

НУБІП України

НУБІП України

**МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА**

06.07. – БР. 216 «С». 2023.02.15. 16 ПЗ  
НУБІП України

ЗАБОЛОТНА ІРИНА СЕРГІЇВНА

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 57.085.23

ПОГОДЖЕНО  
Декан факультету  
захисту рослин, біотехнологій та екології  
Коломієць Ю.В.  
2023 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувача кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття  
Кваско О.Ю.  
2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Вплив біопрепаратів на основі бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas* на чисельність ризоферної мікрофлори ґрунту за вирощування огірків в закритому ґрунті»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

д. с.-г. наук, доцент

(науковий ступінь та вчене звання)

Бородай В.В.

(підпис)

(ПІБ)

Виконав

Заболотна І.С.

(підпис)

(ПІБ студента)

КИЇВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри

“ ” \_\_\_\_\_ 2023 р.

ЗАВДАННЯ  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Заболотної Ірини Сергіївни  
(прізвище, ім'я по-батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Вплив біопрепаратів на основі бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas* на чисельність ризосферної мікрофлори ґрунту за вирощування огірків в закритому ґрунті»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи бактерії, живильні середовища, біопрепарати.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Вплив біопрепаратів на основі бактерій роду *Pseudomonas* та *Bacillus* щодо ризосферної мікрофлори ґрунту.
2. Вплив біопрепаратів на основі бактерії роду *Pseudomonas* та *Bacillus* щодо патогенних мікроорганізмів в ґрунті.
3. Встановити ефективність біопрепаратів.

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Біологічні особливості огірка ( <i>Cucumis sativus L.</i> ) та технологія вирощування огірків в закритому ґрунті.....	8
1.2 Роль ризосфери при вирощуванні огірків.....	16
1.3 Біологічні препарати на основі роду <i>Bacillus</i> та <i>Pseudomonas</i> для вирощування огірків.....	27
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	41
2.1 Місце та умови проведення дослідів.....	41
2.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ.....	42
2.3 Методи проведення досліджень.....	48
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РОБОТИ.....	56
3.1 Динаміка розвитку ризосферних мікроорганізмів за вирощування огірків в закритому ґрунті.....	56
3.2 Антагоністична активність <i>Pseudomonas</i> та <i>Bacillus</i> щодо фітопатогенних грибів.....	59
3.3 Ефективність біологічних препаратів для контролю захворювань та підвищення продуктивності культури огірка.....	62
ВИСНОВКИ.....	68
Список використаної літератури.....	69

## РЕФЕРАТ

Дипломна робота була виконана протягом 2022-2023 рр. в Інституті захисту рослин НААН. Складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел.

**Мета дипломного проекту:** дослідити вплив біопрепаратів на основі бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas* на чисельність ризосферної мікрофлори ґрунту за вирощування огірків в умовах закритого ґрунту.

### Завдання досліджень:

1. Встановити вплив біопрепаратів на основі бактерій роду *Pseudomonas* та *Bacillus* щодо ризосферної мікрофлори ґрунту.
2. Дослідити вплив біопрепаратів на основі бактерій роду *Pseudomonas* та *Bacillus* щодо патогенних мікроорганізмів в ґрунті.
3. Встановити ефективність біопрепаратів.

**Об'єкт досліджень:** обґрунтування комплексного використання біопрепаратів щодо розвитку мікрофлори ґрунту при вирощуванні рослин в закритому ґрунті.

**Предмет досліджень:** бактерії роду *Pseudomonas* та *Bacillus*, сорт огірка «Настуня F1», збудники мікозів (*Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*), штами бактерій, норми використання біологічних препаратів.

**Методи дослідження:** мікробіологічні (антифунгальна активність, виділення чистих культур), біотехнологічні (підбір поживних середовищ), математично-статистичні та фітопатологічні.

## ВСТУП

Вирощування овочів в умовах закритого ґрунту є ключовим напрямком в агропромисловому комплексі України, яке забезпечує споживачів свіжими овочами протягом усього року та дозволяє досягати високих врожаїв на одиницю площі.

Огірки (*Cucumis sativus L.*) відіграють важливу роль серед культур закритого ґрунту, забезпечуючи значний валовий збір овочевої продукції протягом вегетаційного періоду.

Формування родючості ґрунту, продуктивності і якості рослин визначається значущим впливом ґрунтової мікрофлори. Використання хімічного захисту в надмірній кількості призводить до зменшення чисельності практично всіх груп мікроорганізмів, що призводить до порушення функціонального зв'язку в ризосфері та зниження біологічної активності ґрунтів. Це призводить до підвищення чисельності фітопатогенних видів, що сприяє розвитку небезпечних хвороб рослин, таких як борошниста роса, антракноз, біла, сіра та кореневі гнилі. Знищення сходів *Cucumis sativus L.* досягає 30%, а зменшення врожаю — 23—38% і більше.

Кореневі гнилі, спричинені ґрунтовими патогенами роду *Fusarium* та *Alternaria*, це серйозні та поширені захворювання огірків у закритому ґрунті. Застосування біопрепаратів є невід'ємною частиною системи захисту рослин від шкідників та хвороб у закритому ґрунті, особливо з урахуванням обмежень на використання пестицидів протягом вегетаційного періоду, встановлених Законом України про пестициди і агрохімікати. Серед компонентів біологічної системи захисту важливе місце займає використання біологічних препаратів, таких як Планриз (заснований на бактеріях *Pseudomonas fluorescens AP-33*), Гаупсин (заснований на бактеріях *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*) та Фітоцид (розроблений на основі бактерії *Bacillus subtilis*).

Таким чином, актуальні дослідження спрямовані на підвищення біологічної активності ґрунту та визначення найбільш ефективних методів для обмеження поширення та шкідливості патогенів *Sclerotinia sclerotiorum* L. в умовах закритого ґрунту[3].

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

### 1.1 Біологічні особливості огірка (*Cucumis sativus* L.) та технологія вирощування огірків в закритому ґрунті.

Огірок походить з тропічних і субтропічних районів Північної Індії, де ще й зараз у передгір'ї Гімалаїв трапляється велике різноманіття його дикого родича з дуже гіркими плодами – це огірок Хардвіка (*C. sativus* subsp. *agrestis* Gab.), який є надзвичайно стійким проти хвороб, особливо борошнистої роси. Розмаїття сортів формувалося на сході – у Китаї та Японії та на заході – у Малій Азії, Європі, у т. ч. і в Україні (Рис.1.1).

Греція була першою європейською країною до якої завезли культуру, перші згадки про огірок належать до 600 р. до н.е., звідси вирощування поширилося на Францію, Німеччину та Італію. В Європі широке поширення набув в XVI ст., коли вирощувати огірки стало символом сімейного достатку та благополуччя.

Вирощування огірка в Україні почалося в IX ст., рослина була і залишається однією з найпоширеніших сільськогосподарських культур, що має велику кулькість сортів [18].



Рис 1.1 Огірок посівний.

Стебло більшості сортів огірка повзуче, розгалужене, п'ятигранне, борознисте з жорстким опушенням, завдовжки 0,6–2,0 м: коротке (до 60 см), середнє (60–150 см), довге (більше 150 см). Його часто називають огудиною.

Довжина головного стебла досягає 250 см. Під час росту стебло розгалужується, даючи до 10 пагонів першого порядку, на яких можуть утворюватися пагони

другого порядку. В поперечному розрізі стебло має ребристу структуру та покрите твердими волосками. На стеблі є вусики, які використовуються для прикріплення до будь-якої опори. Пазухи листків на головному стеблі формують пагони першого

порядку, із них виходять пагони другого та наступних порядків. У сучасних

гібридів часто спостерігається утворення коротких букетних гілочок з пучками зав'язей замість бічних пагонів.

Швидкість дозрівання плодів залежить від здатності сорту формувати плоди на пагонах різних порядків. Швидкозріючі сорти та гетерозисні гібриди

плодоносять на головному стеблі та пагонах першого порядку, водночас,

пізнозріючі сорти (наприклад, сорт Фенікс 640) розвивають плоди на пагонах другого та третього порядків. Важливою особливістю стебла, яке використовується

у насінництві, є його здатність утворювати додаткові корені в міжвузлях. Для досягнення цього рослини легко припинають, що підвищує стійкість до вітру та

підвищує врожайність [18,22].

Коренева система огірка має стрижневу та густо розгалужену структуру, складається з основного кореня, який може простягатися на глибину до 60–70 см та

численних бічних коренів. Головні корені переважно розташовані в орному шарі

грунту (глибина до 30 см), але окремі корені можуть проникати на глибину до 1

метра. Розміщення кореневої системи на поверхні свідчить про високі вимоги рослини до вологості ґрунту. Важливо відзначити, що навіть при значному

розподілі кореневої системи в ґрунті, вона не ефективно асимілює поживні

речовини і може засвоювати їх лише при певній температурі (+20°C) та у

легкозасвоювальній формі. Надто важлива є наявність достатньої кількості поживних речовин для підтримання нормального росту та розвитку рослини. У холодних та неосвоєних ґрунтах розвиток кореневої системи відбувається повільно (Рис 1.2) [18].

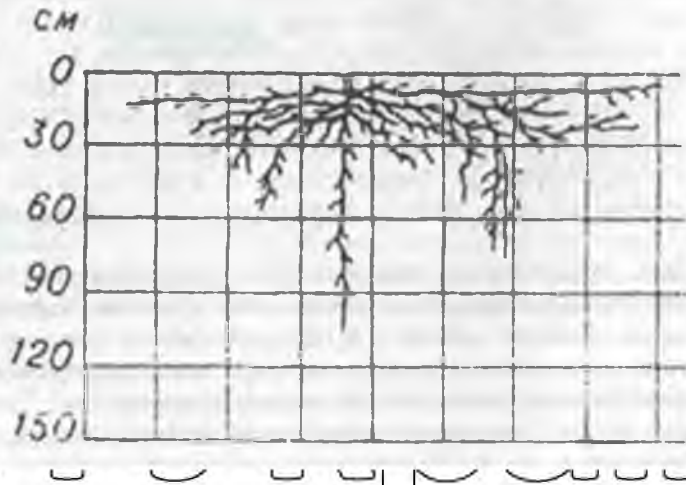


Рис 1.2 Коренева система огірка посівного.

Листя велике, чергове, черешкове, зазвичай 3-5-лопінні, рідше цілісні. Мають л'ягукутну форму листків з округленням. Колір листкової пластинки в нормі може бути від світло-зеленого до темно-зеленого, це залежить від розташування листка на стеблі та особливостей сорту. Зміна кольору, розміру або форми листка свідчать про наявність захворювання або порушення технології вирощування.

Огірок випускає три типи квіток: жіночу, її також називають маточкова квітка, чоловічу (тичинкову), та квітку гермафродита, що містить в собі жіночі і чоловічі форми. Жінсча квітка містить в собі тонкі квітконоси, а також у її основі наявна зав'язь. Чоловіча квітка має властивість рости гронами, квітка рохтасована на тонкій огудині та містить в собі три тичинки.

Особливістю більшості гібридів є наявність лише маточкової квітки. Плід огірка – неправильна ягода, круглої або видовженої форми. Існують 3 типи плодів: зеленець, корнішон та пікуль. Зеленець різних сортів відрізняються за ступенем опушення та величиною горбків. Колір опушення огірків сягає від

чорного до білого. Колір плодів огірка коливається від білого і зеленого до жовтого та оранжевого.

Залежно від призначення плоди збирають на різних стадіях розвитку. Для засолення або маринування використовують пікулі (3 – 5 см) та корнішони (6 – 9 см). Для споживання у свіжому вигляді використовують великі плоди, розмір яких 10-15 см.

Культура огірка – найпоширеніший овоч, що використовують в домашньому приготуванні для маринування, засолки, свіжого використання.

Огірок складається з води (95%), не містить в собі білки та вуглеводи і завдяки цьому це низькокалорійний овоч. Рослина огірка багата на калій, вітамінами групи В (В1, В2, В5, В6), К, С, Е, РР і провітамінном А.

В Україні для вирощування огіроків в закритому ґрунті найбільш відомими гібридами є: Анжеліна F1, Баккара F1, Дельтастар F1, Фламінго F1, Медіа F1, Вентура F1, Тристан F1, Аламір F1, Ісатіс F1 та Самба F1 та інші.

Огірок – складна біологічна система. Його коренева система, листки, пагони, квітки, плоди перебувають у тісній взаємодії, на яку значно впливають умови вирощування: температура, волога, світло, склад повітря, субстрат, елементи живлення тощо [28].

Усі ці фактори для рослин необхідні та рівнозначні за дією. Жоден із них не може замінити інший, оскільки це призведе до порушення впливу решти факторів. Для нормального росту і розвитку рослин потрібно створити оптимальні умови, забезпечуючи названі вище фактори в достатній кількості протягом усього періоду вегетації огірка. Як правило, урожайність культури визначається фактором, який є недостатнім. Тому, розробляючи систему агроприйомів для вирощування стабільно високого і якісного врожаю, необхідно знати вимоги рослин огірка до умов вирощування, іншими словами знати їх біологічні особливості. При цьому

слід своєчасно визначати фактори, які негативно впливають на ріст і розвиток рослин та обмежувати їх дію.

Огірок – тепловимоглива культура, насіння проростає за температури 10 – 12 °С, листки та плоди розвиваються за температури 15 – 16 °С, оптимальна температура для проростання рослини є 25 – 30 °С. Найбільш сприятлива температура для росту та розвитку до плодоношення сягає 24 – 28 °С у сонячний день, 18 – 22 °С у пасмурний день, температуру вночі слід підтримувати на рівні 12 °С. При підвищенні температури субстрату до 17 – 20 °С сходи з'являються на 10-ту добу, а до 25 °С – на 5 – 6-ту добу. При плодоношенні оптимальна температура

сягає 24 – 30 °С вдень та 16 °С вночі. Температура нижче 10 °С призводить до припинення росту, пожовтіння і загнивання сходів, а тривале її зниження – навіть до призупинення росту, утворення нових пагонів та коренів рослин, а зниження температури до 3 – 4 °С спричинює загибель рослин [Ошибка! Источник ссылки не найден.,20].

Процеси росту і розвитку рослин проходять у температурному діапазоні 15 – 42 °С, при цьому вдень оптимальною є температура повітря 25 – 30 °С, а вночі – 15 – 18 °С. Оптимальна температура в зоні кореневої системи – 19 – 20 °С.

Протягом вегетативного періоду (від сходів до плодоношення) у теплиці температуру повітря вдень підтримують на рівні 22 – 24 °С, залежно від освітленості. Саме така температура повітря при добрій освітленості забезпечить максимальну інтенсивність росту рослин. Оптимум нічної температури визначається денною температурою та інтенсивністю освітлення попереднього дня.

За твердженням більшості вчених, мінімальна температура повітря вночі в теплицях повинна становити не нижче 15 – 17 °С. Зниження температури до 12 – 14 °С спричиняє ураження рослин аскохітозом, кореневими гнилями, осипання зав'язей, викривлення плодів і погіршення їх смакових якостей. Нічна температура повітря 15 – 17 °С сприяє росту кореневої системи, утворенню і посиленому росту

бокових пагонів, збільшенню кількості жіночих квіток. Квітки в рослин огірка розкриваються за температури  $15^{\circ}\text{C}$ , а диліжки –  $17^{\circ}\text{C}$ . Підвищення нічної температури повітря до  $21 - 23^{\circ}\text{C}$  сприяє формуванню чоловічих квіток, особливо за низької інтенсивності освітлення, стимулює налив зав'язей, які утворились, призводить до прискорення процесів розвитку і старіння рослин. При цьому повільно відростають бокові пагони, формуються невеликі листки, посилюється інтенсивність дихання, опадають зав'язі та збільшується кількість грушоподібних плодів.

