 рази. Виявлено також, що альгінат натрію сприяє збереженню в суспензії життєздатності клітин *B. japonicum* М-8, *A. brasilense* 410 та *A. brasilense* 18-2.

На рис. 5 представлено електронограми змішаної культури *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410, з яких можна зробити висновок про морфологічні структурні зміни клітин бульбочкових бактерій сої та азоспірил. Так, порівняння чотиримісячних клітин з вихідними формами показало, що за зберігання бактерій відбуваються зміни: навколо бактеріальних клітин спостерігається осьміофільне утворення.

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ *B. JAPONICUM* ЗА ПОЄДНАННЯ З *A. BRASILENSE*

Як показано у попередніх розділах, поєднання бульбочкових бактерій сої з азоспірилами забезпечує підвищення ростової активності мікроорганізмів, що у підсумку дає змогу отримати інокулянт з високим титром, а додавання хімічної добавки-стабілізатора альгінату натрію підвищує виживаність симбіотичних діазотрофів за їх зберігання і застосування. Проте важливим при цьому є збереження високої функціональної активності бактерій. З цією метою, а також для з'ясування механізмів впливу сумісного застосування бульбочкових бактерій сої та азоспірил на рослини досліджували продукування фізіологічно активних сполук діазотрофами у чистій і змішаній культурі, формування симбіотичного апарату і азотфіксувальну активність мікроорганізмів, а також вплив інокуляції на міграцію водорозчинного гумусу та біогенних елементів по ґрунтовому профілю.

Установлено, що найбільшу кількість β -індоліл-3-оцтової кислоти продукують азоспірили у чистій культурі (табл. 3). Бульбочкові бактерії сої синтезують цей ауксин у найменшій кількості. У змішаній культурі

(*B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410) бульбочкові бактерії сої інтенсивніше продукували β-індоліл-3-оцтову кислоту у порівнянні з чистими культурами досліджуваних діазототрофів, але значно менше у порівнянні з азоспірилами.

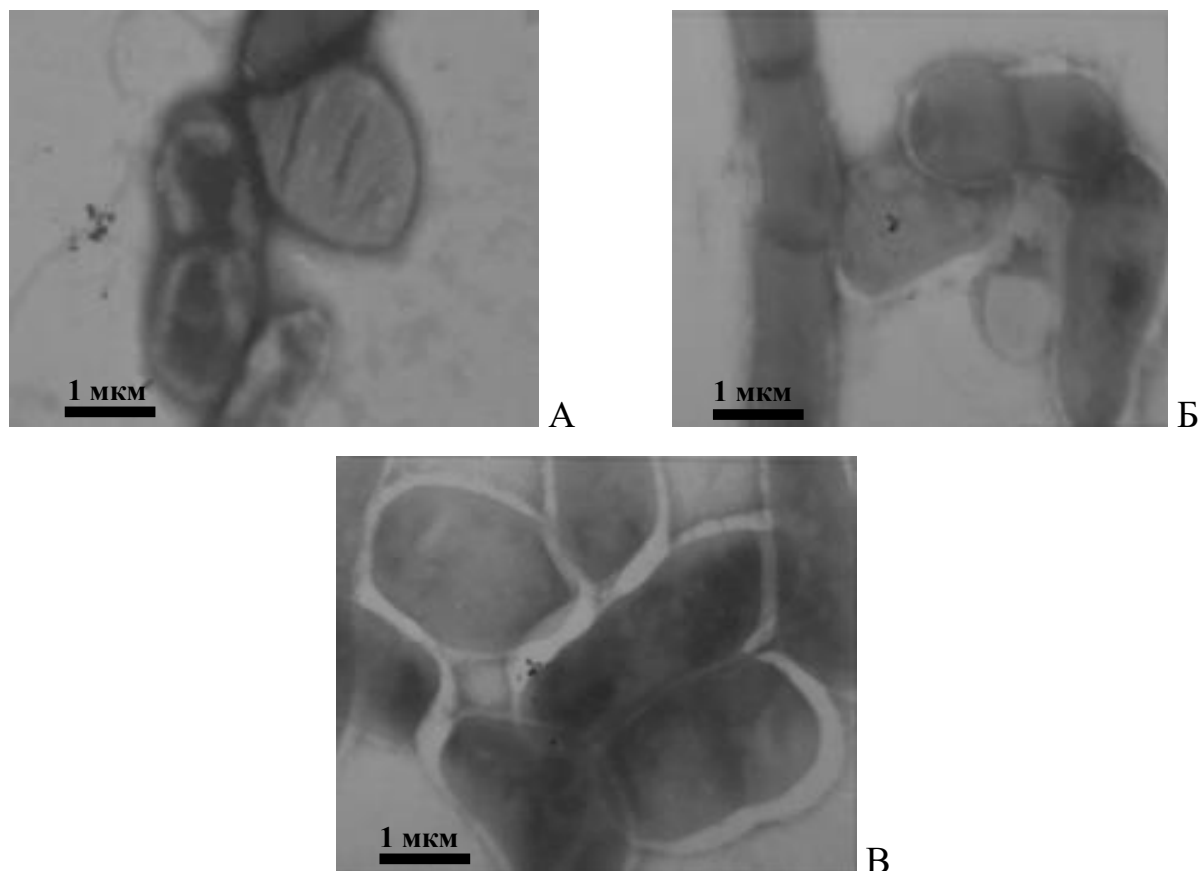


Рис. 5. Електронограми змішаної культури *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410: А – 3-добова культура; Б – 4-місячна культура; В – 4-місячна культура з альгінатом натрію

Таблиця 3

Кількісний вміст ауксинів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіант досліджу	Ауксини, мкг/г абсолютно сухої біомаси					
	IAA1	IAA-hydr.2	ICA3	ICal4	IC5	IBut6
<i>B. japonicum</i> М-8	0,85	38,67	3,04	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>A. brasilense</i> 410	620,90	14,81	40,61	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	5,14	не виявлено	1,71	3,69	не виявлено	не виявлено

Примітка. IAA – indole-3-acetic acid, індол-3-оцтова кислота (ІОК); ICal – indole-3-carboxaldehyde, індол-3-карбоксальдегід; IC – indole-3-carbinol, індол-3-карбінол; ICA – indole-3-carboxylic acid, індол-3-карбоксилова кислота; IAA-hydr. – indole-3-acetic acid hydrazide, індол-3-оцтової кислоти гідразид; IBut – indole-3-butyric acid, індол-3-масляна кислота

Як *B. japonicum* М-8, так і *A. brasilense* 410 у чистих культурах продукували індол-3-оцтової кислоти гідразид. При цьому бульбочкові бактерії інтенсивніше продукували цей ауксин, а за сумісного культивування діазотрофів його не виявлено. Азоспірили інтенсивно продукували індол-3-карбоксілову кислоту. Бульбочкові бактерії сої продукували цей фітогормон у більшій кількості за вирощування у чистій культурі.

Не виявлено утворення індол-3-карбоксалдегіду при вирощуванні *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 у чистих культурах, але за сумісного культивування мікроорганізмів цей фітогормон синтезується у кількості 3,69 мкг/г сухої біомаси мікроорганізмів. При культивуванні бульбочкових бактерій сої та азоспірил як у чистій, так і в змішаній культурі не утворювалися індол-3-карбінол й індол-3-масляна кислота. Сумарний рівень синтезу досліджуваних ауксинів був найвищим при культивуванні азоспірил, меншим – бульбочкових бактерій і найменшим при культивуванні цих мікроорганізмів у змішаній культурі.

Абсцизова кислота інгібує всі фази утворення бульбочок на корінні бобових культур, а також процес фіксації азоту. Найвищий рівень цього гормону виявлено в культуральній рідині *A. brasilense* 410, при культивуванні *B. japonicum* М-8 він був у 2,5 раза меншим. Проте найменшу кількість абсцизової кислоти виявлено у культуральній рідині діазотрофів за їх сумісного культивування (табл. 4).

Таблиця 4

Кількісний вміст абсцизової кислоти, що синтезуються мікроорганізмами

Варіант досліджу	Абсцизова кислота, мкг/г сухої біомаси
<i>B. japonicum</i> М-8	5,1
<i>A. brasilense</i> 410	12,5
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	4,4

Важливу роль у формуванні та функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу відіграють гібереліни. Найвищий рівень ГК₃ і загальної кількості гіберелінів виявлено у культуральній рідині *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх сумісного культивування (табл. 5).

Таблиця 5

Кількісний вмісту гіберелінів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіант досліджу	Гібереліни, мкг/г сухої біомаси	
	гіберелова кислота (ГК ₃)	гіберелова кислота (ГК ₄)
<i>B. japonicum</i> М-8	<0,1	3,13
<i>A. brasilense</i> 410	<0,1	5,37
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	270,51	2,51

У чистій культурі як бульбочкових бактерій, так і азоспірил уміст ГК₃ знаходився у слідовій кількості. ГК₄ продукували всі досліджувані мікроорганізми як у чистій, так і в змішаній культурі, хоча у чистій культурі азоспірил рівень цього гібереліну був найвищим.