Огірок – світлолюбна рослина. При вирощуванні огірка в умовах короткого дня (10 – 12 год на добу) пригнічується розвиток рослини і утворення зав'язей. Слід зазначити що оптимальними умовами для вирощування рослини є тривалість доби 10 – 12 годин та освітлення від 6 до 7 тис. люкс, а збільшення світлового дня (до 16 год на добу) спонукає початок плодоношення, проте знижує урожайність. За умови зменшення освітлення в плодах накопичується менше цукрів та інших поживних речовин. Світло високої інтенсивності сприяє активному росту, розгалуженню і цвітінню рослини. Також кількість сонячного світла в теплиці впливає на формування плодів огірка [20].

В теплицях для збільшення врожаю використовують досвічування та проводять регулювання густоти рослин (густина може становити 2 – 3 рослини на 1 м<sup>2</sup>). В теплицях також проводять мульчування ґрунту світловідбиваючими речовинами (тирса, солома, біла плівка). Під час інтенсивного росту листової пластинки необхідно проводити освітлююче санітарне очищення листя. Збільшення тривалості світлового дня до 16 год призводить до затримання плодоношення і зниження врожайності плодів. Інтенсивність ростових процесів в огірка вища в умовах довгого дня, проте селекціонерами створено гібриди, які є пластичними до довжини дня.

Культура огірка вибаглива до вологості субстрату та вологості повітря. Це пов'язано з їх походженням (вологіий регіон), слабкорозвиненою, неглибоко розміщеною кореневою системою, великою випаровуючою поверхнею листків та високими темпами формування врожаю. Рослини огірка вбирають воду з ґрунту із силою 13 атм., а транспіраційний коефіцієнт становить 330 – 500 і є одним із найбільш високих серед теплолюбних культур. Огірок випаровує 1 л води за годину з 1 м<sup>2</sup>, тому поливна доза повинна становити 3 л/м<sup>2</sup>. Найбільше води, 20,1–27,2 % рослини огірка витрачають удень і найменше 12,3 % – у ранкові години. Для формування 1 т урожаю їм необхідно до 200 м<sup>3</sup> води.

Прийнята відносна вологість повітря сягає 80 – 90%. Протягом росту рослини необхідно підтримувати рівень вологості ґрунту на рівні 70 – 80%, а в період цвітіння та плодоношення – 55 – 60%. Встановлено, що з настанням водного дефіциту в тканинах огірка знижується вміст хлорофілу й аскорбінової кислоти, сповільнюється засвоєння кисню та порушується обмін речовин, що зумовлює погіршення росту і розвитку рослин. Тому підтримання оптимальної вологості субстрату і повітря під час вирощування огірка в теплицях є однією з важливих умов забезпечення нормального розвитку рослин, одержання високих сталих урожаїв якісних плодів.

Шкідливий для культури також перезволожений ґрунт, це призводить до руйнування кореневої системи. Культура огірка високочутлива до короткочасних затоплень ґрунту.

Оптимальним субстратом для огірка є родючі ґрунти, які містять в собі велику частку гумусу та легкі за механічним складом. Важкі та холодні ґрунти негативно впливають на ріст та розвиток культури. Рослина огірка вибаглива до рівню кислотності в ґрунті, оптимальним значенням рН є 6,4–7, за умови якщо показники зменшуються в огірка проявляються ознаки нестачі Mg, та не витримує засоленість ґрунту [33].

Для росту та розвитку рослини необхідні наступні елементи живлення в певних кількостях: N – 3, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 1,2, K<sub>2</sub>O – 3,2 кг. Особливою характеристикою культури є висока швидкість створення надземної маси та висока швидкість поглинання поживних речовин. Слід зауважити, що необхідно підтримувати наявність елементів живлення в субстраті, так як коренева система рослини розташована в одному шарі. Протягом росту рослина використовує 27,5 кг нітрогену, 14,6 кг фосфору, 41,2 кг калію. Необхідно вносити азот в період проростання та утворення надземної частини рослини, а в період плодоношення рекомендують вносити калій.

Як відомо, повітря атмосфери на 78 % складається з азоту, близько 21 – кисню, 0,03 – вуглекислого газу і до 0,93 % – аргону, ксенону, криптону, гелію тощо. У повітрі, що міститься в ґрунті, вуглекислого газу більше, а кисню – менше.

Для життєдіяльності рослин найбільш важливими є кисень і вуглекислий газ.

Кисень використовується для дихання та участі в хімічних реакціях окислення органічних і мінеральних речовин у ґрунті. Він повинен надходити до всіх органів рослин – кореневої системи, стебел, листків. В атмосферному повітрі його вміст поповнюється за рахунок фотосинтезу, а в ґрунтовому повітрі – за рахунок газообміну. Інтенсивність і характер газообміну залежать від гранулометричного

складу, пористості ґрунту, поливів температури. Якщо ґрунт за гранулометричним складом важкий, перезволожений чи недостатньо розпушений, то газообмін погіршується і доступ кисню до кореневої системи утруднюється. Це спричиняє

різке підвищення вмісту вуглекислого газу в ґрунтовому повітрі, унаслідок чого ріст рослин значно пригнічується. Газообмін повинен відбуватися і в субстраті, адже надлишок CO<sub>2</sub> чи нестача повітря в ньому пригнічує дихання коренів і мікроорганізмів [18,28].

Встановлено, що для вирощування 30 кг/м<sup>2</sup> плодів огірка необхідно 3,8 – 4,3 кг вуглекислого газу, тоді як в 1 м<sup>3</sup> повітря його міститься близько 0,5 кг.

Збільшення його концентрації в повітрі до 0,13–0,2 % підвищує інтенсивність фотосинтезу. Дослідженнями визначено, що підживлення рослин вуглекислим газом у захищеному ґрунті суттєво впливає на збільшення врожайності плодів огірка. При цьому в листках збільшується кількість хлорофілу, рослини краще розвиваються, підвищується їх стійкість до хвороб і шкідників. Нижня межа концентрації вуглекислого газу в повітрі для рослин С3-групи (до якої належить огірок) – 0,005 %, для рослин С4-групи (кукурудза, просо, сорго) – 0,0003 % . Підвищення в десять разів концентрації CO<sub>2</sub> навколо листків приводить до майже пропорційного збільшення інтенсивності фотосинтезу.

Огірок – ефективна сільськогосподарська продукція, що широко використовується в повсякденному житті, містить цінні амінокислоти та вітаміни для споживачів. Культура вимоглива до біотичних та абіотичних факторів тож в закритому ґрунті слід створювати оптимальні умови для отримання високоякісної продукції[26].

### 1.2 Роль ризосфери при вирощуванні огірків.

Для розвитку культури огірка важливе значення має не тільки мікрофлора ґрунту у цілому, але особливо мікробне населення зони корневих систем рослин, що називається ризосферою.

Корені змінюють структуру ґрунту, виділяють значну кількість вуглекислоти, яка досить різко впливає на розчинність деяких мінеральних сполук, енергетичні речовини (цукри, органічні кислоти, амінокислоти, спирти та ін.), вітаміни, стимулятори росту, що обумовлюють розмноження сапрофітної мікрофлори. Мікрофлора поверхні кореня (ризоплана) в певній мірі також відрізняється від мікробного ценозу ризосфери. В ризоплані переважають грамнегативні бактерії. На поверхні коренів рослин спостерігається менше мікроорганізмів, ніж в області біля коренів. Це може бути обумовлено тим, що корені виділяють не тільки поживні для мікроорганізмів речовини, а й продукують

фітонциди, що інгібують розвиток мікроорганізмів у ризоплані. В зоні молодого коріння розмножуються переважно неспоріві бактерії і мікроскопічні гриби, тоді як бацили поширені слабо, що пов'язано з тим, що ці бактерії погано споживають прості органічні сполуки, які виділяються у таких зонах кореня[31].

Ризосфера та ризоплана являються областю інтенсивної мікробної активності, керованої корневими ексудатами та умовами середовища проростання рослин. У ризоплані слабо розмножуються целюлозо розкладаючі мікроорганізми, актиноміцети і гриби, яких досить багато у ризосфері. Кількість сапрофітних бактерій у ризоплані значно вища, ніж у ризосфері.

Щільність ґрунтових популяцій мікроорганізмів залежить від органічно-мінерального складу ґрунту, температури, вологості, рівня рН ґрунтового розчину і коливається від тисяч до мільярдів клітин на грам ґрунту. Найбільше органічної речовини міститься у верхніх шарах ґрунту на глибині від 5 до 15 сантиметрів. У нижніх горизонтах ґрунтового профілю кількість органічної речовини зменшується і разом з тим знижується чисельність мікробіоти.

Ґрунтові мікроорганізми належать до різних таксономічних груп та вирізняються за функціональною активністю (екологічною функцією).

Встановлено, що найпоширеніші у ґрунтах мікроорганізми належать до родів

*Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*.

Склад мікрофлори в кореневій зоні ґрунту зазнає змін природи, в залежності від виду рослин і їх фази розвитку. Показано, що серед культуральних бактерій ризосфери огірків близько 9% складали представники роду *Microbacterium* (Рис 1.3).

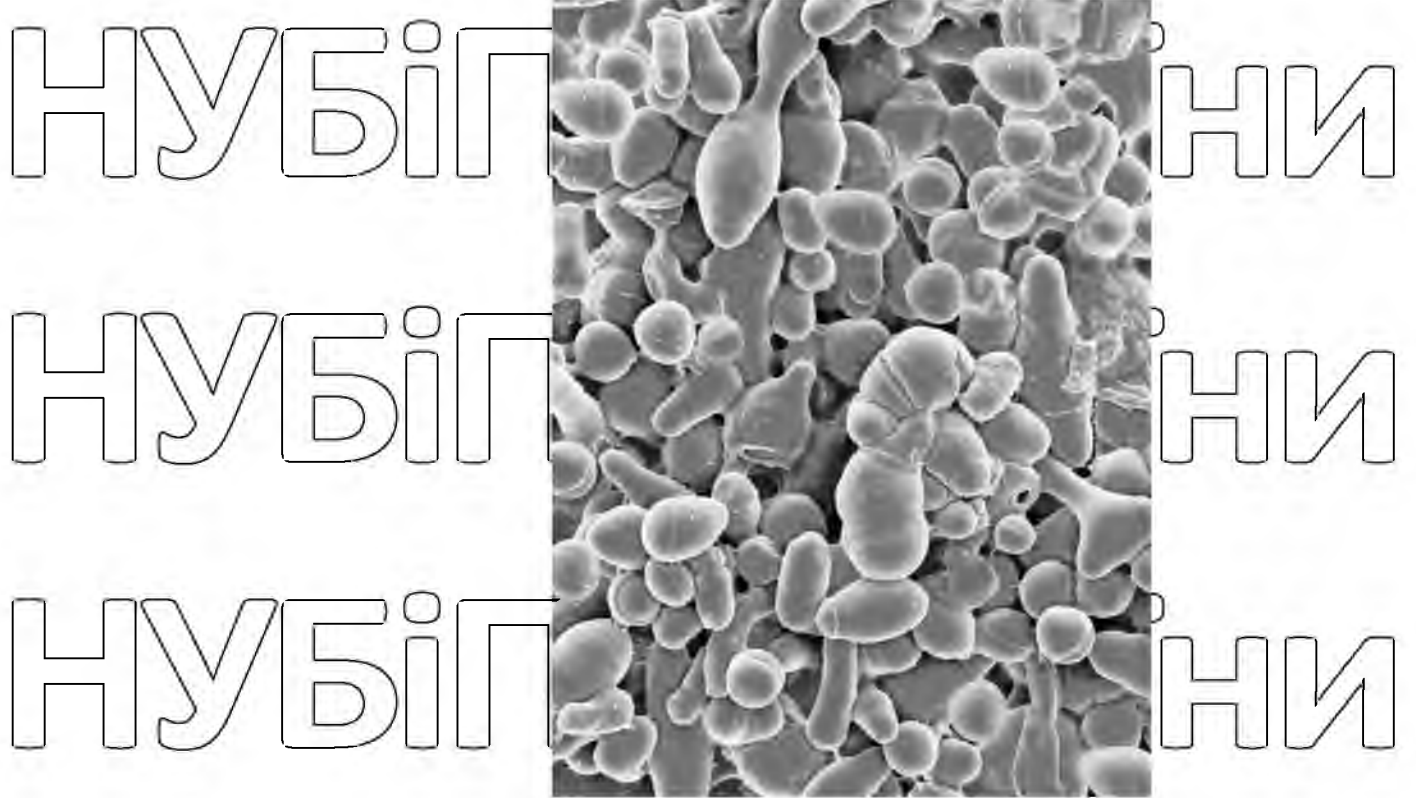


Рис 1.3. Бактерій роду *Microbacterium*.

Роди *Penicillium* і *Streptomyces* відзначаються як найбільш розповсюджені серед мікроорганізмів, що розчиняють мінеральні фосфати (Рис 1.4, Рис 1.5).



Рис 1.4. Гриби роду *Penicillium*.

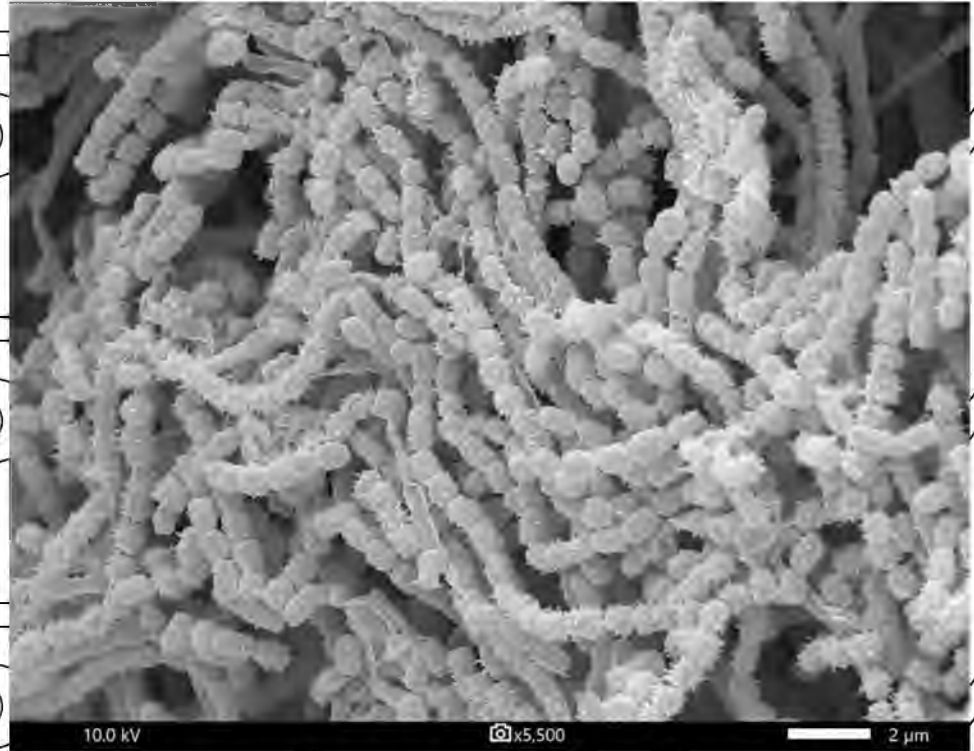


Рис 1.5. Бактерій роду *Streptomyces*.

У неризосферному ґрунті домінували бактерії роду *Bacillus* (Рис 1.6). Однак, було показано, що бактеріальне різноманіття, як правило, нижче у ризосфері, ніж у загальному об'ємі ґрунту.

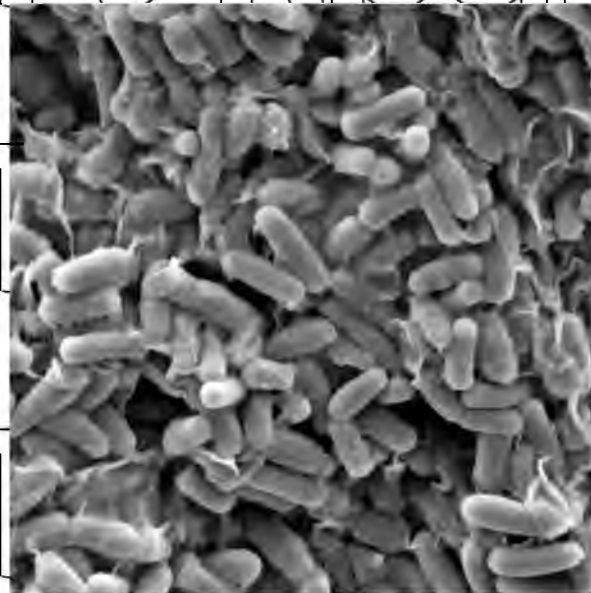


Рис 1.6 Бактерій роду *Bacillus*.

Наукове дослідження показало, що в ґрунтовому шарі, де кисень відсутній, основну кількість бактерій представляють роди *Bacillus* та *Clostridium*, в той час як у верхньому шарі ґрунту, де кисень присутній, переважають бактерії роду протеобактерій. У ризосфері та у ризоплані на різних стадіях розвитку рослини переважають грам негативні сапрофітні бактерії роду *Pseudomonas*. (Рис 1.7)



Рис 1.7. Бактерії роду *Pseudomonas*.

Головним геохімічним циклом ґрунту є цикл вуглецю, що включає у себе процес синтезу органічної речовини фототрофними організмами з вуглекислого газу та подальшу перетворення її на прості сполуки. Під впливом внесення рослинних решток у ґрунті спостерігається спалах чисельності різних груп мікроорганізмів і підвищення їх біохімічної активності. Найбільш поширеною вуглецевмісною сполукою в природі є целюлоза.

Її вміст у сухій масі рослин складає від 40 до 70 %. У природних умовах трансформація целюлози здійснюється за участі мікроорганізмів. У ґрунті виявлені різні групи мікроорганізмів, які виконують важливі функції для росту рослин і підтримання ґрунтової екосистеми. Гриби, такі як *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Dicoccum*, *Stachybotrys*, *Penicillium* і *Aspergillus*, грають важливу роль у розкладанні органічної речовини в ґрунті. В одній молекулі целюлози міститься до 14 тисяч

молекул  $\beta$ -D-глюкози. Крім того, при деструкції целюлозних решток у ґрунтах утворюються різноманітні сполуки: органічні кислоти, альдегіди, амінокислоти, спирти та інші біологічно активні речовини. Речовини, що утворюються при розкладі целюлозних матеріалів, споживаються іншими представниками біоценозу ґрунту[4].

Після внесення рослинних матеріалів у ґрунт, кількість целюлозоруйнівних мікроорганізмів збільшується значно, що сприяє розкладанню органічної речовини. Домінуючими були мікроскопічні гриби і бактерії.

Співвідношення різних родів і видів целюлозоруйнівних мікроорганізмів (бактерій, актиноміцетів, грибів) у ґрунтах залежить від багатьох факторів: типу ґрунту, характеру рослинності, кліматичних умов тощо.

Мікроорганізми в ґрунті виробляють речовини, які сприяють росту та розвитку рослин. Синтез ними в кореневій зоні вітамінів (тіаміну, вітаміну B12, пиридоксину, рибофлавіну, пантотенової кислоти), а також фітогормонів (гіберелінів, гетероауксинів), спричиняє позитивний вплив на розвиток рослин. Крім того, мікроорганізми можуть бути джерелом накопичення у ґрунті токсичних речовин. Бактерії роду *Bacillus* і *Pseudomonas* грають важливу роль у цьому процесі.

Найбільш помітний фітотоксичний вплив спричиняли *B. amilosina*, *B. brevis* і *Pseudomonas fluorescens* та деякі інші. Синтез фітотоксичних речовин в ґрунті зазвичай викликаний введенням рослинних залишків або певних вуглеводів у ґрунт[11,12].

Введення рослинних залишків чи певних вуглеводів до ґрунту може призвести до синтезу фітотоксичних речовин, але це також збільшує кількість антагоністичних мікроорганізмів, таких як бактерії, актиноміцети і гриби роду *Trichoderma*, та зменшує кількість фітопатогенних грибів, таких як *Helminthosporium*. При посіві пшениці після кукурудзи у її кореневій зоні підвищується кількість мікроміцетів родів *Penicillium* та *Aspergillus*. Таким чином,

склад мікробного ценозу ґрунту, вміст у ньому як корисної, так і фітопатогенної та фітотоксичної для культурних рослин мікрофлори залежить від ряду факторів: виду вирощуваної культурної рослини, характеру обробітку ґрунту, фізико-хімічних його властивостей.

Більшість потреб рослин у азоті задовольняються завдяки біологічному азоту, який складає більше ніж 2/3 від їх загальних потреб. Частка біологічного азоту у врожаї становить від 60% до 90%. Загальна щорічна кількість азотфіксації в екосистемах становить приблизно 175-190 мільйонів тонн.

Активність азотфіксації характеризується у мікроорганізмів, таких як бульбочкові бактерії, роди *Clostridium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, синьо-зелені водорості та інші бактерії. У середині двадцятого століття вважалося, що азотфіксувальні мікроорганізми відносяться до двох основних груп: вільноживучих та симбіотичних азотфіксаторів. Однак, після дослідження функціонування у агроценозах огірків азотфіксувальних бактерій роду *Azospirillum* стало зрозумілим питання щодо існування більш тісних, асоціативних зв'язків азотфіксувальних мікроорганізмів з небобовими рослинами. Значна роль у поповненні біосфери азотом належить симбіотрофній азотфіксації. Цей процес відбувається завдяки

бактеріям, що утворюють бульбочки на корінні чи стеблах рослин, та іншим мікроорганізмам, які розкладають азотовмісні органічні речовини. Вказані мікроорганізми відносяться до родів *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*. Для цих видів бактерій є характерною певна специфічність до видів і навіть до певних сортів рослин, з якими вони здатні формувати ефективні симбіотичні взаємовідносини [13].

У мікробних спільнотах ґрунту завжди присутні різні види бактерій, які відповідають за розклад азотовмісних органічних речовин, окрім азотфіксувальних мікроорганізмів. Процес розкладу цих речовин протікає з виділенням амонію і

називається амоніфікацією. Утворений аміак є початковим матеріалом для іншої групи мікроорганізмів, відомих як нітрифікатори. Процес перетворення амонію спеціалізованими бактеріями, спочатку у нітриди, а потім у нітрати, або, у випадку гетеротрофних мікроорганізмів, у різні органічні азотовмісні сполуки, називається процесом нітрифікації. Основними чинниками цього процесу є автотрофні бактерії родів *Nitrosomonas* і *Nitrobacter*. Пізніше було виявлено, що велика кількість гетеротрофних мікроорганізмів має здатність окиснювати амоній та інші азотовмісні сполуки до нітриту і нітрату. Відомості, які нам відомі зараз, свідчать, що гетеротрофна нітрифікація відіграє важливу та часто провідну роль у процесі окиснення відновлених азотних сполук [40].

Нітрат, що накопичується в ґрунті при нітрифікації, може споживатися рослинами, а також багатьма видами мікроорганізмів в асиміляційному процесі. Більш доступною формою азоту для рослин є амоній, оскільки нітрат необхідно відновлювати до  $\text{NH}_4^+$ , що потребує додаткових витрат енергії. Проте, споживання амонію або нітратів рослинами залежить від різних факторів, таких як характеристики ґрунту (його рН, вміст катіонів, співвідношення нітратів і амонію), стадія розвитку рослин і їх біологія. На ґрунтах з низьким рівнем кислотності ефективніше використовувати нітратні добрива, тоді як на нейтральних ґрунтах амонійні добрива можуть бути більш вигідними. При окультуренні ґрунтів серед різних форм азоту в них зростає відсоток нітрату з 20 % у ґрунтах з низькою родючістю і до 60 % – у добре окультурених. У більшості випадків це обумовлено інтенсифікацією процесу нітрифікації [39].

Важливим елементом біосфери є фосфор. За своїм впливом на розвиток рослин він займає друге місце після азоту. Вміст фосфору в ґрунтах України сягає 0,05-0,15 %, а в метровому шарі ґрунту в залежності від його типу складає від 3,8 до 22,9 т/га, тоді як у дерновопідзолистих ґрунтах – близько 4 т/га. В той же час у ґрунтах Західних регіонів України вміст фосфору в метровому шарі ґрунту складає

1,3-4,5 т/га. Фосфор в ґрунті присутній у формі органічних сполук, таких як фітин, гліцерофосфат, залишки нуклеїнових кислот та інших органічних з'єднань, а також у вигляді важкорозчинних неорганічних сполук. Фітин відіграє головну роль у зберіганні органічного фосфору в ґрунті. Вміст фосфору в органічних сполуках ґрунту сягає 25- 85 % від його загальної кількості, а по відношенню до органічної речовини ґрунту його вміст складає від 0,5 до 2,0 %. Від 15 до 75 % фосфору ґрунту знаходиться у формі важкорозчинних неорганічних сполук: фосфату кальцію, заліза, алюмінію, що входять до складу ряду мінералів (апатиту, фторопатиту, фосфориту, віваніту тощо). У зв'язку з тим, що фосфор у ґрунті знаходиться у важкодоступних для рослин формах, при загальному його вмісті в орному шарі 1000 кг/га у ґрунтовому розчині його вміст не перевищує 1 кг. Незважаючи на високий загальний вміст фосфору в ґрунті, значна частина його присутність в малорухливих формах. Рослини можуть використовувати лише дуже невелику частку доступного фосфору в ґрунті, приблизно від 3% до 5%. Навіть фосфатні добрива, які вводяться в ґрунт, мають низьку ефективність у засвоєнні рослинами. Доступність для рослин фосфору в рік внесення добрив у ґрунт складає від 10 до 30 %. Це обумовлено здатністю окислів кальцію, заліза, алюмінію та інших елементів, а також глинистих мінералів не тільки зв'язувати іони фосфору, але й утримувати їх.

Мікроорганізми різних видів мають здатність виділяти фосфор з важкорозчинних сполук, які містять залізо, алюміній та кальцій. Вони широко розповсюджені в агроєкосистемах. Так, їх вміст у ризоплані кукурудзи сягає 45 %, бавовнику та мандарину – 60 % від загальної чисельності мікрофлори. Згідно з іншими даними, вміст фосфатмобілізуювальних мікроорганізмів у ризосфері сільськогосподарських культур сягає 15-30 %. Найбільша їх кількість спостерігається у ризосфері цукрових буряків та огірків, тоді як у ризосфері озимої пшениці, ячменю, гороху їх значно менше. Активністю мобілізації фосфату з важкорозчинних сполук характеризуються мікроорганізми родів *Pseudomonas*,

*Azotobacter*, *Enterobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, сульфатвідновлювальні бактерії роду *Desulfobacterium*, везикулярно-арбускулярні мікоризні гриби, *Trichoderma* та інші [12,25,29].

Мобілізувати фосфор з важкорозчинного фосфату кальцію здатні мікроміцети роду *Trichoderma*. Їх фосфатмобілізувальна активність складала близько 70 % показників *Bacillus megaterium subsp. phosphaticum*. Інокуляція насіння огірків цими грибами покращувала його ріст і підвищувала врожайність культури.

У ґрунті поширені мікроорганізми, які здатні мобілізувати фосфор з органічних сполук. Значна роль у цьому процесі належить спороутворювальним бактеріям роду *Bacillus*. Органічні сполуки фосфору здатні розкладати бактерії родів *Pseudomonas*, мікроміцети родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichotecium*, *Alternaria*, дріжджі *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*. Це досягається завдяки здатності мікроорганізмів синтезувати фосфатази.

Важливе значення в живленні рослин належить калію. Калій є необхідним та невід'ємним елементом для рослин, який впливає на фізичний стан клітинних колоїдів, підвищує гідрофільність протоплазми та проникність стінок клітин, визначає їхній тургор і стійкість до різних негативних факторів у навколишньому середовищі. Недостатнє постачання калію може призвести до зниження морозостійкості рослин, їх вразливості до посухи, надмірної вологості, шкідників і захворювань. Протягом росту рослин калій знаходиться, головним чином, в іонній формі і тільки близько 1 % – у складі білкових сполук клітин.

Потенційні запаси  $K_2O$  у метровому шарі ґрунтів складають від 180 до 350 т/га. Вміст цього елемента в орному шарі сягає 24-51 тон на гектар і коливається від 0,1 % в торф'яних ґрунтах до 2,3-2,4 % – у чорноземах звичайних. З підвищенням у ґрунті вмісту тонкодисперсних часточок, у них, як правило, зростає кількість

калієвмісних мінералів типу польових шпатів та тришарових алюмосилікатів, у яких калій є важкодоступним для рослин. Інтенсифікація росту рослин і підвищення їх врожайності за рахунок внесення азотних та фосфорних добрив підвищує використання культурними рослинами калію на 44-46 % у порівнянні з неудобреним фоном. Більшість країн світу стикаються з від'ємним балансом калію в ґрунтах, що призводить до зменшення ефективності використання азотних та фосфорних добрив. Доступність калію для рослин у певній мірі забезпечується впливом мікроорганізмів та хімічних чинників. Існують дослідження, які підтверджують здатність мікроорганізмів мобілізувати калій із мінералів, таких як мусковіт, гідромусковіт і біотит, в ґрунті. Проте, не своєчасно велика кількість наукових публікацій присвячена цій проблемі, незважаючи на її велику важливість. Тому цей аспект потребує подальших досліджень і більшої уваги в науковому співтоваристві.

Найбільша кількість бактерій як у ризосфері, так і у ризоплані знайдено у фазу цвітіння рослин. Найменша ж їх кількість відповідає стадії дозрівання. Безпосередня дія на ґрунт приводить до зміни у мікробних ценозах ризосфери та ризоплани у цілому. За допомогою підтримання рівня вологості на оптимальному рівні (60%) та регулярному рихленні ґрунту можна компенсувати негативну дію фітопатогенів [11].

Основні патогени можуть конкурувати за ризосферу із мікоризними грибами та виявляти прямий або опосередкований вплив на склад бактеріальних груп у ризосфері. Хімічний контроль є найбільш економічним та ефективним методом контролю патогенних мікроорганізмів в даний час, але надмірне використання хімічних речовин серйозно порушить ризосферні мікроорганізми, зробить екологічну систему навколишнього середовища більш крихкою і призведе до втрати сільськогосподарського біорізноманіття, що призведе до забруднення навколишнього середовища, поставить під загрозу здоров'я людей і тварин, а також

спричинить проблеми резистентності патогенів, залишкові кількості пестицидів і відродження шкідливих організмів. Тому пошук нових ефективних біологічних пестицидів для заміни хімічних пестицидів став актуальним напрямком досліджень у цій галузі. Певною мірою взаємовідносини між ризосферними мікроорганізмами визначають, чи можуть патогенні бактерії успішно вторгтися в рослини.