Відомо, що в регуляції процесів поділу клітин, який ініціює утворення бульбочок на корінні, беруть участь цитокиніни. Виявлено продукування ізопентеніл-аденіну штамом *B. japonicum* М-8 як у чистій культурі, так і сумісно з азоспірилами. Штам *A. brasilense* 410 продукував зеатин і зеатин рибозид. Не виявлено вмісту кінетину й ізопентеніл-аденозину у культуральній рідині бульбочкових бактерій сої і азоспірил як у чистій, так і змішаній культурі. Сума цитокинінів була найбільшою у варіанті з сумісним культивуванням діазотрофів (табл. 6).

Таблиця 6

Кількісний вміст цитокинінів, що синтезуються мікроорганізмами

Варіант досліджу	Цитокиніни, мкг/г сухої біомаси				
	зеатин	зеатин-рибозид	кінетин	ізопентеніл-аденін	ізопентеніл-аденозин
<i>B. japonicum</i> М-8	не виявлено	не виявлено	не виявлено	2,37	не виявлено
<i>A. brasilense</i> 410	0,42	2,99	не виявлено	не виявлено	не виявлено
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	не виявлено	не виявлено	не виявлено	12,10	не виявлено

Важливим для утворення ефективної симбіотичної системи є співвідношення ауксини/цитокиніни. Особливо важливо, щоб воно було низьким на ранніх стадіях інфікування коріння. Найнижче співвідношення ауксини/цитокиніни виявлено у культуральній рідині *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх сумісного культивування. У варіанті з культивуванням бульбочкових бактерій сої у чистій культурі воно більше в 20 разів, а в культуральній рідині азоспірил, вирощених у чистій культурі – у 220 разів (табл. 7). Виходячи з цих показників, утворення кореневих бульбочок повинно інтенсивніше відбуватися при застосуванні інокулюму для обробки насіння сої, отриманого за сумісного застосування *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410.

Таблиця 7

Кількісне співвідношення ауксини/цитокиніни, що синтезуються ґрунтовими мікроорганізмами

Варіант досліджу	Абсцизова кислота, мкг/г сухої біомаси
<i>B. japonicum</i> М-8	5,1
<i>A. brasilense</i> 410	12,5
<i>B. japonicum</i> М-8 + <i>A. brasilense</i> 410	4,4

Істотну роль у формуванні ефективного симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами відіграє пектинолітична активність ризобій, яка за вирощення діазотрофів у змішаній культурі становить 1,51 од./мл, що вище показників варіантів із культивуванням бактерій у чистих культурах: на 39 % відносно *B. japonicum* М-8 і на 57 % у порівнянні з *A. brasilense* 410. Зростання пектинолітичної активності при сумісному культивуванні діазотрофів може забезпечити їх кращу проникність у корені рослин і, відповідно, інтенсивніше формування симбіотичного апарату рослин сої. Як свідчать отримані у польовому досліді, бульбочки на коренях рослин сої утворилися лише у варіантах з передпосівною бактеризацією насіння *B. japonicum* М-8, вирощених

як у чистій культурі, так і у поєднанні з азоспірилами (рис. 6). При цьому, слід відмітити, що найефективнішою виявилася передпосівна бактеризація бульбочковими бактеріями, культивованими сумісно з *A. brasilense* 410. Так, кількість бульбочок у цьому варіанті перевищувала досліджуваний показник у рослин, бактеризованих *V. japonicum* M-8: у фазі 3 листків – на 83 %, у фазі цвітіння – на 23,3 % та у фазі бобоутворення – на 40,7 %.

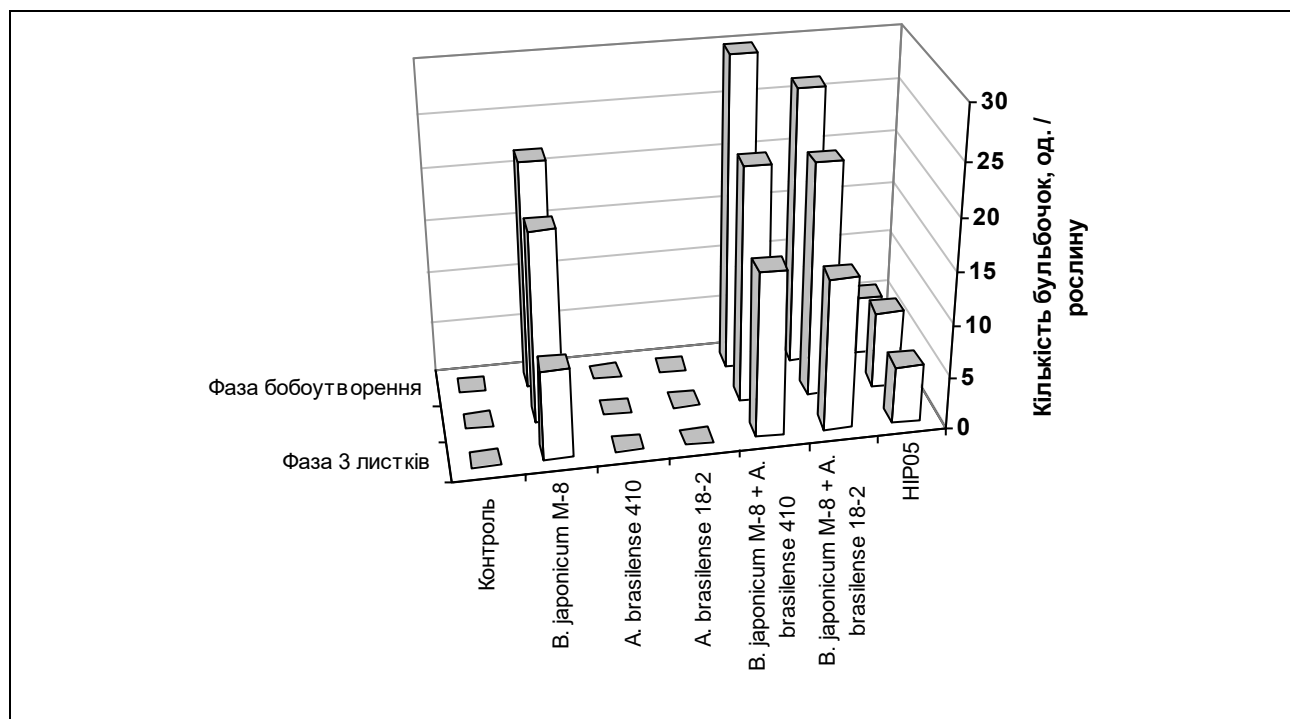


Рис. 6. Вплив передпосівної бактеризації на кількість бульбочок на коренях рослин сої сорту Легенда

Маса бульбочок, сформованих на коренях сої, була найвищою за використання бульбочкових бактерій, культивованих сумісно з *A. brasilense* 410 та *A. brasilense* 18-2 (рис. 7).

Така закономірність простежувалася протягом усього вегетаційного періоду рослин у всі роки проведення досліджень. До того ж, у варіантах з комплексною бактеризацією як маса, так і кількість бульбочок була істотно вищими у порівнянні з варіантом, де здійснювали передпосівну інокуляцію насіння сої чистою культурою ризобій.

У фазі 3 листків маса бульбочок у варіантах з поєднанням бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 та *A. brasilense* 18-2 була відповідно вищою на 100 та 115 %, у фазі цвітіння – на 24 та 13 %, а у фазі бобоутворення – на 30 та 26 %. Отримані дані свідчать про позитивний вплив азоспірил на розвиток симбіотичного апарату, що також підтверджується показниками активності азотфіксації ризобій у симбіозі з рослинами сої.

При дослідженні впливу передпосівної бактеризації на азотфіксувальну активність бульбочкових бактерій сої у симбіозі встановлено її зростання у всі фази розвитку рослин у варіантах з *V. japonicum* M-8, як у чистій культурі, так і у поєднанні з штамами азоспірил.