У кінцевому підсумку взаємодія у ній між бактеріями, мікоризою та кореневими патогенами може у значній мірі визначати формування рослинно-мікробної системи в цілому. Функціональна життєдіяльність мікроорганізмів має вирішальне значення для формування стартових умов, визначення функцій, відповідей учасників біохімічних процесів і т.д. Існують умови, при яких запуск мікробних механізмів, що лежать в основі екосистемних процесів, оказують вирішальну взаємодію, особливо при формуванні різних сценаріїв, при яких зміна мікробного співтовариства має зворотний зв'язок та може безпосередньо контролювати проходження цих процесів [17,16].

### **1.3 Біологічні препарати на основі роду *Bacillus* та *Pseudomonas* для вирощування огірків.**

Розвиток сільськогосподарського виробництва базується на якості продукції, екологічності господарства, використання екологічно безпечних технологій. Для запобігання, пом'якшення чи контролю хвороб рослин використовували мінеральні добрива та пестициди. Сільське господарство зазнало вражаючого покращення продуктивності та якості культур за останні 100 років. Проте недоліком використання пестицидів та хімічних добрив є: забруднене довкілля, стійкість патогенної мікрофлори, небезпека отруєнь, відсутність вибірковості дії, що призвело до розробки нових альтернативних методів для боротьби зі шкідниками і хворобами. Альтернативною системою захисту овочевих культур від хвороб і шкідників в сільському господарстві є використання

біологічних препаратів, застосування яких розраховано на весь період вегетації рослин, на відміну від хімічних засобів захисту [8,16,26].

Висока ефективність біологічних препаратів підтверджується підвищенням врожайності (15-35%), покращення якості сільськогосподарської продукції, продовження термінів зберігання та екологічною безпечністю. Цей метод набув значного поширення в Європі, Америці та більшості інших аграрних країн.

У виробництві мікробіологічних препаратів для біоконтролю фітопатогенів сільськогосподарських рослин використовують різні види мікроорганізмів-антагоністів, однак найчастіше — представників родів *Pseudomonas* і *Bacillus*.

Представники роду *Bacillus* активно заселяють кореневу систему рослин та вступають з нею у сприятливі для обох сторін відносини. Кількість бактеріальних клітин в ризосфері рослини настільки велика, що може в кілька разів перевищувати кількість власних клітин кореня. Багато бактерій роду *Bacillus* створюють настільки густий облік, що шляхи для потенційно шкідливих мікроорганізмів у кореневу зону рослин стають практично недоступними [35,36].

Також всі бактерії роду *Bacillus* синтезують спеціальні слизоподібні речовини — полісахариди, завдяки яким вони міцно прикріплюються до кореня рослини. Фітопатогени практично витісняються з ризосфери, оскільки вони не мають схожих механізмів адаптації, які дозволили їм ефективно конкурувати з корисними мікроорганізмами за доступ до кореневої системи рослин.

Представники роду *Bacillus* вирізняються особливістю — вони здатні виробляти різні речовини з антибіотичною активністю, які виявляють надзвичайно високу ефективність у боротьбі з патогенними мікроорганізмами. Унікальна будова цих речовин робить їх дуже специфічними і ефективними проти різних шкідливих мікроорганізмів, що означає, що вони можуть нейтралізувати не лише окремі види

патогенів, але і різноманітність патогенів, які можуть атакувати сільськогосподарські культури. Бактерії *Bacillus*, завдяки антибіотичній активності, забезпечують ефективний захист рослин від небезпечних мікроорганізмів, що призводить до значного підвищення якості врожаю.

Крім синтезу антибіотиків, *Bacillus* володіють іншими механізмами захисту рослин від патогенних мікроорганізмів. Вони виробляють сполуки, які можуть активувати системну стійкість рослин, тобто природний захист рослин від патогенів. Зазвичай відповідь на надходження чужорідних організмів в рослину

включає утворення специфічних сполук, відомих як елісатори, які запускають

механізми природного захисту. Це призводить до структурних і функціональних змін в органах і тканинах рослини, а також до появи біохімічних метаболітів і білків, які можуть завадити розвитку патогенів або нейтралізувати їх. Бактерії

роду *Bacillus*, які мешкають в прикореневій зоні, продукують речовини, аналогічні за своєю будовою до елісаторів, а отже, постійно стимулюють імунітет рослини [46,45].

Бактерії роду *Bacillus* також володіють корисною властивістю синтезувати фітогормони, які схожі на ті, що продукує сама рослина. Ці речовини, навіть у дуже низьких концентраціях, здатні регулювати різноманітні процеси у

тканинах рослини, особливо впливаючи на її рістові характеристики. Кількість фітогормону, необхідна для активації ростових процесів є мізерною в порівнянні з рослиною, тому навіть тих кількостей, що синтезуються бактеріальними клітинами,

цілком достатньо для того, щоб прискорити ріст та розвиток рослини і досягти кращих показників по масі під час вегетації.

Живлення рослин також залежить від бактерій *Bacillus*. Рослина харчується в основному через корені, всмоктуючи поживні елементи, розчинені у воді. 90% запасів усього фосфору ґрунту знаходиться у вигляді важкорозчинних

сполук, які не можуть споживатися кореневою системою. Деякі види бактерій роду

*Bacillus* мають здатність виробляти ферменти фосфатази, які розкладають важкорозчинні фосфорні сполуки, зроблюючи їх доступними для поглинання рослинами. Тому, при наявності достатньої кількості цих мікроорганізмів в кореневій зоні рослин, можливо відмовитися від застосування фосфорних добрив, оскільки рослини можуть використовувати природні ресурси ґрунту.

Велика кількість видів роду *Bacillus* володіє унікальними характеристиками і давно визнані як ефективні біоагенти для створення мікробних препаратів для сільського господарства. Ці бактерії можуть бути використані як окремі культури, так і для створення складних біопрепаратів. Окрім характерних

для роду *Bacillus* властивостей, деякі представники мають свої унікальні переваги, які варто ретельно розглянути і розглянути окремо.

Один з видів бактерій, а саме *Bacillus amyloliquefaciens*, виявився дуже ефективним у боротьбі з бруєю гниллю томатів, чорною плямистістю салату, і фузаріозами на культурах зернових, зернобобових, овочевих та декоративних рослин.

Наукові дослідження показали, що за умов нестачі фосфору та зменшеної кількості внесення добрив на 25%, використання *Bacillus amyloliquefaciens* дозволяє підвищити врожайність культурних рослин. Також вміст поживних елементів (К, Р, Zn, Fe, Cu, Mn) в зеленій масі рослин значно збільшується завдяки цим бактеріям. Не-

звичайною властивістю цього виду бактерій є їх здатність виробляти фітази – ферменти, які поліпшують поглинання фосфору рослинами, що зумовлює стимулюючий ефект на їх ріст.

Інший вид, *Bacillus megaterium*, захищає рослини від захворювань, таких як чорна плямистість, біла ніжка, м'яка гниль та плямистість листя. Головний механізм їхньої дії полягає в витісненні патогенних видів завдяки більш ефективній колонізації кореневої системи рослин. Крім того, цей вид бактерій сприяє зростанню рослин і підвищує їх живильну цінність.

*Bacillus thuringiensis* використовується для боротьби з більшістю комах-шкідників. Ці бактерії виробляють токсини, відомі як С<sub>т</sub>-білки, які мають інсектицидну дію. Чезля того, як ці токсини потрапляють в кишечник комахи-шкідника, вони спричиняють руйнування клітин кишечника, призводячи до загибелі шкідника. *Bacillus thuringiensis* дуже ефективно обмежує популяції різних комах-шкідників, особливо на стадії личинок, і водночас залишається безпечним для бджіл, теплокровних тварин і людини.

*Bacillus subtilis* здавна застосовується в сільському господарстві проти хвороб картоплі (ризоктоніоз, фітофтороз), квіткових культур (кореневі гнилі, плямистості), капусти білокачанної (чорна ніжка, бактеріоз), томату (кореневі гнилі, фітофтороз, альтернаріоз), плодових ягідних культур, деяких зернових, цукрового буряку, винограду тощо. Крім того, *Bacillus subtilis* активує системи захисту рослин від фітопатогенів та сприяє розвитку кореневої системи. Деякі штами цього виду бактерій також сприяють розчиненню фосфатів у ґрунті та поліпшують живлення рослин (Рис 1.6).



Рис 1.63 Бактерії роду *Bacillus subtilis*.

*Paenibacillus polymyxa* — бактерія, яка була виділена в окремий рід *Paenibacillus* завдяки своїм унікальним корисним властивостям. У сфері сільського господарства *Paenibacillus polymyxa* грає ключову роль як головний виробник

поліміксину – потужного антибіотику, який відзначається значними антибактеріальними та фунгіцидними властивостями. Крім того, ця бактерія виділяє велику кількість слизькоподібних речовин та утворює біоплівку на кореневій системі рослин, що служить захисним бар'єром і запобігає взаємодії фітопатогенів з рослинами.

Активним біопрепаратом проти корневих гнилей, борошнистої роси, фітофторозу, альтернаріозу огірків є фунгіцид Фітоцид, розроблений на основі бактерії *Bacillus subtilis* (Рис 1.7). Препарат відновлює ґрунтову мікрофлору, підвищує рівень вмісту білку та аскорбінової кислоти в плодах на 20-30% та знижує вміст нітратів на 25-40%[8, **Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка!**

**Источник ссылки не найден.]**



Рис 1.7. Біопрепарат Фітоцид на основі бактерій *Bacillus subtilis*

Бактерії роду *Pseudomonas* здавна привертають увагу завдяки їх здатності виробляти широкий спектр різних сидерофорів. Зокрема, варто виділити

флуоресцентні сидерофори-пігменти, що представляють собою особливі сполуки, які, за рідкісними винятками, синтезуються виключно бактеріями цього роду. Ці пігменти характеризуються надзвичайно високою хелатною  $Fe^{3+}$ -іоноздатністю.

Константа зв'язування  $Fe^{3+}$  сидерофорних комплексів у бактерій роду *Pseudomonas* досягає значень  $10^{25}$  при рН 7,0.

Бактерії, які сприяють росту рослин та знижують розмноження фітопатогенних грибів, виробляють сидерофори, які здатні забирати велику частину  $Fe(III)$  з шару ґрунту безпосередньо під коренем рослини, особливо в ризосфері. У той час фітопатогенні гриби також синтезують сидерофори, але їх

афінитет до заліза зазвичай нижчий, ніж сидерофори, які продукують бактерії, що сприяють росту рослин. Це дозволяє останнім здобувати першість в конкурентній боротьбі з фітопатогенними грибами за наявне залізо.

На відміну від фітопатогенних мікроорганізмів, рослини, як правило, не страждають від локального виснаження заліза у ґрунті в результаті поглинання його бактеріями, стимулюючими зростання рослин. Більшість рослин можуть зростати при набагато менших концентраціях заліза, ніж ті, які потрібні мікроорганізмам. Крім того, відомо, що залізо, яке зв'язане з бактеріальними сидерофорами, може бути засвоєне рослинами та використовуватися ними для своїх потреб.

Флуоресцюючі пігменти представників даного роду (піовердини і псевдобактіни) відносяться до сидерофорів змішаного типу, так як зв'язування іонів заліза забезпечується однією катехольною групою хромофора, а також однією гідроксаматною і однією  $\alpha$ -оксикислотною групами, що відносяться до складу пептидної частини молекули сидерофора.

Було досліджено можливість взаємодії піовердину, крім заліза, з іонами інших металів. Результати багатьох експериментів свідчать про те, що даний сидерофор здатний утворювати комплекси з іонами одновалентних ( $Hg^+$ ,  $Cu^+$ ,  $Cs^+$ ), двохвалентних ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ), трьохвалентних

(Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) та шестивалентних (Mo<sup>6+</sup>, W<sup>6+</sup>) металів. Таким чином, було показано можливість використання даної сполуки для індикації та зв'язування названих металів у різних середовищах з метою їх детоксикації. Отримані дані узгоджуються з наявними відомостями про взаємодію флуоресціюючих пігментів інших бактерій роду *Pseudomonas* з металами (Cr<sup>3+</sup> з псевдобактином *Pseudomonas* sp. B1 та Al<sup>3+</sup> з піовердином *P. aeruginosa* PA01) [1, 5, 43].

При цьому було зазначено, що при використанні піовердина у відповідних цілях можливо застосування не тільки очищеного препарату, а й культуральної рідини після осадження клітин, що дозволяє здешевити, полегшити та прискорити процес очищення різних екологічних систем від іонів металів (в тому числі й від важких).

Важлива роль сидерофорів полягає в антагоністичних взаємовідносинах ризосферних псевдомонад з ґрунтовими фітопатогенами та у стимуляції росту рослин. Вона неодноразово доведена при інокуляції рослин штамами, що продукують сидерофори, дефектними за їх синтезом. При цьому відзначено не тільки супресуючу дію сидерофорів на фітопатогени, але й стимулюючу дію на рослини.

На відміну від фітопатогенних мікроорганізмів, рослини, як правило, не страждають від локального виснаження заліза в ґрунті в результаті поглинання його бактеріями, стимулюючими зростання рослин. Більшість рослин можуть рости при значно менших концентраціях заліза, ніж мікроорганізми. Крім того, відомо, що залізо, пов'язане бактеріальними сидерофорами, може асимілюватися рослинами і використовуватися ними для своїх потреб. Таким чином, зв'язування іонів заліза сидерофорами бактерій роду *Pseudomonas* призводить до обмеження зростання фітопатогенів й поліпшенню росту рослин.

Широкомасштабне використання в сільському господарстві біопрепаратів на основі ризосферних бактерій роду *Pseudomonas* стримується відсутністю

стандартних технологій їх виробництва. В даний час ведуться розробки технологій отримання біопрепаратів різного призначення на основі ризосферних псевдомонад. Досліджуються різні способи консервації цих біопрепаратів і поліпшення їх прикріплення до поверхні насіння й коріння рослин з використанням різних клеючих речовин.



Рис 1.8 Бактерії роду *Pseudomonas fluorescens*.

Один із найбільш дієвих бактеріальних препаратів на основі псевдомонад є Планриз. Планриз – біологічний препарат на основі ґрунтових бактерій спеціалізованого штаму *Pseudomonas fluorescens* (Рис 1.8, Рис 1.9). Бактерії *Pseudomonas fluorescens*, потрапляючи у ґрунт разом з обробленим насінням, активно заселяють ризосферу (кореневу систему) рослин і, харчуючись корневими виділеннями, продукують ферменти та антибіотики, які подавляють розвиток корневих гнилей. При обробці вегетуючих рослин мають активність проти дріжджів, грибів, граммпозитивних та грамнегативних бактерій [Ошибка!

**Источник ссылки не найден.]**



Рис 1.9. Біопрепарат Планриз на основі бактерії *Pseudomonas fluorescens*.

Бактерії *Pseudomonas fluorescens* виконують важливу функцію як продуценти необхідних для рослин амінокислот, ніктохромів та вітамінів. Вони утворюють симбіотичні відносини з кореневою системою рослини, сприяючи прискоренню росту та розвитку рослин, а також збільшенню їх біомаси рослин (у тому числі площу поверхні листя), збільшення виходу продукції, подавляють розвиток збудників грибних та бактеріальних хвороб і захищають рослини від зараження при нанесенні на насіння перед посівом, внесенні у ґрунт та при обприскуванні по листовій поверхні [5].

Мають здатність до фіксації атмосферного азоту. В холодних кліматичних умовах у ризосфері рослин азотфіксуючі псевдомонади домінують над представниками інших таксономічних груп азотфіксаторів. Перевага псевдомонад виражається у їх холодостійкості, оскільки оптимальна температура для азотфіксації 14-20°C. У той же час для процесу азотфіксації інших асоціативних

діазотрофів оптимальною є температура 25°C [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Також бактерії *Pseudomonas fluorescens* здатні до ефективного розчинення фосфорних сполук за рахунок гідролізу органічних фосфатів під дією фосфатаз та розчинення мінеральних фосфатів за рахунок продукції кислот. Ці властивості мікроорганізмів можна використовувати для покращення фосфорного живлення рослин, так як із загальної кількості фосфорних сполук, які знаходяться у ґрунті тільки 5% доступні рослинам[1].

Гаупсин - це універсальний препарат широкого спектра дії, призначений для обробки садів, огідників, виноградників, городів, полів, багаторічних культур, а також для захисту кімнатних рослин від грибних хвороб та шкідників. (Рис 1.10) Гаупсин має антимікробні, антифунгіціальні, протівірусні, ентомопатогенні та ростостимулюючі властивості. Біопрепарат не токсичний для людини і тварин, не накопичується у рослинах та ґрунті, не впливає на смак вирощуваної продукції. Гаупсин відмінно зарекомендував себе в тепличних господарствах. Ефективність у боротьбі з грибними хворобами 90-92%, із шкідниками 92-94%. Біопрепарат Гаупсин створено на основі штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111, УКМ В-306, він володіє антифунгальною, антибактеріальною та ентомопатогенною активністю (Рис 1.11). Штами, що є основою Гаупсину, характеризуються значною антагоністичною активністю, зумовленою синтезом антибіотиків-похідних феназину [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден.].



Рис 1.10. Біопрепарат Гаупсин на основі бактерії *P. chlororaphis subsp. aureofaciens*

Один з дієвих біофунгіцидів проти збудників грибкових хвороб – Псевдобактерін-2. Розроблений на основі живих бактерій *P. aureofaciens*, що продукують антибіотики та синтезують ІОК, що стимулює ріст та розвиток рослин. Бактерія продукує пігменти сидерофори, що зв'язують залізо і транспортують його в клітини бактерій. Сидерофори псевдомонад мають різну хімічну структуру і

мають, як правило, високу спорідненість до тривалентного заліза, утворюючи з ним стабільні комплекси. Фітопатогени продукують власні сидерофори, проте на відміну від сидерофорів псевдомонад вони набагато повільніше зв'язуються з іонами заліза, і псевдомонади виграють у конкурентній боротьбі з хворобами за

такий життєво важливий елемент, як залізо. Таким чином, зв'язування заліза сидерофорами псевдомонад призводить до обмеження росту патогенних мікроорганізмів та поліпшення росту рослин. «Псевдобактерін 2» володіє високою гіперпаразитичною активністю проти широкого спектру збудників хвороб рослин

(*Fusarium, Helminthosporium, Pseudocercospora, Pythium, Erysiphe, Septoria, Pyrenophora, Puccinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Rhizoctonia, Cladosporium, Erysiphe, Cercospora*). Препарат забезпечує активний захист та профілактику від грибкових та бактеріальних хвороб, стимулює ріст рослин, покращує фосфорне живлення культури, укріплює імунний статус культури, підвищує врожайність та його якість. Активізує мікробіологічну діяльність ґрунтової мікрофлори. Володіє ефектом стимуляції росту [4, 7, 10,

43].  
 Ошибка! Источник ссылки не найден. Ошибка! Источник ссылки не найден.,

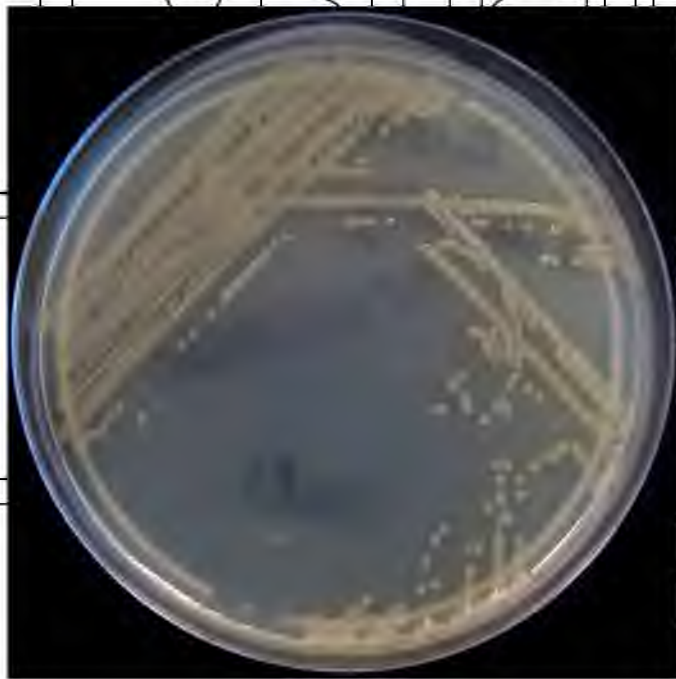


Рис 1.11 Бактерії роду *P. aureofaciens*.

На ефективність біопрепаратів впливають наступні фактори: опади, вітер, температура, сонячне освітлення, антимікробна реакція рослин та низька якість обробки. Останній чинник має найбільше практичне значення, тому при використанні біопрепаратів треба дотримуватися строків застосування препарату, а також норм витратів препарату, що забезпечує оптимальну кількість діючої речовини в робочій рідині [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Застосування біопрепаратів в сільському господарстві – це безпека для людей, тварин та навколишнього середовища. Засоби, що містять біологічно активні компоненти не спроможні викликати стійкість у патогенних мікроорганізмів та вірусів або звикання у шкідників. Завдяки цій властивості стає можливим їх використання протягом кількох років, без збільшення норм витрат. Компоненти біопрепаратів не нагромаджуються в тканинах рослин та не спричиняють вплив на органолептичні показники продукції. Більшість біопрепаратів сприяють підвищенню стійкості рослин до несприятливих умов

навколишнього середовища та збільшенню врожаю **[Ошибка! Источник ссылки не найден, Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Екологічна безпеність біопрепаратів зразкова, адже застосування мікроорганізмів, які виділені з об'єктів довкілля, є частиною кругообігу речовин у природі. Використання біологічних препаратів для захисту рослин також є

безпечним тому, що кількість мікроорганізмів саморегулюється, знижується, зменшується чисельність популяції фітофагів чи збудників хвороб та природних мікроорганізмів. Виробництво біопрепаратів полягає у культивуванні в штучних

умовах виділених із навколишнього середовища найбільш високоактивних мікроорганізмів та створення умов для їхньої життєдіяльності **[Ошибка! Источник ссылки не найден.]**.

Загальною перевагою біопрепаратів є те, що вони не накопичуються в овочах та фруктах. Це дає змогу отримувати чисту, придатну продукцію. У

сільськогосподарському виробництві заміна синтетичних пестицидів біологічними дасть можливість знизити забруднення ґрунтів залишками хімічних пестицидів, призупинити зростання резистентності іншідників до засобів захисту рослин, відновити і підвищити якість ґрунтів, збільшити продуктивність

сільськогосподарської продукції і підвищити якість її зберігання.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.

### 2.1 Місце та умови проведення дослідів.

Дослідження були виконані протягом 2022-2023 рр. у лабораторії мікробіологічного методу захисту рослин Інституту захисту рослин НААН.

Лабораторія займається виділенням та селекцією існуючих колекційних та нових мікроорганізмів, досліджує їх властивості і застосовує для створення нових біологічних препаратів з широким спектром дії проти шкідників і хвороб. Також до основних напрямів роботи наукової установи відноситься розробка глибокої, поверхневої і глибоко-поверхневої технологій виробництва мікробіопрепаратів та розробка технологій захисту сільськогосподарських культур від шкідливих організмів за застосування біологічних препаратів.

Лабораторія складається з наступних приміщень: кімната для мікроскопічних робіт, стерилізаційна, мийна, препаратозна кімната та термостатійна кімната і відносяться II-III груп небезпеки. Усі приміщення добре освітлені, оснащені вентиляцією, мають підведення газу а також гарячу та холодну воду.

Роботи з мікроорганізмами проводять у спеціальному ізольованому приміщенні (боксі) площею 3 – 5 м<sup>2</sup>. У боксі присутні металевий стіл, стільці, газові пальники, засоби для дезінфекції рук, маркер, бактерицидна лампа.

Автоклави для стерилізації поживних середовищ, інструментів та сушильні шафи, що використовуються для стерилізації скляного посуду, знезараження вдрацьованого інфікованого матеріалу знаходяться в спеціально оснащеному стерилізаційному приміщенні.

В термостатійній кімнаті розташовуються стелажі для розміщення засіяних колб та пробірок і ротаційні качалки, що містяться на спеціальних фундаментах.

Препараторську кімнату обладнана робочим столом, шафою для інструментів, центрифугою, холодильником для зберігання колекцій чистих культур, та термостат.

Лабораторія укомплектована приладами і обладнанням необхідним для роботи з різними групами мікрорганізмів та для проведення дослідів і виконання аналізів різних матеріалів.

## 2.2 Приготування та стерилізація поживних середовищ.

Поживні середовища є основою роботи в мікробіологічній лабораторії і їх якість визначає результати досліджень. Поживні середовища повинні створювати оптимальні умови для розмноження та розвитку мікроорганізмів. Основними компонентами поживних середовища для культивування мікроорганізмів є вуглець і азотвмісні сполуки. І саме ці сполуки визначають специфічність переважної більшості поживних середовищ [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Бажано, щоб середовища були прозорими – зручніше стежити за зростанням культур, легше помітити забруднення середовища сторонніми мікроорганізмами.

Для культивування мікроорганізмів у лабораторних умовах використовують поживні середовища, які повинні відповідати трофічним потребам мікроорганізмів. Бактеріологічні поживні середовища — рідкі, напіврідкі і тверді субстрати, що використовують для культивування мікроорганізмів у лабораторних і виробничих умовах. Поживні середовища призначені для підрахунку кількості життєздатних клітин, виділення чистих культур бактерій, вивчення їхніх фізіологічних властивостей, накопичення мікробної біомаси, зберігання мікроорганізмів тощо.

Основні вимоги до поживних середовищ — це наявність речовин (вода, неорганічні солі (інколи органічні сполуки), джерела азоту і вуглецю, а за необхідності і фактори росту) у доступній для мікроорганізмів формі, які

забезпечують їхній ріст і розмноження, оптимальні значення вологості, в'язкості, рН та стерильність.

Для обліку загальної кількості ґрунтових мікроорганізмів, які використовують переважно органічні сполуки азоту (амоніфікаторів), готують середовища на м'ясному бульйоні. Готують його таким чином: 0,5 кг подрібненого

(через м'ясорубку) м'яса яловичини без кісток, жиру та сухожиль заливають в емальованій каструлі 1 дм<sup>3</sup> підігрітої до 50°C водогіпної води. Залишають м'ясо настоятися протягом 12 год за кімнатної температури або протягом 1 год за температури 50—55°C. Потім м'ясо віджимають і м'ясний бульйон проціджують

через марлю із шаром вати, кип'ятять протягом 30 хв. Бульйон фільтрують спочатку через марлю з ватою, а потім через паперовий фільтр. Фільтрат доводять водою до первинного об'єму (1 дм<sup>3</sup>), розливають у колби, закривають їх ватними пробками і паперовими ковпачками. Стерилізують за температури 120°C протягом 20 хв.

М'ясний бульйон використовують як основу для готування відповідних середовищ.

Рекомендовано також застосування середовищ, приготовлених із рибного бульйону з використанням філе судака або іншої риби. Підготовку проводять аналогічно приготуванню м'ясної води і відповідних середовищ з її використанням (РПБ і РПА).

Найпоширеніше та найуніверсальніше середовище для нагромадження мікроорганізмів, дослідження їх фізіологічних і біохімічних властивостей і визначення виду, а також для виділення чистих культур є м'ясо-пептонний агар (МПА). Використовується для культивування та вивчення культуральних

властивостей різних штамів мікроорганізмів. Для приготування МПА до 1 дм<sup>3</sup> м'ясного бульйону додають 5—10 г пептону, 5 г натрію хлориду та 15–20 г агар-агару. Середовище нагрівають до розчинення пептону та агару, постійно помішуючи. Встановлюють нейтральну або слаболужну реакцію середовища, застосовуючи 20 %-й розчин Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Після встановлення реакції середовища його

кип'ятять протягом 5-10 хв. Білки, що згорнулися від зміни реакції, фільтрують через паперовий фільтр. Для освітлення бульйону свіжий яєчний білок збивають із рівною за об'ємом кількістю води і змішують з охолодженим до 50°C бульйоном.

Суміш кип'ятять, помішуючи на слабкому вогні протягом 10 хв, потім фільтрують.

Прозорий м'ясо-пептонний бульйон розливають у пробірки, закривають ватними пробками і стерилізують за температури 120°C протягом 20 хв.

Загальну кількість мікроорганізмів, здатних використовувати переважно мінеральні форми азоту і актиноміцетів, виявляють на крохмально-аміачному агарі

(КАА), г / дм<sup>3</sup>:

• Крохмаль розчинний - 10,0;

•  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2,0;

•  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1,0;

•  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 1,0;

•  $\text{NaCl}$  — 1,0;

•  $\text{CaCO}_3$  — 3,0;

• агар-агар — 20,0.

Крохмаль розчиняють у невеликій кількості води та додають до нагрітого

до кипіння розчину солей, вносять агар. Стерилізують за температури 120°C протягом 20 хв.

Оліготрофні мікроорганізми вирощують на голодному агарі. До 1 дм<sup>3</sup> водогінної води додають 2 % агару і стерилізують за температури 120°C протягом

20 хв.

Азотобактер та бактерії, що здатні рости за низьких концентрацій азоту, обліковують переважно на середовищі Ешбі, г/дм<sup>3</sup>.

• глюкоза (маніт) — 20,0;

•  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,2;

•  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;

НУБІП України

- NaCl - 0,2;
- K<sub>2</sub>S<sub>04</sub> - 0,1;
- CaCO<sub>3</sub> - 5,0;
- агар-агар — 20,0.

Стерилізують за температури 120°C протягом 20 хв.

НУБІП України

Для культивування азотобактера рекомендовано також середовище Федорова, г/дм<sup>3</sup>:

- глюкоза — 20,0;
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,3;

НУБІП України

- CaHPO<sub>4</sub> - 0,2;
- MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O - 0,3;
- NaCl - 0,5;

- FeCl<sub>3</sub> - 0,01 ;

НУБІП України

- CaCO<sub>3</sub> — 5,0;
- суміш мікроелементів за Федоровим — 1 см<sup>3</sup>;
- агар-агар — 20,0.

Стерилізують за температури 120°C протягом 20 хв.