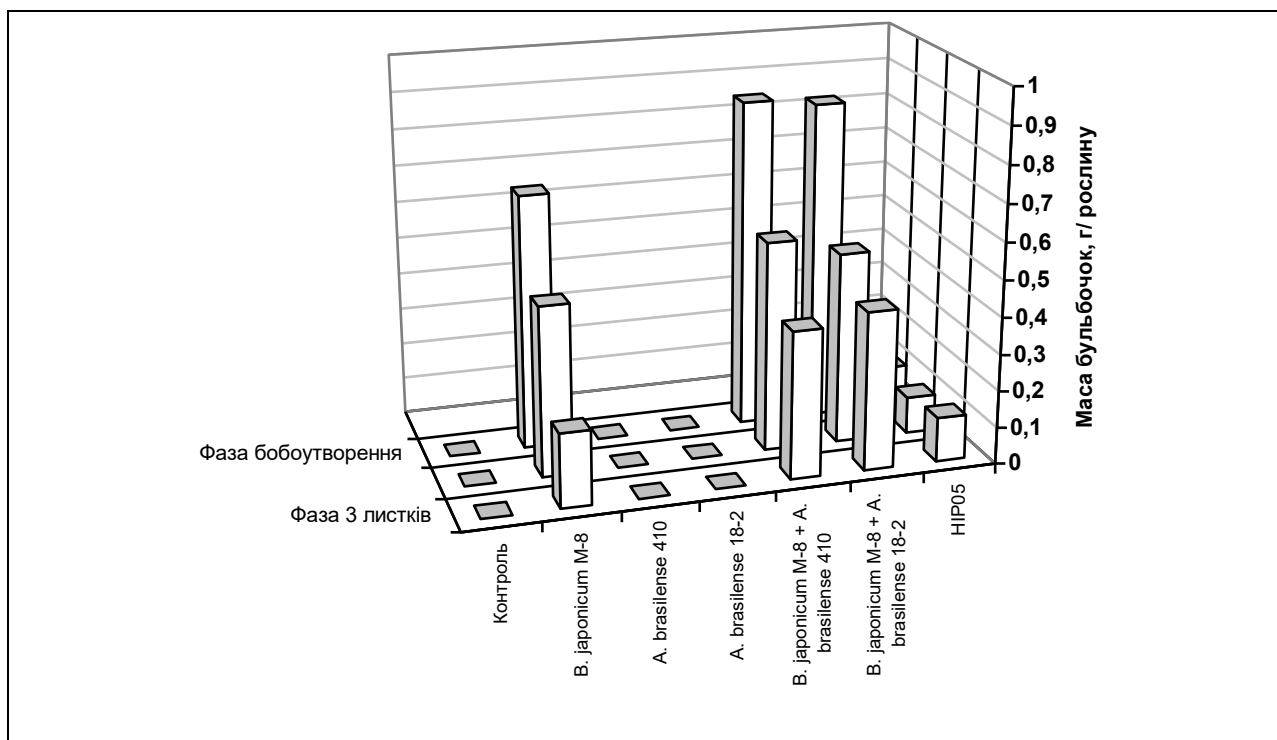


Рис. 7. Вплив передпосівної бактеризації на масу бульбочок на коренях рослин сої сорту Легенда

Найвищу активність відмічено у варіанті з сумісною бактеризацією *B. japonicum* та *A. brasilense* 410 у фазі цвітіння – 6,38–6,06 мкг N на рослину за годину, що на 42–49 % вище за показники варіанту з використанням ризобій у чистій культурі (рис. 8).

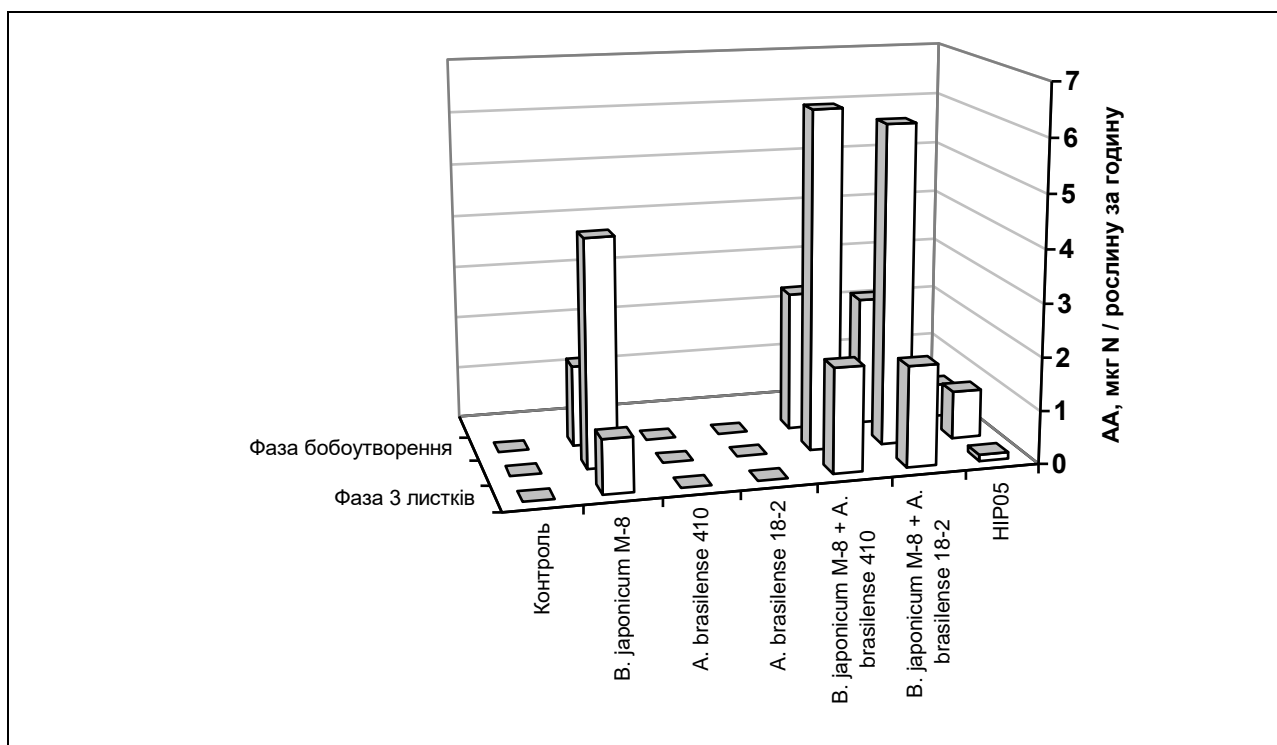


Рис. 8. Вплив передпосівної бактеризації на азотфіксувальну активність бульбочок сої

Проведені лізиметричні дослідження показали, що найбільші втрати вологи спостерігали у варіанті з вирощуванням сої без передпосівної бактеризації насіння. У варіантах з чистими культурами бульбочкових бактерій сої та азоспірил цей показник був меншим на 16 % (табл. 8). При застосування змішаних культур *Bradyrhizobium japonicum* та *Azospirillum brasilense* втрати вологи були найменшими і складали від 62 до 66 мм. Це є цілком закономірним, оскільки застосування передпосівної бактеризації сприяє активізації росту й розвитку рослин, відповідно, зростає їх потреба у волозі, що позначається на її втратах – вони зменшуються.

Таблиця 8

Втрати вологи, водорозчинного гумусу та біогенних елементів за варіантами дослідів за гідрологічний рік, лізиметричний дослід з соєю

Варіанти дослідів	Волога, мм	Втрати, кг/га					
		гумратус водорозч.	NO ₃	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO
Контроль (без бактеризації)	84,0	16,4	34,2	3,2	4,8	64,0	18,0
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8	70,2	12,0	27,0	2,0	3,1	42,0	11,3
<i>Azospirillum brasilense</i> 410	70,4	10,0	27,6	2,4	3,0	42,0	11,4
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8 + <i>Azospirillum brasilense</i> 410 (тридобова культура)	64,2	12,1	25,0	2,2	3,0	42,0	11,5
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8 + <i>Azospirillum brasilense</i> 410 (після зберігання)	66,0	12,4	24,0	2,4	2,8	42,0	12,6
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8 + <i>Azospirillum brasilense</i> 410 з альгінатом натрію (тридобова культура)	65,0	12,0	19,2	2,4	3,1	40,0	11,8
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8 + <i>Azospirillum brasilense</i> 410 з альгінатом натрію (після зберігання)	62,0	10,8	19,6	2,0	3,0	40,0	10,4
НІР ₀₅	2,0	1,1	1,0	0,02	0,03	1,4	0,6

За результатами проведених досліджень встановлено, що як чисті, так і змішані культури діазотрофів сприяли зменшенню на 4,0–6,4 кг/га втрат водорозчинного гумусу у порівнянні з контролем. При цьому найменші втрати азоту у вигляді нітратів спостерігали у варіантах з використанням комплексу бульбочкових бактерій сої та азоспірил за наявності в середовищі альгінату натрію. Даний ефект спостерігали як у варіанті зі свіжеотриманою культурою, так і після її зберігання.

Відмічено зменшення інтенсивності міграції CaO за сумісної бактеризації сої діазотрофами (у варіантах з альгінатом натрію) у порівнянні з варіантом без бактеризації, а також у порівнянні з варіантами, де передпосівну бактеризацію здійснювали за використання бактерій, культивованих у середовищі без альгінату натрію.

Бактеризація сприяла значному зменшенню втрат P_2O_5 , K_2O і MgO . При цьому не виявлено значної різниці між варіантами з діазотрофами, які застосовували в чистій культурі та мікроорганізмами, які використовували сумісно.

У цілому найменші втрати вологи, водорозчинного гумусу та біогенних елементів відмічено у варіантах із комплексом *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 з альгінатом натрію як при використанні свіжеотриманої культури, так і після зберігання.

Зменшення втрат біогенних елементів (зокрема, азоту) за дії бактеризації може свідчити про їх краще засвоєння ініційованими бактеризацією рослинами та завдяки цьому вплив на перебіг метаболічних процесів у рослинних клітинах. Показовим у цьому відношенні є функціонування фотосинтетичного апарату рослин, оскільки активне залучення азотних сполук рослиною сприяє підсиленню процесів хлоропластогенезу. Досліджено вплив бактеризації на інтенсивність утворення у листках рослин сої хлорофілів, за участі яких відбувається процес фотосинтезу. Цей процес є ключовим в утворенні рослинами органічних речовин за участі енергії світла. Крім того, вагомим є той факт, що продуктивність сільськогосподарських культур прямо залежить від інтенсивності фотосинтезу.

Вплив передпосівної бактеризації насіння сої на загальний вміст хлорофілів *a* і *b* в листках сої визначали у фазі цвітіння. Виявлено, що вміст цих пігментів зростає у варіантах з бактеризацією.

Найбільший вплив мікроорганізмів на вміст хлорофілів *a* і *b* виявлено у варіантах із змішаною культурою *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410. При цьому слід зазначити, що найвищий вміст хлорофілу *a* був у варіанті зі свіжою змішаною культурою бактерій без альгінату натрію, а хлорофілу *b* – у варіанті зі свіжою змішаною культурою бактерій з цим полісахаридом.

ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНОЇ ІНТРОДУКЦІЇ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ В АГРОЦЕНОЗИ СОЇ

Важливим вектором оцінки того чи іншого аграрного прийому, зокрема, бактеризації, в господарському аспекті є аналіз його ефективності. З цією метою досліджено вплив застосування комплексної інокуляції *B. japonicum* та *A. brasilense* у технології вирощування сої на її основні показники продуктивності, якості отримуваної продукції, а також на економічну та енергетичну ефективність виробництва.

Інтегральним показником, який визначає ефективність того чи іншого прийому, є урожайність сільськогосподарських культур. Дослідження продуктивності агроценозів сої за передпосівної обробки насіння бульбочковими бактеріями та азоспірилами засвідчили високу ефективність комплексної бактеризації. У середньому за три роки урожайність зерна у варіанті з *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 становила 2,96 т/га, що на 16 % вище щодо варіанта з інокуляцією чистою культурою бульбочкових бактерій, а у варіанті з *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 18-2 показники склали 2,78 т/га, що на 9 % вище щодо варіанту з чистою культурою ризобій (табл. 9).

Вплив передпосівної бактеризації на урожайність зерна сої сорту Легенда (2011–2013 рр.)

Варіант досліджу	Урожайність, т/га				Приріст урожаю	
	2011 р.	2012 р.	2013 р.	середнє за 3 роки	т/га	
					%	
Контроль (без бактеризації)	2,23	2,33	1,67	2,08	–	–
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8	2,61	2,87	2,17	2,55	0,47	22,6
Бактеризація <i>A. brasilense</i> 410	2,29	2,23	1,87	2,13	0,05	2,4
Бактеризація <i>A. brasilense</i> 18-2	2,25	2,22	1,70	2,06	–	–
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 та <i>A. brasilense</i> 410	3,06	3,18	2,63	2,96	0,88	42,3
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 та <i>A. brasilense</i> 18-2	2,94	3,10	2,30	2,78	0,70	33,7
НР ₀₅	0,36	0,16	0,21			

У всі фази розвитку рослин найвища надземна маса рослин сої була у варіантах з передпосівною комплексною бактеризацією насіння. Найвищі показники відмічено у варіанті з сумісним застосуванням бульбочкових бактерій і штаму *A. brasilense* 410: у фазі 3 листків цей показник перевищував варіант з *B. japonicum* М-8 на 12,7 %, у фазі цвітіння – на 20,6 %, а у фазі бобоутворення – на 31,5 %.

Додавання альгінату натрію сприяло підвищенню ефективності бактеризації за використання інокулянту після зберігання: у варіанті з *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання) урожайність у середньому за три роки досліджень була вищою на 15,6 %, а у варіанті з *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання) – на 11,3 % щодо варіанту без альгінату натрію (табл. 10).

Таблиця 10

Вплив передпосівної бактеризації на урожайність зерна сої сорту Легенда

Варіант досліджу	Урожайність, т/га (середнє за 2013–2015 рр.)	Приріст	
		т/га	%
Контроль (без бактеризації)	2,02	–	–
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410	2,75	0,75	37,5
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2	2,63	0,63	31,5
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 (4 місяці зберігання)	2,25	0,25	12,5
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 (4 місяці зберігання)	2,20	0,20	10,0
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 з альгінатом натрію	2,60	0,60	30,0
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 з альгінатом натрію	2,45	0,45	22,5
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання)	2,40	0,40	20,0
Бактеризація <i>B. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання)	2,38	0,38	19,0

У результаті визначення впливу передпосівної бактеризації на якість насіння сої встановлено, що найефективнішим виявився варіант із *V. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 з альгінатом натрію: вміст протеїну збільшився на 4,2 в. п. відносно контролю, а олії – на 2,7 в. п. (табл. 11).

Таблиця 11

Вплив передпосівної бактеризації на якість зерна сої сорту Легенда, польовий дослід 2015 р.

Варіант досліджу	Вміст	
	протеїну, % (на суху речовину)	олії, % (на суху речовину)
Контроль (без бактеризації)	39,7±0,2	18,4±0,2
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410	43,7±0,3	20,8±0,1
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2	43,3±0,4	20,5±0,3
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 (4 місяці зберігання)	42,5±0,2	19,5±0,2
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 (4 місяці зберігання)	42,2±0,3	19,2±0,2
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 з альгінатом натрію	43,9±0,3	21,1±0,1
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 з альгінатом натрію	43,2±0,4	20,4±0,2
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 410 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання)	43,4±0,3	20,8±0,6
Бактеризація <i>V. japonicum</i> М-8 і <i>A. brasilense</i> 18-2 з альгінатом натрію (4 місяці зберігання)	42,8±0,2	20,3±0,2

Одержані результати дають підставу стверджувати про доцільність використання інокулянта на основі змішаних культур мікроорганізмів *V. japonicum* та *A. brasilense* у технологіях вирощування сої.

В усіх досліджених варіантах спостерігається прибуткове виробництво сої. У варіантах, в яких інокулянт містив бульбочкові бактерії сої, спостерігається значне випередження темпів росту урожайності у порівнянні з витратами. Результатом є зменшення собівартості продукції. При цьому пропорційно до урожайності зростає і розмір виручки із розрахунку на 1 га, тобто збільшується дохідна частина. За комплексного впливу зазначених чинників зростає прибутковість виробництва, а окупність кожної додаткової гривні, витраченої на застосування інокулянтів, становить 31,01–50,65 грн додаткового прибутку. Найвищим рівнем економічної ефективності характеризується варіант з комплексною передпосівною бактеризацією *V. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410.

За результатами порівняльного аналізу можна зробити висновок щодо подібності тенденцій економічної та енергетичної ефективності досліджених інокулянтів. Так, у варіантах з інокулянтами на основі *V. japonicum* М-8, як у чистій культурі, так і в комплексі з азоспірами, спостерігається значне відставання темпів росту витрат антропогенної енергії у порівнянні зі збільшенням урожайності. В результаті коефіцієнти енергетичної ефективності (відношення енергії врожаю зерна до загальних витрат антропогенної енергії на

його отримання) по даних варіантах є значно вищими у порівнянні з контролем, а додаткові витрати енергії, пов'язані із застосуванням інокулянтів, у 29,62–33,01 рази окупаються енергією додаткового урожаю.

ВИСНОВКИ

У дисертації запропоновано та експериментально доведено стратегію регулювання ростової й функціональної активності *B. japonicum*, яка полягає у поєднанні діазотрофів різних видів, підборі умов їх спільного культивування і застосуванні за стабілізації чисельності життєздатних клітин бактерій, для їх ефективної інтродукції в агроценози сої, що дозволяє отримати додаткову якісну продукцію.

1. На основі проведених досліджень здійснено аналіз шляхів регулювання активності діазотрофів та запропоновано стратегію регулювання активності *B. japonicum*, яка передбачає отримання інокулянту з високим стабільним титром життєздатних клітин бактерій, які за інтродукції в агроценози сої максимально повно реалізують свій функціональний потенціал.

2. Встановлено закономірності росту *B. japonicum* у чистих і змішаних культурах у різних напівсинтетичних поживних середовищах. Показано, що вища ростова активність бульбочкових бактерій сої в контрольованих умовах досягається внаслідок інтенсивнішого росту бактерій у лаг-фазі, збільшення показників швидкості поділу клітин та зменшення тривалості генерації.