НУБІП України

Целюлозоруйнівні мікроорганізми культивують на середовищі Виноградського, г/дм<sup>3</sup>:

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,0;
- MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O — 0,5;
- NaCl - 0,5;

НУБІП України

- FeSO<sub>4</sub> - 0,01;
- MnSO<sub>4</sub> - 0,01;
- KN<sub>03</sub> - 4,0;

- CaCO<sub>3</sub> - 5,0.

НУБІП України

Додаванням 10 %  $K_2CO_3$  рН середовища доводять до 7,2. Стерилізують за температури  $115^\circ C$  протягом 20 хв.

Для визначення загальної кількості ґрунтових мікроорганізмів використовують ґрунтовий агар. Готують його наступним чином. Повітряно-сухий ґрунт очищають від рослинних решток та інших включень, подрібнюють у фарфоровій ступці і просівають через сито з діаметром отворів у 1 мм. Подрібнений ґрунт помішають у колбу і заливають дистильованою водою (відношення ґрунт : вода повинно становити 1 : 5 або 1 : 9). До отриманої суспензії додають 1,5—2 %

агару. Стерилізують в автоклаві за температури  $120^\circ C$  протягом 1 год. Іноді стерилізацію повторюють через 1—2 доби. Після ретельного перемішування середовище разом з ґрунтовими частками розливають у чашки Петрі. Посів проводять поверхневим методом. Для приготування середовища використовують родючі ґрунти (ґрунт парників, садовий ґрунт, торф, чорнозем і ін.). Іноді для виділення мікроорганізмів із певного ґрунту поживне середовище роблять з цього самого ґрунту.

Для приготування середовища КГА необхідно помиту та очищену картоплю подрібнити, залити 1 л проточної води та прокип'ятити 15 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, довести об'єм водогінною водою до початкового рівня. Відібрати наважки Na та агар-агару на аналітичних вагах та додати їх до розчину. Нагріти середовище, постійно перемішувати до повного розчинення агар-агару. Кип'ятити поживне середовище слід не більше двох хвилин.

Установити значення рН на рівні 7,0 за допомогою рН-метра. Слід враховувати, що при стерилізації рН знизиться на 0,2. За необхідності ще раз профільтрувати середовище. Розлити поживне середовище не більше ніж на  $3/4$  смності та простерилізувати в автоклаві при  $121^\circ C$  при 1 атм протягом 30 хвилин.

Для контролю стерильності середовища ставлять в термостат на 2 доби, після чого переглядають.

Середовище Кінг Б (Псевдомонадний агар F) використовується для виявлення та диференціації *Pseudomonas aureofaciens* від інших псевдомонад на підставі продукування флуоресцеїну (піовердину) та інгібування піоціаніну.

Склад середовища Кінг Б:

1. Пептонова суміш - 20 г.
2. Агар-агар – 1,5 г.
3.  $K_2HPO_4$  – 1,5 г.
4. Сульфат магнію – 14 г.

Для приготування стерильного середовища Кінг Б в 1 л дистильованої води розвести пептонову суміш, сульфат магнію, агар та  $K_2HPO_4$ . Додати 10 мл гліцерину, ретельно перемішати, нагріти при постійному перемішуванні і кип'ятити протягом хвилини до повного розчинення. Розлити в емкості і стерилізувати протягом 15 хвилин в автоклаві при 121 °С при 1 атм. Готове поживне середовище має янтарний колір та повинна зберігатися при температурі 8-15 °С.

Пептонова суміш є джерелом поживних речовин, необхідних для зростання мікроорганізмів: азоту, вітамінів, мінеральних солей та амінокислот. Вона також сприяє синтезу піовердину.  $K_2HPO_4$  – джерело фосфору, а сульфат магнію є джерелом катіонів для активації синтезу піовердину. Гліцерин – джерело вуглецю.

Середовище сприяє синтезу флуоресцеїну (піовердину) – зелено-жовтого флуоресцентного пігменту, який окислюється, набуваючи жовтого кольору. Він розчинний у воді і, на відміну від піоціаніну (синьо-зеленого пігменту), не розчинний у хлороформі. Пігмент дифундує в середовищі, забарвлюючи її у флуоресцентний жовто-зелений колір.

Вибір методу стерилізації поживного середовища залежить від їх складу. Найбільш надійний метод термічної стерилізації є стерилізація паром під тиском у автоклаві. Але для різних середовищ необхідно використовувати відповідні режими

стерилізації. Середовища, які містять речовини що не витримують високих температур, слід стерилізувати при 0,5 атм. Середовища із желатином, а також молеку, дріжджовий автолізат та дріжджову воду необхідно стерилізувати при 0,5 атм протягом 15 хвилин. Також слід враховувати значення рН при виборі режима стерилізації. Наявність кислої реакції в середовищі при стерилізації може гідролізувати деякі полімери, що входять до складу субстрату. За умови, що рН в середовищі нижче 6,0, може відбутися пептонізація агару чи желатину і середовище не застигне.

Для стерилізації середовищ, що не витримують нагрівання вище 100 °С використовується метод стерилізації – тиндалізація. Для компонентів середовища, для яких температура 100 °С висока використовують метод дробної пастеризації. У разі, коли використовувати термічні методи не можливо, застосовують стерилізацію фільтруванням або методи фізичної стерилізації.

### 2.3 Методи проведення досліджень.

Дослідження починали проводити з відбору проб ґрунту у 4-5 точках вибраної ділянки на глибині 10-15 м. Лопатою викопують ямки глибиною 20 см. Для взяття проби ґрунту, верхній шар якого обрізають нагрітим ножом, використовують стерильну банку. Збирають близько 200-300 г ґрунту з кожної точки, об'єднують їх і відокремлюють 30 г сухого ґрунту, який додають у колбу, що містить 300 см<sup>3</sup> стерильної води. Цю суміш добре збовтують протягом 10 хвилин і залишають протягом 2-3 хвилин, щоб крупні частинки осіли. Якщо необхідно взяти пробу з глибоких шарів ґрунту, то використовують спеціальний земляний бур Некрасова, який дозволяє відбирати проби на певній глибині. З отриманої суспензії готують різні серійні розведення, починаючи від 10<sup>-1</sup> із можливістю подальшого розведення до 10<sup>-6</sup> і більше (Рис 2.1).

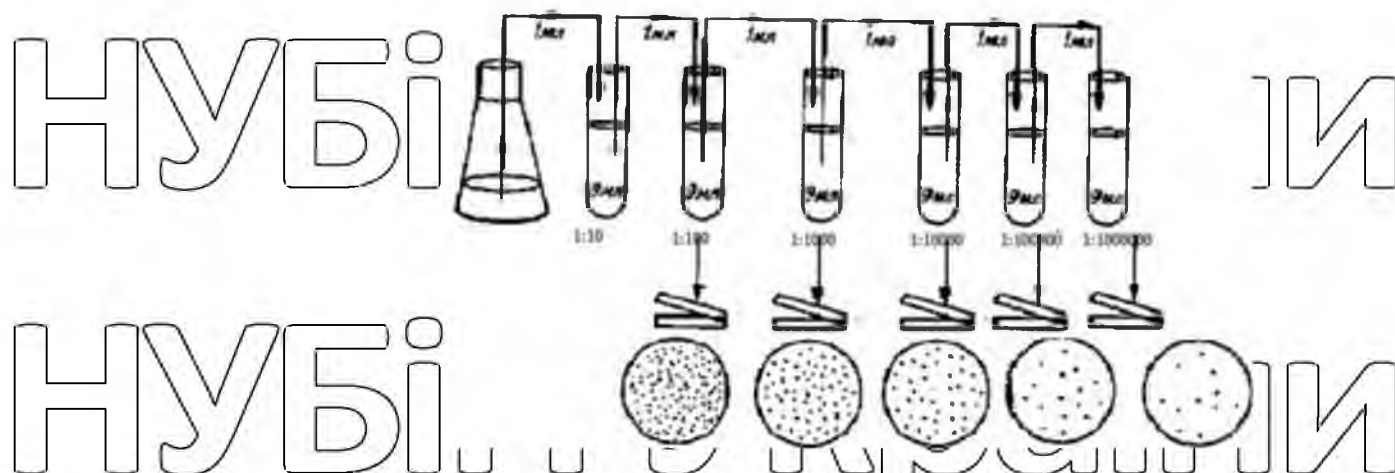


Рис 2.1 Метод серійних розведень.

Посів на поживні середовища проводять поверхневим або глибинним методом. Поверхневий спосіб використовують для виділення чистої культури бактерій. В досліді використовувалася глибинний посів, який застосовується для обліку бактерій, грибів та актиноміцетів. По 1 см<sup>3</sup> із останніх двох розведень вносять на дно двох стерильних чашок Петрі й заливають 15 см<sup>3</sup> розтопленого й охолодженого до 45 °С МПА, круговими рухами змішують суспензію з середовищем. Після застигання середовища чашки інкубують в термостаті 48 год при 28-30 °С та візуально підраховують колонії.

Для більш повного виявлення видового складу ґрунтових мікроорганізмів слід застосовували декілька різних агаризованих поживних середовищ (середовище Чапєка, Звягєнєва, КГА, МПА, сусло-агар, КАА), в тому числі і середовища, що передбачають ізолювання певних екологічних груп бактерій та грибів. Засіяні водно-ґрунтовою суспензією чашки Петрі періодично переглядали, починаючи з третьої доби, і окремі колонії грибів в разі їх інтенсивного розростання відсівали в пробірки на щільне живильне середовище. Остаточний облік проводили через 10-15 діб. При цьому підраховували загальну кількість колоній, що виростили.

На поживному середовищі в чашці Петрі виростають колонії ґрунтових мікроорганізмів. Колонія – це видиме неозброєним оком скупчення мікробних клітин.

Колонії бактерій підраховували через 2 - 4 доби, грибів – через 2-7, а актиноміцетів – через 7-15 днів інкубації в термостаті не відкриваючи чашок Петрі. При підрахунку вибирали те розведення, де кількість колоній не перевищувала 50-150. Щоб було зручніше позначали пораховану кількість колоній крапкою, використовуючи маркер або олівець. Колонії підраховували наступними способами: якщо колонії ізольовані один від одного, великі та в малій кількості, то в основному їх рахують по всій площі чашки. Якщо розвинулась велика кількість колоній бактерій, то дно чашки ділять на сегменти, підраховують в двох або трьох сегментах, аотім знаходять середнє арифметичне в одному сегменті та множать на кількість сегментів.)

Найбільш типові колонії відсівали у пробірки зі скошеним агаром для одержання чистої культури мікроорганізмів і зберігали для подальших досліджень. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили шляхом мікроскопічного аналізу.

На чистих культурах бактерій вивчали культуральні властивості(характер зростання бактерій на щільному поживному середовищі). Були вибрані найбільш типові колонії та, не відкриваючи чашок Петрі, описані зовнішні властивості бактерій(форма, забарвлення, поверхня, діаметр колонії, структура та консистенція) (Рис 2.2).

Після підрахунку колоній на поверхні чашок Петрі по усіх повтореннях визначають, їх середню кількість.

Чисельність мікроорганізмів у 1г сухого ґрунту обчислюють за формулою:

$$N = \frac{a \cdot 10^n}{m \cdot (1 - \omega)},$$

де N – кількість клітин мікроорганізмів у 1г абсолютно сухого ґрунту, од;  
a – середня кількість колоній, що вирости на чашці, од;  
 $10^n$  – коефіцієнт n-го розведення; m – маса ґрунту у першому розведенні, г;  $\omega$  – масова частка вологи у досліджуваній пробі, %.

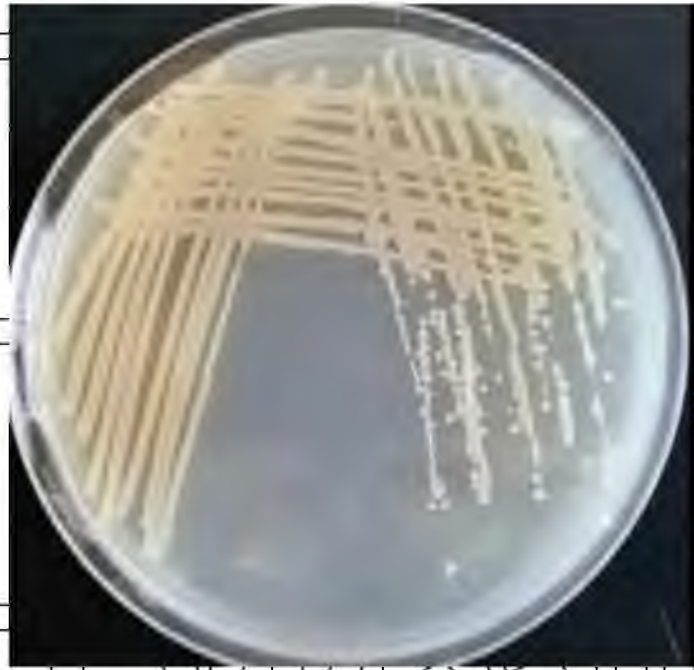


Рис. 2.2 Чиста культура штаму бактерій *P. chlororaphis subsp. aureofaciens*.

Наступним етапом проведення дослідів було визначення антагоністичної активності бактерій. Антагоністична активність – характеристика середовища бактерій, яка дає перевагу в середовищах, що підтримують ріст бактеріальної та грибної флори.

Для визначення антагоністичної активності бактерій *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, *P. fluorescens* та *Bacillus subtilis* використовували метод агарових боків. Цей метод передбачає використання різних поживних середовищ для культивування бактерій та тест-організмів. У якості тест-культур використовували збудники хвороб огірків: *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*. Спочатку суспензію досліджуваного організму рівномірно висівають у чашки Петрі на поверхню агарової пластинки і інкубують у термостаті при 28°C.

Чашки інкубують до появи на поверхні середовища щільного росту колоній. При культивуванні бактерій для цього необхідно 2 доби, мікроміцетів — 4–5, актиноміцетів — 8–10 діб. Після того як отримують чашки Петрі зі щільним

ростом колоній на агарі, проводять наступний етап роботи: у чашки Петрі зі свіжим агаризованим середовищем поверхнево висівають тестовий мікроорганізм на КТ А.

Потім у стерильних умовах за допомогою стерильної металевої трубки із загостреними краями (або пробковим свердлом) із чашок Петрі, де отримано щільний ріст колоній досліджуваного штаму, вирізають диски діаметром 10 мм (після виїмання кожного диска металеву трубку стерилізують у подум'ї). Одразу ж вирізані агарові диски з досліджуваним мікроорганізмом стерильним пінцетом переносять на поверхню пластинки з посівом тест-організму. Цей метод підходить для оцінки продукції агентом біоконтролю вторинних метаболітів, що володіють антифунгальними властивостями.

Рівень антагоністичної активності штама бактерій визначали по зонах затримки росту тест-культур фітопатогенних грибів. Якщо зона затримки росту сягає 5-9 мм – слабкий рівень антагонізму, 10-19 мм – середній рівень, від 20 мм і більше – високий. У випадку, якщо зона затримки росту 0-4 мм – культура бактерій-антагоністів неактивна.

Для проведення модельних експериментів як об'єкт дослідження було використане насіння огірка гібриду «Настуня F1» [Ошибка! Источник ссылки не найден., Ошибка! Источник ссылки не найден., 16]. Перед висадкою в ґрунт насіння замочували у 10,0% розчинах препаратів протягом 60 хвилин. Культури бактерій *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* були попередньо напрацьовані. Насіння, що відведені для варіанту контролю, були замочені у воді.

Схема досліду включала наступні варіанти (Таблиця 2.1):

# НУБІП України

Таблиця 2.1  
Таблиця дослідження ефективності біопрепаратів (обробка насіння) щодо мікозів огірків

№ з/п	Варіанти	Титр біопрепарату	Норма витрати л/т
1.	Контроль (без фітопатогенів)	вода	20,0
2.	Контроль (з фітопатогенами)	вода	20,0
3.	Гаупсин ( <i>P. chlororaphis subsp. aureofaciens</i> )	$1,0 \times 10^9$ КУО/мл	4,0
4.	Планриз ( <i>P. fluorescens</i> )	$5,0 \times 10^9$ КУО/мл	4,0
5.	Фітоцид ( <i>Bacillus subtilis</i> )	$1,0 \times 10^9$ КУО/мл	10,0

Посів насіння відбувався того ж дня, висаджували в горшки з ґрунтом 10x10. Через 3 тижні проводили дослідження стосовно морфологічних показників росту та розвитку рослин. Дію біопрепарату визначали за кількістю рослин уражених корневими гнилями, фузаріозним в'яненням та альтернаріозом.

Облік хвороб рослин проводили за методиками В.П.Омелюти, А.К. Ахатова та О.Л. Озерцовської [37, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**] Ступінь ураженості кореневої системи огірка корневими гнилями проводилися за шкалою (

# НУБІП України

# НУБІП України

НУБІП України

Таблиця 2.2):

НУБІП України

НУБІП України

Таблиця 2.2

**Шкала ураження огірка збудником корневих гнилей**

Бал	Ступінь враження рослини
0	Немає ознак ураження хворобою.
1	Незначне побуріння центрального кореня, окремі плями.
2	Центральний та бічні корені побуріли.
3	Повне ураження центрального кореня. Бічні корені зазнають значного ураження.
4	Рослина гине.

Ступінь ураженості листя рослини фузаріозним в'яненням моніторять за

наступною шкалою (Таблиця 2.3):

Таблиця 2.3

**Шкала ураження рослин збудником фузаріозним в'яненням**

Бал	Ступінь ураження рослини
0	Ознаки ураження рослини відсутні.
1	Незначне в'янення та пожовтіння листкової пластинки.

НУБІП України

2	Четверть листків рослини вражається хворобою.
3	Половина всіх листків рослини жовтіють, в'януть та відсихають.
4	Значний рівень фузаріозного в'янення.
5	Рослина зазнає критичного ступеню ураження(листки повністю засохли).

Облік ураженості рослин альтернаріозом була проведена за візуальною

методикою В.П. Омелюти. Облік ефективності заходів захисту рослин від хвороб

розраховували за формулою:

$$B = (P_k - P_o) * 100 / P_k, \text{ де:}$$

B – ефективність, %.

$P_k$  – показник розвитку захворювання на контролі.

$P_o$  – показник розвитку захворювання на обробленому варіанті.

Статистичну обробку одержаних експериментальних даних проводили методом дисперсійного та кореляційного аналізу за методикою Доспехова Б.О.

(1986) і комп'ютерної програми Microsoft Office Excel.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РОБОТИ.

### 3.1 Динаміка розвитку ризосферних мікроорганізмів за вирощування огірків в закритому ґрунті.

Будь-який тепличний субстрат не залежно від його природи це середовище для існування рослин, однак рослина, як біологічний суб'єкт не може рости і розвиватися відокремлено від мікроорганізмів фітосфери, ризосфери і ризоплану – такі взаємодії є прикладом позитивного симбіозу. Варто зазначити, що специфічні умови закритого ґрунту можуть призвести до втрати екологічної рівноваги за рахунок неконтрольованого розвитку сапротрофних організмів, які можуть переходити у паразитарні форми існування (гриби родів *Fusarium*, *Alternaria*) і призводити до захворювання рослин.

Внесення біологічних препаратів на основі живих біологічних агентів є ефективним заходом кореляції між мікробними процесами, ростом і розвитком рослин. Мікроорганізми субстрату виконують декілька важливих завдань, а саме завдяки процесам мікробного синтезу і біологічної трансформації органічних і неорганічних речовин [29], допомагають краще засвоювати мінеральні добрива, які додаються до системи живлення тепличних рослин.

Після обробки рослин (по вегетативі) біологічними препаратами Планризом, Гаупсином та Фітоцид відзначено збільшення в середньому загальної чисельності мікроорганізмів в 1,5-3,2 рази порівняно з контролем, підвищення на порядок кількості актиноміцетів, міцеллярних грибів і бактерій.

Таблиця 3.1

## Вплив біопрепаратів на чисельність основних фізіологічних груп ґрунтової мікрофлори.

Основні фізіологічні групи мікроорганізмів	Кількість мікроорганізмів, КУО/ г ґрунту за застосування біопрепаратів			
	Контроль	Гаунсин	Планриз	Фітоцид
Мікроміцети, $\times 10^4$	15,4 $\pm$ 0,65	4,1 $\pm$ 0,11	39,5 $\pm$ 3,24	33,7 $\pm$ 2,14
Актиноміцети, $\times 10^5$	6,9 $\pm$ 0,12	8,8 $\pm$ 0,17	13,9 $\pm$ 0,15	10,5 $\pm$ 0,07
Бактерії, $\times 10^6$	15,7 $\pm$ 0,37	18,6 $\pm$ 0,45	20,2 $\pm$ 1,56	19,8 $\pm$ 0,27
Амоніфікуючі бактерії, $\times 10^6$	16,2 $\pm$ 0,15	27,3 $\pm$ 1,11	38,6 $\pm$ 1,24	35,4 $\pm$ 1,12
Педотрофи, $\times 10^6$	11,0 $\pm$ 0,31	15,7 $\pm$ 1,35	18,8 $\pm$ 1,17	16,6 $\pm$ 1,12
Оліготрофи, $\times 10^6$	7,3 $\pm$ 0,04	10,0 $\pm$ 1,11	14,0 $\pm$ 2,11	12,1 $\pm$ 0,53
Азотфіксувальні, $\times 10^6$	12,8 $\pm$ 1,15	16,4 $\pm$ 1,21	17,1 $\pm$ 1,05	19,0 $\pm$ 2,11
Целюлозоруйнуючі, $\times 10^4$	7,3 $\pm$ 0,12	11,1 $\pm$ 1,10	14,6 $\pm$ 1,02	10,5 $\pm$ 0,11
Амілолітичні, $\times 10^6$	12,5 $\pm$ 0,21	19,5 $\pm$ 0,31	18,6 $\pm$ 0,22	18,7 $\pm$ 0,41
Фосфатмобілізувальні, $\times 10^6$	3,8 $\pm$ 0,24	5,6 $\pm$ 0,12	6,4 $\pm$ 0,11	6,8 $\pm$ 0,70
Гуматрозкладаючі, $\times 10^6$	4,1 $\pm$ 0,11	11,9 $\pm$ 0,17	12,6 $\pm$ 0,33	11,5 $\pm$ 0,13

Слід зазначити, що загальна кількість мікроорганізмів підвищилася в

зв'язку з присутністю рослин в субстраті, так як переважна більшість бактерій

існують на поверхні коренів, що виділяють у середовища речовини, що є продуктами життєдіяльності рослин, які є привабливими для мікробіоти ґрунту, тому за рахунок хемотаксису бактерії і найпростіші рухаються в прикореневу зону ґрунтового субстрату.

Про це свідчать результати мікробіологічних досліджень структури мікробного ценозу тепличного субстрату, під час вегетації загальна чисельність бактерій збільшилась від  $15,7 \cdot 10^6$  у контролі до  $18,6-20,2 \cdot 10^6$  КУО/г у дослідних варіантах, а мікроміцетів від  $15,4 \cdot 10^4$  до  $39,5 \cdot 10^4$  КУО/г ґрунту (табл. 3.1).

За використання біологічних препаратів виявлено та описано близько 20 морфотипів мікроорганізмів з груп актиноміцети, міцелярні гриби та бактерії. З бактеріальної групи спостерігали збільшення кількості педотрофних бактерій та азотфіксаторів.

При внесенні біологічного препарату Гаупсин, кількість амілолітичних мікроорганізмів у субстраті була найбільшою і становила  $19,5 \cdot 10^6$  КУО/г, тоді як у варіанті з Фітоцидом колоніє утворюючих одиниць азотфіксувальних бактерій було  $19,0 \cdot 10^6$  КУО/г, однак ці показники були вище, ніж аналогічні у контролі –  $12,8 \cdot 10^6$  КУО/г.

При використанні в обробці рослин огірків пестицидами кількість виявлених бактерій у субстраті становила лише 11 морфотипів, тоді як у варіантах з біопрепаратами їх було близько 20. Збіднення мікрофлори ґрунту призводить до зміни його якісного складу і фітотоксичності ґрунтового субстрату на рослину.

Саме тому застосування біологічних препаратів на основі живих мікробіологічних агентів, які заповнюють екологічні пустоти, спричинені інтенсивними методами тепличного овочівництва (штучним прогріюванням, стерилізацією, надмірним застосуванням добрив і регуляторів росту).

За результатами досліджень структури ґрунтового мікробіоценозу, відмічено збільшення кількості гуматруйнівних мікроорганізмів, при застосуванні біологічного препарату Планриз їх кількість становила  $12,6 \cdot 10^6$  КУО/г, тоді як показники у контрольному варіанті становили лише  $4,1 \cdot 10^6$  КУО/г. Наявність гуматорозкладаючих організмів свідчить про оптимізацію трофічних умов для мікрофлори.

Крім того, відмічали пряму залежність зменшення інфекційного навантаження (а саме кількості представників родів *Fusarium* та *Alternaria*) у субстраті при вирощуванні огірків, за використання біологічних препаратів Планриз, Фітоцид та Гаупсин. Целюлозолітичну активність ґрунтових мікроорганізмів посилило застосування біопрепарату Планриз, при цьому загальна кількість бактерій збільшилася від  $7,3 \times 10^6$  до  $14,6 \times 10^6$  КУО/г.

### 3.2 Антагоністична активність *Pseudomonas* та *Bacillus* щодо фітопатогенних грибів.

Найбільш шкодочинними ґрунтовими фітопатогенами є гриби родів *Rhizoctonia* і *Fusarium*, які викликають захворювання огірка. Різні види грибів роду *Fusarium* суттєво відрізняються за чутливістю щодо впливу бацил-антагоністів [21, 22]. Найчутливішими є *F. culmorum*, *F. solani*, *F. gibbosum*, *F. semitectum*.

Ефективним антагоністом фітопатогенів є штам *Bacillus subtilis*, що знижував поширення кореневої гнилі в 1,8 раза, розвиток захворювання – в 4,7 раза, а також сприяв приросту надземної маси рослин на 55,5 % [40]. Бактерії *Bacillus subtilis* є ефективними проти фітопатогенів *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Ascohyta*. Антагоністичний вплив бактерій роду *Bacillus* на фітопатогенні гриби в першу чергу обумовлений здатністю бацил продукувати різні антибіотики [21, 37]. Встановлена їх здатність синтезувати бацилізин, мікобацилін, поліміксин, сурфактин, ліхенізин, мікосубтилін, ітурин та інші циклічні діопептиди. Антигрибний вплив цих речовин обумовлений їх здатністю порушувати структуру клітинної стінки або спричиняти інші мембранотропні ефекти, що наносять шкоду фітопатогенам. Значна роль у цьому процесі належить здатності бацил продукувати літичні ферменти [1, 21], в тому числі хітиназу та хітозаназу [21].

Антагоністична дія на фітопатогени проявлялася в перші дні активного росту тест - культур і в подальшому практично не змінювалася (табл. 3.2). Так,

найвищою антагоністичною активністю, на третю добу дослідів відносно *Fusarium solani* вирізнявся штам *Bacillus subtilis*, інгібуючи ріст тест-об'єкту на 45 мм, що на 18-20,0% переважав штам *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens* і дослідний штам *P. fluorescens*. Дослідження показало, що штам *P. fluorescens* виявляє антагоністичну активність проти збудника альтернarioзу *Alternaria alternata* була високою, стерильна зона сягала 45 мм (Рис 3. 2), що на 30-50% менше діаметру затримки росту штаму *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens*.

Антагоністичні взаємодії *Bacillus subtilis* стосовно інших тест-культур становили: *Fusarium culmorum* стерильна зона затримки росту 40 мм, *Fusarium oxysporum* – 45 мм.

Дані дослідів показали, що бактерії *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens*, на основі якого створений біопрепарат Гаупсин, проявляють антагоністичну активність щодо всіх тест-культур. Антагоністична дія на фітопатогени проявлялася в перші 2 дні активного росту тест-об'єкту. Таким чином штам *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens* інгібує *Fusarium culmorum* на 25 мм, що свідчить про високу антагоністичну активність (Рис 3. 1 Антагоністична активність *Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens* щодо *Fusarium culmorum*).

Антагоністична активність штаму бактерій *P. fluorescens* проти збудника альтернarioзу *Alternaria alternata* була високою, стерильна зона сягала 45 мм (Рис 3. 2).

# НУБІП України

Таблиця 3.2  
Визначення діаметру затримки росту фітопатогенних організмів

Штамп бактерій	Доба досліджу	Діаметри затримки росту фітопатогенних грибів, мм		
		<i>Fusarium solani</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	4	45±2,5	42±1,6	40±2,5
	7	>50	>50	45±2,5
	11	>50	>50	>50
<i>Pseudomonas chloraphis subsp. aureofaciens</i>	4	34±3,5	24±2,5	25±2,5
	7	>50	>50	45±1,5
	11	>50	>50	>50
<i>P. fluorescens</i>	4	36±2,3	45±2,5	>50
	7	>50	>50	>50
	11	>50	>50	>50



Рис 3. 1 Антагоністична активність *Pseudomonas chloraphis subsp.aureofaciens* щодо *Fusarium culmorum*

НУБІП



їни

НУБІП

їни

Рис 3. 2Антагоністична взаємодія бактерій *P. fluorescens* з грибом

*Alternaria alternata*.

### 3.3 Ефективність біологічних препаратів для контролю захворювань

та підвищення продуктивності культури огірка.

Наразі, основною метою сільськогосподарського виробництва є

отримання якісного врожаю, для цього доцільно проводити аналіз агротехнічних засобів під час вирощування культур овочів.

Згідно отриманих результатів досліджень, мікробні препарати за самостійного застосування ефективно контролювали розвиток хвороб рослини огірка, впливали на розвиток рослини та мікрофлору ґрунту.

На огірку досліджували ефективність дії біопрепаратів Планриз, Гаупсин та Фітоцид проти несправжньої борошнистої роси (псевдопероноспорозу), кореневих гнилей та альтернаріозу. Використання цих мікробних препаратів як

самостійно так і в комплексі показали що розвиток захворювань зменшено на 33%. Розвиток хвороби, збудником якої були фітопатогенні гриби - *Alternaria alternata*, на контрольних зразках без застосування препаратів становив 12,1–74,3%.

Найвищий захисний ефект одержано за сумісного застосування Гаупсину та Фітоциду (табл. 3.4).

НУБІП

України

Ефективність цього комплексу проти кореневих гнилей становила в середньому 62,2 % і була достовірно на 20,0% вищою за ефективність окремо взятого Фітоциду і на 13,6% вищою за ефективність Гаупсину. Комплексне використання біопрепаратів забезпечило одержання швидшого розвитку наземної частини рослини: 79,0%.