3. На ріст популяції *B. japonicum* в умовах *in vitro* істотно впливають метаболіти симбіотичних і асоціативних діазотрофів. Найвищий ефект виявлено при додаванні стерильної суспензії *A. brasilense* з розрахунку 5 % від об'єму середовища: при цьому щільність популяції *B. japonicum* збільшувалася від 1,2 до 2,2 рази щодо контролю.

4. Враховуючи різні потреби *B. japonicum* та *A. brasilense* у джерелах живлення, розроблено нове поживне середовища для сумісного культивування бульбочкових бактерій сої і азоспірил, яке забезпечує високу ростову активність досліджених мікроорганізмів.

5. Встановлено, що суттєвий вплив при сумісному культивуванні має початкове співвідношення клітин *B. japonicum* та *A. brasilense* у середовищі. У зв'язку з цим, вивчено закономірності росту цих діазотрофів у змішаній культурі за різної вихідної концентрації клітин і показано, що оптимальним співвідношенням бульбочкових бактерій і азоспірил є 1:1 за середньої початкової концентрації клітин бактерій (mid:mid). При цьому константа швидкості поділу ризобій є найвищою. Змішане культивування *B. japonicum* та *A. brasilense* зменшує дію стресових факторів (зміна консистенції середовища, концентрації поживних речовин, умов культивування тощо) на ріст бульбочкових бактерій сої у лаг-фазі.

6. Проведені дослідження ступеня сумісності *B. japonicum* та *A. brasilense* за симбіотичним індексом показали, що цей показник перевищує 1,0. Це свідчить про доцільність культивування ризобій з азоспірилами. Винятком є

деякі варіанти з середньою та максимальною кількістю ризобій, оскільки для азоспірил цей показник був нижчим за 1,0.

7. Встановлено дію стабілізаторів середовища поліетиленгліколю, гуміарабіку та альгінату натрію на ростову активність *V. japonicum* при глибинному культивуванні у напівсинтетичному середовищі. Показано, що жодна з досліджених добавок не стимулювала ріст ризобій. Відмічено інгібуючий вплив стабілізаторів у високих концентраціях на ростову активність *V. japonicum*. Найвищу чисельність цих діазотрофів відмічено у варіанті з середовищем, яке містило 0,2 % альгінату натрію.

8. Доведено доцільність використання альгінату натрію у технології виробництва інокулянтів для сої на основі *V. japonicum*, оскільки даний стабілізатор сприяє подовженню терміну зберігання бактеріальної культури. У дослідно-промислових умовах відпрацьовано технологію культивування *V. japonicum* та *A. brasilense* з альгінатом натрію у реакторі біологічному.

9. Встановлено, що добавки-стабілізатори сприяють подовженню терміну підтримання життєздатності бактерій на насінні. Найбільша кількість життєздатних клітин *V. japonicum* та *A. brasilense* спостерігається за використання полісахаридно-білкового комплексу.

10. Інокулянт з подовженим терміном зберігання на основі бульбочкових бактерій, культивованих з альгінатом натрію, сприяє збільшенню кількості листя на рослинах сої та площі їх асиміляційної поверхні.

11. Показано, що комплексна передпосівна бактеризація насіння сої сприяє збільшенню кількості й маси бульбочок, підвищенню активності азотфіксації у кореневій зоні рослин. При застосуванні змішаних культур діазотрофів урожайність сої збільшується у середньому на 0,23–0,41 т/га, або 9–16 %, порівняно з інокуляцією чистою культурою бульбочкових бактерій.

12. Механізм позитивного впливу комплексної бактеризації (*V. japonicum* + *A. brasilense*) на продукційний процес сої включає регулювання синтезу позаклітинних метаболітів. У культуральній рідині мікроорганізмів при сумісному культивуванні бульбочкових бактерій і азоспірил підвищується вміст цитокінінів і гіберелінів, зменшується кількість абсцизової кислоти і співвідношення ауксини/цитокініни порівняно з варіантами з чистими культурами бактерій, що сприяє оптимізації умов формування азотфіксувального симбіозу. За культивування *V. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410 у змішаній культурі також зростає загальна пектинолітична активність бактерій, що сприяє покращенню формування симбіотичної системи бактерій з рослинами сої на початкових етапах їх взаємодії.

13. Бактеризація змішаною культурою сприяє зменшенню втрат вологи, водорозчинного гумусу та поживних елементів. Як чисті, так і змішані культури діазотрофів сприяють зменшенню на 4,0–6,4 кг/га втрат водорозчинного гумусу. Найменші втрати азоту у формі нітратів відмічено у варіантах із сумісним використанням бульбочкових бактерій сої і азоспірил. Бактеризація сприяла значному зменшенню втрат P_2O_5 , K_2O і MgO . При цьому не виявлено значної відмінності між варіантами з діазотрофами, які застосовували в чистій культурі та сумісно. Відмічено зменшення інтенсивності

міграції СаО за бактеризації сої порівняно з варіантом без бактеризації. У цілому найменші втрати вологи, водорозчинного гумусу і біогенних елементів відмічено у варіанті з *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410.

14. Комплексна бактеризація характеризується вищим рівнем як економічної, так і енергетичної ефективності порівняно з варіантом без інокуляції та варіантом з інокуляцією насіння сої чистою культурою бульбочкових бактерій, при цьому найвищий рівень ефективності забезпечує сумісне використання *B. japonicum* М-8 та *A. brasilense* 410.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

На основі проведених багаторічних лабораторних, польових і виробничих дослідів рекомендується виробництву:

– спосіб підвищення ростової активності бактерій, який дозволяє отримати високоякісний інокулянт з підвищеним титром (у результаті сумісного культивування *B. japonicum* та *A. brasilense* у рідкому поживному середовищі забезпечується підвищення у порівнянні з чистою культурою титру бульбочкових бактерій у середньому на 52 %);

– спосіб підтримання життєздатності *Bradyrhizobium japonicum*, який забезпечує ефективну інтродукцію бульбочкових бактерій сої в агроценози (забезпечує подовження терміну збереженості мікроорганізмів у рідкому середовищі, при цьому зберігається висока функціональна активність азотфіксуючих бактерій; у порівнянні з аналогами термін збереженості життєздатності мікроорганізмів подовжується на 2–3 місяці);

– спосіб виготовлення бактеріального препарату для бактеризації сої для виробництва мікробного препарату на основі комплексу діазотрофів, який забезпечує підвищення врожайності й поліпшення якості сої (у порівнянні з аналогами застосування інокулянту на основі змішаної культури бульбочкових бактерій і азоспірил в технологіях вирощування сої сприяє збільшенню кількості бульбочок на корінні рослин від 56 до 88 %, збільшенню азотфіксуючої активності і підвищенню врожайності рослин від 12 до 13 %, сприяє покращенню якості отримуваної продукції).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії:

1. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Ковалевська Т. М., Токмакова Л. М., Копилов Є. П., **Козар С. Ф.**, Толкачов М. З., Мельничук Т. М., Чайковська Л. О., Шерстобоев М. К., Москаленко А. М., Халеп Ю. М. Мікробні препарати в землеробстві. Теорія і практика. За редакцією В. В. Волкогона. К., 2006. 312 с. (*Здобувачем висвітлено аспекти виготовлення і застосування різних форм мікробних препаратів для агропромислового виробництва, підготовлено розділ до друку*).

2. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Токмакова Л. М., Мельничук Т. М., Чайковська Л. О., Надкерничний С. П., Шерстобоев М. К., **Козар С. Ф.**,

Копилов Є. П., Крутило Д. В., Пархомено Т. Ю., Каменєва І. О., Адамчук-Чала Н. І., Ковалевська Т. М., Дідович С. В., Волкогон К. І., Пищур І. М., Волкогон М. В., Дімова С. Б., Комок М. С. Експериментальна ґрунтова мікробіологія. За редакцією В. В. Волкогона. К., 2010. 464 с. *(Здобувачем висвітлено методи дослідження активності корисних ґрунтових мікроорганізмів).*

3. Волкогон В. В., Заришняк А. С., Гриник І. В., Бердніков О. М., Центило Л. В., Надкернична О. В., Москаленко А. М., Токмакова Л. М., Надкерничний С. П., **Козар С. Ф.**, Копилов Є. П., Мельничук Т. М., Шерстобоев М. К., Дімова С. Б., Ковалевська Т. М., Крутило Д. В., Волкогон К. І., Пищур І. М., Халеп Ю. М., Дідович С. В., Цвей Я. П., Жеребор Т. А., Комок М. С., Воробей В. С., Доценко О. В., Григор'єва О. М., Волчовська-Козак О. Є., Нагорний В. І., Мурач О. М. Методологія і практика використання мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур. За науковою редакцією В. В. Волкогона. К., 2011. 156 с. *(Здобувачем визначено методологічні і практичні аспекти застосування біопрепаратів на основі асоціативних і симбіотичних діазотрофів в технологіях вирощування сільськогосподарських культур).*

Статті у наукових фахових виданнях України:

4. Козар С. Ф. Азотфіксуючі бактерії як стимулятори росту рослин. Вісник Одеського національного університету. 2001. Вип. 4. С. 165–168.

5. **Козар С. Ф.**, Ковалевська Т. М., Ушакова М. А. Азотфіксуючі бактерії як регулятори росту рослин кукурудзи. Агроекологічний журнал. 2002. № 4. С. 54–57. *(Здобувачем проведено дослідження стимулювальної дії на рослини нових штамів діазотрофів, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).*

6. Козар С. Ф. Антагоністичні відносини бацил із представниками ґрунтових діазотрофів та перспективи використання їхніх комплексів при вирощуванні сільськогосподарських культур. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2003. № 3. С. 302–307.

7. **Козар С. Ф.**, Ушакова М. А. Антагонізм азотобактера щодо ґрунтових діазотрофів та вплив комплексів бактерій на ріст рослин. Агроекологічний журнал. 2004. № 2. С. 31–34. *(Здобувачем досліджено взаємовідносини активних ґрунтових діазотрофів та вплив їх комплексів на рослини, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).*

8. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Хаїтова Н. О. Порівняльна оцінка токсичності деяких фунгіцидів щодо біоагентів мікробних препаратів. Аграрний вісник Причорномор'я. 2004. Вип. 26. Ч. 2. С. 44–49. *(Здобувачем визначено токсичну дію фунгіцидів щодо активних штамів діазотрофів, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).*

9. Козар С. Ф. Біологічна ефективність комплексного застосування мікробних препаратів. Сільськогосподарська мікробіологія. 2005. Вип. 1–2. С. 86–94.

10. Козар С. Ф. Вплив мікробних препаратів на активність мікрофлори ризосферного ґрунту ярого ячменю. Вісник Харківського національного аграрного університету імені В. В. Докучаєва. 2006. № 4. С. 126–133.

11. Козар С. Ф. Мікробні комплекси за участю азоспірил як регулятори росту рослин. Агроекологічний журнал. 2008. С. 109–111.

12. Козар С. Ф. Комплексне застосування діазотрофів для підвищення урожайності озимого жита. Основи формування продуктивності сільськогосподарських культур за інтенсивних технологій вирощування. Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. 2008. С. 312–316.

13. **Козар С. Ф.,** Усманова Т. О. Регулювання ростової активності популяції промислових штамів *Bradyrhizobium japonicum* в умовах *in vitro*. Сільськогосподарська мікробіологія. 2008. Вип. 7. С. 36–47. (Здобувачем досліджено ростову активність бульбочкових бактерій сої у напівсинтетичних середовищах з продуктами метаболізму різних видів діазотрофів та підготовлено статтю до друку).

14. **Козар С. Ф.,** Усманова Т. О., Жеребор Т. А. Ріст *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* у змішаній культурі в умовах *in vitro*. Сільськогосподарська мікробіологія. 2011. Вип. 13. С. 70–82. (Здобувачем проведено дослідження ростової активності бульбочкових бактерій сої і азоспірил за їх сумісного культивування, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).

15. **Козар С. Ф.,** Скорик В. В., Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Вплив стабілізаторів на ріст, життєздатність і функціональну активність *Bradyrhizobium japonicum*. Сільськогосподарська мікробіологія. 2012. Вип. 15–16. С. 58–70. (Здобувачем досліджено життєздатність і ростову активність бульбочкових бактерій за дії стабілізаторів, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).

16. **Козар С. Ф.,** Нестеренко В. М., Євтушенко Т. А., Фірсовський О. В., Усманова Т. О. Ефективність застосування мікробного препарату АБТ в технології вирощування цибулі ріпчастої. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Агрономія». 2013. Вип. 183. С. 207–214. (Здобувачем запропоновано ідею роботи та вивчено активність діазотрофів-біоагентів мікробного препарату АБТ).

17. Козар С. Ф. Вплив джерел біогенних елементів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* та *Azospirillum brasilense* за їх сумісного культивування. Сільськогосподарська мікробіологія. 2013. Вип. 18. С. 75–86.

18. Козар С. Ф. Вплив комплексної бактеризації на продуктивність сої. Вісник аграрної науки. 2015. № 5. С. 49–53.

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних

19. Козар С. Ф. Оптимізація середовища для сумісного культивування *Bradyrhizobium Japonicum* і *Azospirillum Brasilense*. Сільськогосподарська мікробіологія. 2014. Вип. 19. С. 27–32.

20. **Козар С. Ф.**, Пищур І. М., Нестеренко В. М. Вплив *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* на вертикальну міграцію сполук біогенних елементів за вирощування сої. Сільськогосподарська мікробіологія. 2015. Вип. 21. С. 39–43. (Здобувачем досліджено вертикальну міграцію сполук біогенних елементів за використання діазотрофів у технології вирощування сої, здійснено аналіз даних та підготовка статті до друку).

21. **Kozar S. F.**, Symonenko E. P., Lynnyk V. O., Kaplunenko V. H. Influence of nanocarboxylates of microelements on *Rhizobium radiobacter* 204 growth-regulating activity. Сільськогосподарська мікробіологія. 2015. Вип. 22. С. 3–8. (Здобувачем проведено аналіз ростової активності бактерій та підготовлено статтю до друку).

22. Халеп Ю. М., **Козар С. Ф.** Економічна та енергетична ефективність комплексної бактеризації при вирощуванні сої. Сільськогосподарська мікробіологія. 2016. Вип. 23. С. 24–29. (Здобувачем досліджено ефективність комплексної бактеризації сої бульбочковими бактеріями і азоспірами та підготовлено статтю до друку).

23. **Козар С. Ф.**, Євтушенко Т. А., Потапенко Л. В., Чмель О. П. Міграція сполук біогенних елементів за застосування комплексних інокулянтів для сої. Сільськогосподарська мікробіологія. 2016. Вип. 24. С. 24–28. (Здобувачем досліджено вплив комплексних інокулянтів на основі *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* на вертикальну міграцію біогенних елементів, здійснено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).

24. **Козар С. Ф.**, Євтушенко Т. А., Нестеренко В. М. Вплив речовин різного хімічного складу на життєздатність діазотрофів на насінні сільськогосподарських культур. Сільськогосподарська мікробіологія. 2017. Вип. 25. С. 10–17. (Здобувачем запропоновано ідею роботи, досліджено життєздатність діазотрофів на насінні за дії стабілізаторів та підготовлено статтю до друку).

25. **Козар С. Ф.**, Євтушенко Т. А., Усманова Т. О., Симоненко Є. П. Мікробіоценоз ризосферного ґрунту та продуктивність пшениці озимої за використання бактерій *Agrobacterium radiobacter* 204, активованих нанокарбоксилатами металів. Сільськогосподарська мікробіологія. 2017. Вип. 26. С. 17–23. (Здобувачем досліджено мікробіоценоз ризосферного ґрунту бактеризованих рослин, здійснено аналіз отриманих даних та підготовлено статтю до друку).

26. Козар С. Ф. Продукування фітогормонів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* за їх сумісного культивування. Сільськогосподарська Мікробіологія. 2018. Вип. 28. С. 33–40.

Стаття у науковому виданні іншої держави

27. **Kozar S. F.**, Symonenko E. P., Volkohon V. V., Volkogon M. V. Nanocarboxylates of molybdenum and of iron enhance the functional activity of *Rhizobium radiobacter* 204. Applied Nanoscience. 2019. Vol. 9. № 5. С. 795–800. (Здобувачем розроблено концепцію використання нанокарбоксилатів металів для підвищення активності діазотрофів, підготовлено статтю до друку).

Патенти України на корисну модель:

28. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Спосіб підвищення ростової активності бактерій: патент 79361 Україна. № u201209861; заявлено 15.08.2012; опубліковано 25.04.2013. Бюл. № 8. 5 с. *(Здобувачем запропоновано сумісне культивування діазотрофів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense*, досліджено їх ростову активність, написання патенту).*

29. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Спосіб виготовлення бактеріального препарату для бактеризації сої: патент 103966 Україна. № a201209859; заявлено 15.08.2012; опубліковано 25.09.2013. Бюл. № 18. 4 с. *(Здобувачем досліджено умови сумісного культивування бульбочкових бактерій сої і азоспірил, здійснено аналіз ефективності комплексної бактеризації сої, написання патенту).*

30. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Спосіб підтримання життєздатності *Bradyrhizobium japonicum*: патент 107857 Україна. № a201304311; заявлено 15.08.2012; опубліковано 25.09.2013. Бюл. № 18. 4 с. *(Здобувачем досліджено чисельність бульбочкових бактерій сої у поживному середовищі з альгінатом натрію, написання патенту).*

Науково-методичні праці та рекомендації виробництву:

31. Сайко В. Ф., Коваленко П. І., Волкогон В. В., Драч Ю. О., **Козар С. Ф.** Раціональне використання і охорона земельних ресурсів (Біопрепарати і стимулятори росту). Наукові основи агропромислового виробництва в зоні Лісостепу України. К., 2004. С. 518–571. *(Здобувачем висвітлено особливості застосування біопрепаратів на основі діазотрофів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур).*

32. Козар С. Ф. Биологические элементы технологии выращивания ярового ячменя на основе комплексного использования микробных препаратов. Информационный Листок. Черниговский Государственный Центр Научно-Технической и Экономической Информации. 2005. № 04. 3 с.