Також ефективним виявився комплекс Гаупсину та Планризу проти борошнистої роси, вона становила в середньому 58,3 % і була достовірно на 4,9% вищою за ефективність окремо взятого Планризу і на 13,3% вищою за ефективність Гаупсину. Комплексне використання біопрепаратів забезпечило одержання швидшого розвитку наземної частини рослини: 87,7%.

Метод використання мікробіологічних препаратів в закритому ґрунті показав свою ефективність проти грибних хвороб огірків. Відсоток рослин, що вражалися мікозами, за обробкою препаратами складає – 15%, водночас як у контрольному зразку було уражено 70% рослин.

За даними результатами дослідження, використані біопрепарати стримували розвиток кореневих гнилей, фузаріозного в'янення та альтернаріозу.

Використання мікробіологічних препаратів при захисті рослин знижувало поширення гриби роду *Fusarium oxysporum* в субстраті в 1,4 – 2,0 рази.

За результатами дослідження, застосування Гаупсину, Планризу та Фітоциду сприяло пригніченню патогенних грибів, покращення мінерального живлення, безпосередньо це стосується мобілізації фосфору та амоніфікації та нітрифікації, стимуляція розвитку та росту рослин та покращення мікробіому ґрунту.

Моніторинг за основними фазами росту огірка продемонстрував, що у варіантах із застосуванням Гаупсину та Планризу, огірок зійшов на 2 дні раніше в порівнянні з контролем, також показники росту рослин та розвитку кореневої системи збільшувалися та відрізняються від варіантом «контроль».

Комплексне застосування мікробних препаратів ефективно склало майже 80% ураженості огірків кореневими гнилями. Також загибель огірків в модельному експерименті зменшилась в 4-5 разів порівняно з контролем.

Визначено, що попередня обробка насаджень огірка мікробним препаратом Гаупсином сприяє зменшенню розвитку хвороб у 2,5 рази, в той час як обробка Планризом – у 2,0 рази (Таблиця 3. 3).

Таблиця 3. 3

### Визначення ефективності застосування біопрепаратів Планриз,

#### Гаупсин та Фітоцид щодо корневих гнилей.

Варіант досліджу	Ефективність дії, %			Швидкість проростання, %
	I*	II	III	
Контроль (без фітопатогенів)	-	-	-	40,0
Контроль (з фітопатогенами)	-	-	-	24,3
Гаупсин	76,8	54,3	14,8	67,4
Планриз	87,1	63,8	12,7	74,1
Фітоцид	69,5	47,2	9,9	56,8
Гаупсин + Планриз	88,3	71,6	18,6	87,7
Гаупсин + Фітоцид	91,6	75,4	19,5	79,0
Планриз + Фітоцид	85,2	59,5	16,3	91,3

\*I, II, III – обліки в період вегетації.

Таблиця 3.4

Визначення ефективності застосування біопрепаратів Планриз, Гаупсин та Фітоцид щодо альтернаріозу.

Варіант досліду	Ефективність дії, %			Швидкість проростання, %
	I*	II	III	
Контроль (без фітопатогенів)	-	-	-	40,0
Контроль (з фітопатогенами)	-	-	-	24,3
Гаупсин	77,7	59,4	12,3	67,4
Планриз	88,3	53,7	13,4	74,1
Фітоцид	72,1	33,2	10,1	56,8
Гаупсин + Планриз	79,4	73,0	15,6	87,7
Гаупсин + Фітоцид	92,6	75,4	21,9	79,0
Планриз + Фітоцид	85,2	55,3	15,3	91,3

\*I, II, III – обливи в період вегетації

Таблиця 3.5

Визначення ефективності застосування біопрепаратів Планриз, Гаупсин та Фітоцид щодо борошнистої роси.

Варіант досліджу	Ефективність дії, %			Швидкість проростання, %
	I*	II	III	
Контроль (без фітопатогенів)	-	-	-	40,0
Контроль (з фітопатогенами)	-	-	-	24,3
Гаупсин	66,1	50,3	18,5	67,4
Планриз	71,8	67,8	20,8	74,1
Фітоцид	60,5	45,4	15,8	56,8
Гаупсин + Планриз	85,9	69,7	19,4	87,7
Гаупсин + Фітоцид	89,2	77,1	21,1	79,0
Планриз + Фітоцид	75,5	60,7	17,3	91,3

\*I, II, III – обліки в період вегетації

При використанні для обробки насіння суміші біопрепаратів з різними біологічними агентами, включаються не лише фунгіцидні властивості препаратів, а також і стимулюючі, речовини, які продукують мікробіологічні агенти ризосфери активують механізми хворобостійкості на біохімічному рівні. Окрім того, більшість біологічних препаратів чинять позитивний вплив на енергію проростання та схожість насіння, стимулюють коренеутворення. Біологічні препарати Фітоцид, Планриз та Гаупсин мають багатоцільову дію.

Обробка препаратами антагоністичних і фосфатмобілізувальних бактерій в комплексі та самостійно сприяла контролю захворюваності огірка мікозами та підвищенню їх розвитку, що дає змогу зменшити пестицидне навантаження на

агроценози в середньому на 17-33% і має важливе екологічне та економічне значення.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## ВИСНОВКИ

У дипломній роботі обгрунтовано та досліджено вплив біопрепаратів на основі бактерій родів *Bacillus* та *Pseudomonas* на чисельність ризосферної мікрофлори ґрунту за вирощування огірків в умовах закритого ґрунту, це гарантує отримання якісного врожаю та зниження використання хімічного методу захисту, що в свою чергу перевантажує агросистему.

1. Встановлено, що штами бактерій *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *B. subtilis* характеризуються високою антагоністичністю щодо збудників альтернаріозу та корневих гнилей. Стерильна зона (зона затримки росту) сягає 25-45 мм.

2. Попередня обробка насіння біопрепаратами забезпечує швидке формування різного рівня біологічної активності ґрунту, призводить до зміни розвитку мікроорганізмів різних еколого-трофічних груп.

3. Відсоток уражених мікозами рослин за обробки біопрепаратів сягає 15%, в той час як у зразку, що не оброблювався біопестицидами уражено 70% рослин.

4. Ефективність комплексу Гаупсину та Фітоцид проти корневих гнилей та альтернаріозу становила в середньому 62,2 %.

5. Комплексне використання біопрепаратів Планриз та Гаупсин забезпечило одержання швидшого розвитку наземної частини рослини і становило - 87,7%.

6. Вивчені штами бактерій а саме *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* є безпечними для людини та навколишнього середовища. За умови його використання стане можливим зниження впливу пестицидів і хімікатів на біоценози, а також отримання врожаю, вільного від шкідливих речовин.

## Список використаної літератури

1. Anandaraj B. Studies on influence of bioinoculants (*Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp., *Bacillus subtilis*) in green gram // *Tech.* - Vol 1 (2). - 2010. - P. 95-99.
2. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. / J. M. Raaijmakers et al. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. P. 537-547.
3. Cantliffe D. J., Shaw N.L., Jovicich E. Greenhouse production of vegetable crops grown with a closed-loop fertigation system in a pesticide-free environment. *Proc. IS on Greensys, Acta Hort, ISHS*, 2008. P. 1455—1462.
4. Gray E. J., Smith D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the planta-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem.*, 2005. Vol. 37. P. 395-412.
5. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. / P. Bakker et al. *Phytopathology*, 2007. P. 239-243.
6. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria / L. Liu et al. *Phytopathology*. 1995. 85. P. 695-698.
7. Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. / W. Fakhouri et al. *Phytochemistry*, 2001. Vol. 58. P. 1297-1303.
8. Perez-Garcia A., Romero D. A. de Vicente Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011. Vol. 22. P. 187-193.
9. Wakulinski W. Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight) // *Acta Physiol. Plant.* - 1989. - V. 11, № 4. - P. 301-306.

10. Weller David M. Pseudomonas Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Year // Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: Pseudomonas spp. - 2007 - P. 31-43.

11. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere / J.M. Whipps // Journal of Experimental Botany, 2001. — Vol. 52. — pp. 487—511.

12. Агроекологічна інженерія в біоконтролі ризосфери рослин та формуванні здоров'я ґрунту. / Я. М. Гадзало та ін. Мікробіологічний журнал, 2017. № 4, т. 79. С. 88–109.

13. Андреюк Е. И., Иутинская Г. А., Дульгерм А. Н. Почвенные микроорганизмы и интенсивное земледелие. Київ: Наук. думка, 1988. 190 с.

14. Антагоністична активність бацил щодо збудників бактеріальних хвороб томата. / Р. І. Гвоздяк та ін. Карантин і захист рослин, 2007. № 12. С. 15–17.

15. Билай В. И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1977, 442 с.

16. Білик, М. О. Біологічний захист рослин : посіб. до лаб.-практ. занять / М. О. Білик. — Х. : Майдан, 2009. — 424 с.

17. Біологічно активні речовини в рослинництві / З. М. Гринцаєнко, С. П. Пономаренко, В. П. Карпенко, І. Б. Леонтюк. К. : ЗАТ «Нічлава», 2008. 345 с

18. Болотських О.С. Огірки / О.С. Болотських, М.С. Єфімов, В.М. Лисицин. — Київ: Урожай, 1987. — 136 с

19. Васильев, В. П. История защиты растений от вредителей и болезней в Украине / В. П. Васильев, М. П. Леевой. — К. : Аграр. наука, 1996. — 131 с.

20. Велит І.А. Вибір джерела світла для оптичного опромінення рослин томатів, огірків та розсади. Системи управління, навігації та зв'язку. 2013. №1(25). С. 128-132.

21. Волкогон В. В., Дімова С. Б., Волкогон К. І., Комок М. С. Нові біологічні препарати комплексної дії на основі активних штамів азотфіксувальних бактерій та фізіологічно активних речовин – Київ: Логос, 2010. – 403 с.

22. Гуцол Н. М. Біологічні особливості представників родини Гарбузові (Cucurbitaceae) флори Київської області. Освіта та наука у вимірах ХХІ століття: м-ли звітно-наукової конф. студентів, 3-6 квітня 2017 р. Ф-т природничо-географічної освіти та екології. К.: Вид-во НПУ імені М.П. Драгоманова, 2017. С. 60.

23. ДСТУ 7847:2015. Якість ґрунту. Визначення чисельності мікроорганізмів у ґрунті методом посіву на тверде (агаризоване) живильне середовище. [Чинний від 20016-07-01]. К.: ДП «УкрНДНЦ», 20016. 11, 12 с., вкл. обкл. (Національний стандарт України).

24. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія / В. В. Волкогон та ін.; за наук. редакцією В. В. Волкогона. Київ: Аграр. Наука, 2010. 464 с.

25. Іутинська Г.О. Шляхи регулювання функцій мікробних угруповань ґрунту в аспекті біологізації землеробства і стійкого розвитку агроєкосистем / Г.О. Іутинська // Сільськогосподарська мікробіологія : Зб.наук. праць. — Чернігів: ЦНТЕІ, 2006. — Вип. 3 — С. 7—18.

26. Кисіль В. І. Біологічне землеробство в Україні: проблеми і перспективи. Харків: Штрих, 2000. 162 с.

27. Комплексне застосування біопрепаратів на основі азотфіксуючих, фосформобілізуючих мікроорганізмів, фізіологічно активних речовин і біологічних засобів захисту рослин : рекомендації / УАН. Ін-т с.-г. мікробіології. — К.: Аграр. наука, 2000. — 35 с.

28. Кравченко В.А. Огірок: селекція, насінництво, технології/ В.А. Кравченко — Київ: ЕКМО, 2008. — 176 с.

29. Курдиш І. Гранульовані препарати комплексної дії на основі азотфіксуючих та фосфатмобілізуючих бактерій / Курдиш І., Рой А., Титова Л. // Аграрна освіта і наука на початку третього тисячоліття. Матер. Міжнар. науково-практ. конф. (18-21.09.2001, Львів). — Львів, 2001. — Т. 1. — С. 189-194.

30. Курдиш І. К. Перспектива застосування мікробів-антагоністів у захисті агроєкосистем від фітопатогенів. Сільськогосподарська мікробіологія: Зб. наук. праць. Чернігів: ЦНТЕУ, 2011. Вип. 13. С. 23–41.

31. Курдиш І. К. Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів. Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. Чернігів, 2009. Вип. 9. С. 7–32.

32. Курдиш І.К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми: монографія / І.К. Курдиш. — К.: Наукова думка, 2010. — 253 с.

33. Лихацький В. І. Овочівництво. Біологічні особливості і технологія вирощування овочевих культур. Ч. 2 : навч. посібн. К.: Урожай, 1996. 360 с.

34. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В. Екологія біологічних систем (екологія мікроорганізмів): навчальний посібник. Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2014. 248с.

35. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика: моногр. / В. В. Волкогон та ін.; за ред. В. В. Волкогона. К.: Аграрна наука, 2006. 312 с.

36. Мікроорганізми і альтернативне землеробство / за ред. В. П. Патики. К.: Аграрна наука, 2000. 38 с.

37. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур /Омелюта В. П. та ін.; за ред. Омелюти В. П. Київ: Урожай, 1986. 288 с.

38. Олійник Т. І., Севідова І. О. Овочівництво захищеного ґрунту в контексті забезпечення продовольчої безпеки України: монографія. Х.: Майдан, 2012. 232 с.

39. Особливості процесу денітрифікації в агроценозах за впливу мінеральних добрив та мікробних препаратів. / В. В. Волкогон та ін. Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвід. темат. наук. зб. Чернігів, 2009. Вип. 10. С. 7–19.

40. Пархоменко Т. Ю. Інтродукція штамів мікроорганізмів з комплексом корисних властивостей в ризосферу овочевих рослин: дис...канд. с.-г. наук: 03.00.16 / УААН Інститут агроекології та біотехнології. Київ, 2003. 26.

41. Патика В. П., Омелянець Т. Г. Екологічні основи застосування біологічних засобів захисту рослин як альтернативи хімічним пестицидам. Агроекологічний журнал. 2005. № 2. С. 21–24.

42. Примак І. Д., Манько Ю. П., Рідей Н. М. Екологічні проблеми землеробства / за ред. І. Д. Примака. Київ: Центр учбової літератури, 2010. 456 с.

43. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. - Киев: Наукова думка, 1990 - 264 с.

44. Старчевський І. П. Біологізація землеробства. Карантин і захист рослин. 2004. № 11. С. 25–26

45. Ткаленко Г.М. Біологічні препарати проти сірої гнилі огірка в теплицях / Г.М. Ткаленко // Захист і карантин рослин: міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2014. — Вип. 60. — С. 379—386.

46. Ткаленко Г.М. Біопрепарати для контролю корневих гнилей і хвороб в'янення огірка в закритому ґрунті. Карантин і захист рослин. К. 2012, № 11. С.8-11

47. Трибель С.О., Сігарьова Д.Д., Секун О.О., Іващенко О.О. та ін. Методики випробування і застосування пестицидів Київ: Світ, 2001. 448 с.

48. Фисенко І. А., Пустова О. Г., Ткаченко Д. В. Огірки: від теорії до практики : реком. покажч. літ. / уклад. Миколаїв: МНАУ, 2020. 44 с.

49. Харсун А.І. Оптимізація складових мікроклімату і технології вирощування овочів в теплицях / А.І. Харсун, 185 П.П. Іваненко, О.М. Білогубова. – Бровари : Ін-т споруд штучного клімату, 1998. – 134 с.

50. Яровий Г.І. Наукові основи вирощування та захисту основних овочевих і баштанних культур від хвороб і шкідників/ Г.І. Яровий. – Харків: Плеяда, 2010. – 375 с.