33. Мельник С. І., Жилкін В. А., Гаврилюк М. М., Сніговий В. С., Лісовий М. М., Дишлюк В. Є., Волкогон В. В., Надкернична О. В., Токмакова Л. М., Надкерничний С. П., Ковалевська Т. М., **Козар С. Ф.**, Копилов Є. П., Гончар Ю. О., Крутило Д. В., Піщур І. М., Дімова С. Б. Рекомендації з ефективного застосування мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур. К., 2007. 52 с. *(Здобувачем висвітлено сучасні умови ефективного використання мікробних препаратів у агропромислового виробництві).*

34. Сайко В. Ф., Коваленко П. І., Волкогон В. В., Драч Ю. О., **Козар С. Ф.** Раціональне використання і охорона земельних ресурсів (Біопрепарати і стимулятори росту). Наукові основи агропромислового виробництва в зоні Лісостепу України. К., 2010. С. 190–202. *(Здобувачем висвітлено особливості застосування мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур).*

35. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Спосіб інтенсифікації ростової активності діазотрофів для підвищення урожайності сільсько-

господарських культур. Аграрна наука – виробництву. 2014. № 3. С. 7. *(Здобувачем досліджено ростову активність бактерій, підготовлено публікацію до друку).*

36. Ковалевська Т. М., **Козар С. Ф.**, Крутило Д. В., Горбань В. П., Романова І. М., Усманова Т. О. Методи культивування та тривалого зберігання бульбочкових бактерій в колекціях: методичні рекомендації. Чернігів, 2015. 36 с. *(Здобувачем здійснено аналіз методів культивування і зберігання бульбочкових бактерій сої).*

37. Волкогон В. В., Заришняк А. С., Пилипенко Л. А., Рудюк А., Дишлюк В. Є., Надкернична О. В., Москаленко А. М., Токмакова Л. М., **Козар С. Ф.**, Копилов Є. П., Бердніков О. М., Центило Л. В., Дімова С. Б. Мікробні препарати в сучасних аграрних технологіях: [науково-практичні рекомендації]. К., 2015. 248 с. *(Здобувачем висвітлено особливості застосування мікробних препаратів у сучасних технологіях вирощування сільськогосподарських культур).*

38. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Євтушенко Т. А. Спосіб підтримання життєздатності бульбочкових бактерій – біоагентів мікробних препаратів для сої. Аграрна наука – виробництву. 2016. № 3. С. 12. *(Здобувачем досліджено чисельність бульбочкових бактерій сої у поживному середовищі з альгінатом натрію, підготовлено публікацію до друку).*

39. Бердніков О. М., Валентій О. А., Потапенко Л. В., **Козар С. Ф.**, Євтушенко Т. А. Удосконалення технології вирощування сої на Поліссі. Аграрна наука – виробництву. 2017. № 2. С. 15. *(Здобувачем запропоновано новий мікробний препарат Нітро-Лег для бактеризації сої).*

Тези наукових доповідей:

40. **Козар С. Ф.**, Ушакова М. А. Вплив азотфіксувальних бактерій та продуктів їх метаболізму на озиме жито. Онтогенез рослин, біологічна фіксація молекулярного азоту та азотний метаболізм: Міжнародна наукова конференція, м. Тернопіль, 1–4 жовтня 2001 року: тези доповіді. Тернопіль, 2001. С. 194–197. *(Здобувачем досліджено розвиток рослин за дії діазотрофів і підготовлено матеріали для публікації).*

41. **Козар С. Ф.**, Ушакова М. А., Погорилько Н. В. Створення штучних асоціацій діазотрофів для інокуляції озимого жита. Сталий розвиток агроєкосистем: Міжнародна наукова конференція, м. Вінниця, 17–20 вересня 2002 року: тези доповіді. Вінниця, 2002. С. 105–107. *(Здобувачем проведено дослідження і підбрано комбінації діазотрофів, які стимулюють ріст і розвиток рослин; підготовлено матеріали для публікації).*

42. Козар С. Ф. Антагоністичні відносини з представниками ґрунтових діазотрофів та здатність їхніх комплексів регулювати ріст рослин. Актуальні проблеми сучасного землеробства: Міжнародна науково-практична конференція, м. Луганськ, 14–16 травня 2003 року: тези доповіді. Луганськ, 2003. С. 225–229.

43. **Козар С. Ф.**, Усманова Т. О., Хаїтова Н. О. Перспективи створення комплексних мікробних препаратів для аграрного виробництва. X з'їзд

Товариства мікробіологів України, м. Одеса, 15–17 вересня 2004 року: тези доповіді. Одеса, 2004. С. 58. (Здобувачем висвітлено шляхи створення нових біопрепаратів на основі різних видів азотфіксувальних бактерій; підготовлено матеріали для публікації).

44. Козар С. Ф. Проблеми регулювання росту популяцій бульбочкових бактерій сої *in vitro* і удосконалення препаратів на їхній основі. XII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Ужгород, 25–30 травня 2009 року: тези доповіді. Ужгород, 2009. С. 380.

45. Козар С. Ф. Сумісне культивування діазотрофів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* та ефективність бактеризації ними сої. XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Ялта, 1–6 жовтня 2013 року: тези доповіді. Сімферополь, 2013. С. 164.

46. Kozar S. F. Perspectives of mixed crops diazotrophs *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. Microbiological aspects of optimization of the production process of cultured crops: proceedings of the international scientific and practical internet conference, Chernihiv, June 16–18, 2015. Chernihiv, 2015. С. 29.

47. Євтушенко Т. А., **Козар С. Ф.**, Пищур І. М. Вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на ростову і функціональну активність *Bradyrhizobium japonicum*. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: XI наукова конференція молодих вчених, м. Чернігів, 5–6 жовтня 2016 року: тези доповіді. Чернігів, 2016. С. 20–22. (Здобувачем вивчено вплив нанокарбоксилатів металів на активність бульбочкових бактерій сої; підготовлено матеріали для публікації).

48. Козар С. Ф. Регулювання активності діазотрофів за їх комплексної інтродукції в агроценози сої. XV З'їзд Товариства Мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Одеса, 11–15 вересня 2017 року: тези доповіді. Львів, 2017. С. 269.

АНОТАЦІЯ

Козар С. Ф. Теоретичне обґрунтування та управління активністю діазотрофів за їх інтродукції в агроценози сої. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 03.00.07 «Мікробіологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено теоретичному обґрунтуванню та управлінню ростовою й функціональною активністю азотфіксувальних бактерій для їх ефективної інтродукції в агроценози сої шляхом реалізації стратегії, яка полягає у поєднанні діазотрофів різних видів, підборі умов їх сумісного культивування і застосування за стабілізації чисельності життєздатних клітин бактерій.

За показниками симбіотичного індексу та ростової активності бульбочкових бактерій сої і азоспірил доведено доцільність поєднання цих мікроорганізмів. Запропоновано нове поживне середовище для *B. japonicum* і *A. brasilense* та досліджено умови поєднаного культивування цих діазотрофів.

Розроблено спосіб підтримання життєздатності бульбочкових бактерій сої за використання альгінату натрію. Підібрано склад полісахаридно-білкового комплексу для подовження терміну збереженості бактерій на насінні.

Досліджено функціональну активність і ефективність сумісного застосування *B. japonicum* і *A. brasilense* за їх інтродукції в агроценози сої. Доведено, що за поєднання діазотрофів формується ефективна симбіотична бобово-ризобіальна система, що забезпечує надходження додаткового біологічного азоту. За результатами аналізу вмісту позаклітинних фітогормонів, що синтезуються ґрунтовими мікроорганізмами, показано, що при сумісному культивуванні бульбочкових бактерій сої і азоспірил зростає інтенсивність продукування мікроорганізмами цитокинінів і гіберелінів, зменшується кількість абсцизової кислоти і показник співвідношення ауксини/цитокиніни у порівнянні з варіантами чистих культур досліджених азотфіксувальних бактерій. Показано, що за поєднаного культивування *B. japonicum* і *A. brasilense* підвищується пектолітична активність бактерій.

За передпосівної інокуляції сої змішаною культурою *B. japonicum* і *A. brasilense* відмічено збільшення маси рослин, вмісту хлорофілів у листках сої, вмісту протеїну і олії в продукції. При сумісному застосуванні діазотрофів урожайність сої збільшується у середньому на 9–16 % у порівнянні з інокуляцією чистою культурою бульбочкових бактерій. Встановлено, що інокуляція сої змішаною культурою сприяє зменшенню інтенсивності вимивання водорозчинного гумусу та сполук біогенних елементів по ґрунтовому профілю. Реалізація запропонованої стратегії регулювання активності діазотрофів за їх інтродукції в агроценози забезпечує підвищення рівня як економічної, так і енергетичної ефективності вирощування сої.

Ключові слова: азотфіксувальні бактерії, змішана культура, ростова активність, азотфіксація, життєздатність, поживні середовища, агроценоз, соя, урожайність і якість продукції.

АННОТАЦИЯ

Козар С. Ф. Теоретическое обоснование и управление активностью диазотрофов при их интродукции в агроценозы сои. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.07 «Микробиология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Диссертация посвящена теоретическому обоснованию и управлению ростовой и функциональной активностью азотфиксирующих бактерий для их эффективной интродукции в агроценозы сои путем реализации стратегии, которая заключается в совмещении диазотрофов различных видов, подборе условий их совместного культивирования и применения при стабилизации численности жизнеспособных клеток бактерий.

Проведенные исследования показали, что активность диазотрофов может изменяться под влиянием внешних факторов (температура, влажность, химические соединения различной природы, микроорганизмы). Отмечено, что

необходима разработка конкретных способов повышения ростовой и функциональной активности клубеньковых бактерий для их эффективной интродукции в агроценозы сои. В связи с этим предложено стратегию решения поставленной задачи путем получения инокулянта с высоким титром и функциональной активностью за счет сочетания ризобактерий, а также с более стабильным количеством жизнеспособных клеток, которое предлагается обеспечить путем использования добавок-стабилизаторов.

Исследованы особенности роста *B. japonicum* в полусинтетических средах. Осуществлен анализ показателей численности клеток клубеньковых бактерий сои, константы скорости деления и продолжительности генерации и показано, что получение более высокого титра этих микроорганизмов происходит за счет их интенсивного роста в начальные фазы культивирования, чего можно достичь путем подбора оптимальной среды.

Изучена возможность повышения ростовой активности клубеньковых бактерий за счет добавления продуктов метаболизма, которые содержатся в стерильной культуральной жидкости других видов азотфиксирующих бактерий, принадлежащих к родам *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*. Самый высокий стимулирующий эффект в отношении роста клубеньковых бактерий обнаружено при добавлении стерилизованной суспензии *A. brasilense* в невысоких концентрациях.

Разработано питательную среду для совместного культивирования *B. japonicum* и *A. brasilense*. Исследованы параметры роста бактерий и выявлено, что, начиная с лаг-фазы, численность исследуемых микроорганизмов при совместном культивировании выше по сравнению с вариантами, где клубеньковые бактерии и азоспирилы выращивали в чистых культурах.

Показано, что существенное влияние на ростовую активность микроорганизмов при смешанном культивировании имеет начальная численность клеток бактерий и соотношение численности клеток *B. japonicum* и *A. brasilense* в среде. Выявлено, что для клубеньковых бактерий сои показатель симбиотического индекса, который характеризует совместимость микроорганизмов, превышал 1,00. Это прослеживается во всех вариантах с различными концентрациями клеток и их соотношениями, за исключением вариантов со средним и высоким количеством ризобий в соотношении с азоспирилами 1: 2,5 и 1: 1 соответственно.

Исследовано влияние полиэтиленгликоля, гуммиарабика и альгината натрия на ростовую активность *B. japonicum* при глубинном культивировании в полусинтетической среде. Показано, что при выращивании ризобий ни одна из исследуемых добавок не стимулирует их рост. Однако добавление в среду альгината натрия способствует повышению жизнеспособности клубеньковых бактерий сои при хранении. На основе проведенных исследований разработаны и защищены патентом новый способ поддержания жизнеспособности *B. japonicum*.

Поскольку при интродукции азотфиксирующих бактерий в агроценозы особенно критическим является снижение количества жизнеспособных клеток

микроорганизмов в период времени от бактериализации семян до начала развития корневой системы растения, проведенны исследования, направленные на повышение жизнеспособности *B. japonicum* на семенах за счет использования веществ различной природы. Установлено, что среди исследуемых соединений наиболее эффективными оказались полимеры, поскольку при их действии численность микробных клеток на семенах была выше по сравнению с другими вариантами. Подобрано комплекс веществ для продления срока сохранности бактерий на семенах.

Исследовано функциональную активность и эффективность совместного применения *B. japonicum* и *A. brasilense* при их интродукции в агроценозы сои. Установлено, что в вариантах с комплексной предпосевной бактериализацией семян как масса, так и количество клубеньков на корнях растений существенно выше по сравнению с вариантами, где применяли моноинокуляцию. При совместном использовании исследуемых бактерий отмечено повышение азотфиксирующей активности клубеньков сои.

Результаты анализа содержания внеклеточных фитогормонов, которые синтезируются грунтовыми микроорганизмами, показали, что при совместном культивировании клубеньковых бактерий сои и азоспирил возрастает интенсивность выработки микроорганизмами цитокининов и гиббереллинов, уменьшается количество абсцизовой кислоты и показатель соотношения ауксина/цитокинина по сравнению с чистыми культурами исследуемых азотфиксирующих бактерий. Показано, что при совместном культивировании *B. japonicum* и *A. brasilense* повышается пектолитическая активность бактерий.

При предпосевной инокуляции сои смешанной культурой *B. japonicum* и *A. brasilense* отмечено увеличение массы растений, содержания хлорофиллов в листьях сои, содержания протеина и масла в продукции.

При применении смешанных культур diaзотрофов урожайность сои увеличивается в среднем на 9–16 % по сравнению с инокуляцией чистой культурой клубеньковых бактерий. Установлено, что бактериализация сои смешанной культурой способствует уменьшению интенсивности вымывания водорастворимого гумуса и соединений биогенных элементов. Реализация предложенной стратегии регулирования активности diaзотрофов при их интродукции в агроценозы обеспечивает повышение уровня как экономической, так и энергетической эффективности выращивания сои.

Ключевые слова: азотфиксирующих бактерии, смешанная культура, ростовая активность, азотфиксация, жизнеспособность, питательные среды, агроценоз, соя, урожайность и качество продукции.

ANNOTATION

Kozar S. F. Theoretical Justification and Management of Diazotroph Activity Under Their Introduction Into Soybean Agrocenoses. – The Manuscript.

Thesis for the degree of doctor of agricultural sciences in specialty 03.00.07 Microbiology. National University of Life and Environmental Science of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis paper is devoted to the theoretical justification and management of growth and functional activity of nitrogen-fixing bacteria for their efficient introduction into soybean agrocenosis by implementing a strategy that involves combination of diazotrophs of different species, selection of the conditions for their co-cultivation and use after stabilization of the number of viable bacterial cells.

According to the parameters of symbiotic index and growth activity of nodule soybean bacteria and azospirilla, reasonability of combining these microorganisms has been proved. A new digest medium for *B. japonicum* and *A. brasilense* was proposed, and the conditions of the co-cultivation of these diazotrophs have been studied. A method for maintaining the viability of nodule bacteria by using sodium alginate has been developed. The composition of the polysaccharide-protein complex was selected to extend viability of the bacteria on the seeds.

Functional activity and efficacy of combined use of *B. japonicum* and *A. brasilense* under their introduction into soybean agrocenoses were studied. It has been proved that the combined use of diazotrophs forms an efficient symbiotic legume-rhizobial system, which provides additional biological nitrogen. According to the analysis of the content of extracellular phytohormones, synthesized by soil microorganisms, it was shown that co-cultivation of nodule soybean bacteria and azospirilla increases the intensity of production of cytokinins and gibberellins by microorganisms, reduces the amount of abscisic acid and auxin/cytokine ratio compared with pure cultures of studied nitrogen-fixing bacteria. It was shown that the combined cultivation of *B. japonicum* and *A. brasilense* increases the pectolytic activity of bacteria.

Pre-sowing inoculation of soybean with mixed culture of *B. japonicum* and *A. brasilense* showed an increase in plant mass, chlorophyll content in soybean leaves, protein and oil content in the products. Combined use of diazotrophs increases soybean yields by an average of 9–16 % compared with inoculation of pure culture of nodule bacteria. It was found that inoculation of soybean with mixed culture contributes to the reduction of the leaching intensity of water-soluble humus and compounds of biogenic elements by soil profile. The implementation of the proposed strategy for regulating the activity of diazotrophs under their introduction into agrocenoses provides an increase in the level of both economic and energy efficiency of soybean cultivation.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, mixed culture, growth activity, nitrogen fixation, vitality, nutrient media, agrocenosis, soybean, yield and product quality.