

## **ВПЛИВ ПРОТРУЙНИКІВ НАСІННЯ ЗЕРНОВИХ КОЛОСОВИХ КУЛЬТУР НА ВЛАСТИВОСТІ БІОАГЕНТІВ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ**

**Пищур І.М., Овчарова О.П.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

*Встановлено, що ризоентерин (*Enterobacter aerogenes* 30Ф) можна застосувати одночасно з протруєнням насіння зернових колосових культур фунгіцидами раксилом, вінцитом та фундазолем. Під впливом фунгіцидів біоагенти діазофіту (*Agrobacterium radiobacter* 204) і флавобактерину (*Flavobacterium* sp. Л-30) втрачають нітрогеназну активність.*

Ключові слова: бактерії азотофіксувальні, мікробні препарати, фунгіциди

На сьогодні протруєння насіння сільськогосподарських культур є обов'язковим агрозаходом, що забезпечує захист проростків і сходів від хвороб та шкідників [2, 5].

В Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН на основі фосфатмобілізувальних бактерій *Achromobacter album* 1122 і *Paenibacillus polytuxa* KB створено бактеріальні препарати альбобактерин та поліміксобактерин, які можна застосовувати одночасно з протруєнням насіння фунгіцидами та інсектицидами [8]. У зв'язку з цим відкриваються перспективи для досліджень щодо поєднання процесів бактеризації насіння сільськогосподарських культур та його протруєння на насінневих заводах.

При протруюванні насіння його поверхня стає зоною взаємодії бактерій з хімічним агентом. Токсична дія останнього може значно знижувати ефект інокуляції. На сьогодні в достатній мірі вивчено вплив пестицидів на ефективність бобово-ризобіальних систем [4]. Однак дослідження впливу пестицидів на асоціативні азотфіксатори нечисленні, а одержані результати не впроваджені у виробництво.

Н.С. Іванов і співавт. [3] культивували діазотрофи із родів *Azospirillum* та *Agrobacterium* на твердих поживних середовищах у присутності фунгіцидів, які використовуються для протруєння насіння ячменю: байтан, вітавакс, вітавакс 200фф, фенорам, фенокс, фундазол. Показано, що за винятком фундазолу, означені хімічні

препарати пригнічують життєздатність досліджуваних бактерій.

Недостатня вивченість впливу протруйників на ефективність мікробних препаратів є стримуючим чинником для ефективного їх використання в сільськогосподарському виробництві.

Мета нашої роботи полягала в тому, щоб дослідити вплив протруйників насіння зернових колосових культур на властивості біоагентів мікробних препаратів, створених на основі асоціативних азотфіксувальних бактерій.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були: *Agrobacterium radiobacter* 204 (біоагент діазофіту), *Enterobacter aerogenes* 30Ф (біоагент ризоентерину), *Flavobacterium sp.* Л-30 (біоагент флавобактерину); фунгіциди: раксил, вінцит, фундазол.

Титр клітин бактерій в культуральній рідині або у воді визначали за допомогою камери Горяєва [6]. Реакцію штамів бактерій на пестициди вивчали методом паперових дисків [7], морфологічні особливості бактерій – у фазовому контрасті за допомогою мікроскопа марки МБІ-10 [6]. Нітрогеназну активність біоагентів мікробних препаратів визначали в напіврідких середовищах Доберейнер та Ешбі [1].

**Результати та їх обговорення.** Вплив пестицидів на формування біомаси штамів бактерій *E. aerogenes* 30Ф, *A. radiobacter* 204, *Flavobacterium sp.* Л-30 досліджували за допомогою методу паперових дисків на агаризованих поживних середовищах: картопляному, мясо-пептонному агарі (МПА) та гороховому відповідно. Концентрації пестицидів брали явно вищі за ті, що рекомендовані виробництву (вода:пестицид – 3:1). Виявлено, що результат взаємодії залежить не лише від резистентності та фізіологічних особливостей бактерій, але й від хімічного складу пестициду (табл. 1). Фунгіциди вінцит і фундазол не впливають негативно на ріст бактеріальних культур. Більше того, у варіантах *Flavobacterium sp.* Л-30 – вінцит, *Flavobacterium sp.* Л-30 – фундазол відмічена навіть стимуляція росту бактеріальних культур. Необхідно також зазначити, що на *Flavobacterium sp.* Л-30 пестицид раксил діяв негативно, а вінцит і фундазол стимулювали ріст цієї бактерії. В інших варіантах пестициди мало впливали або зовсім не впливали на ріст бактерій.

Таблиця 1. Реакція бактерій на фунгіциди на агаризованих поживних середовищах

Штам бактерій	Фунгіциди		
	раксил	вінцит	фундазол
<i>Flavobacterium sp.</i> Л-30	зона затримки росту бактеріальної маси навколо паперового диска – 2 мм	зона стимуляції росту бактеріальної маси навколо паперового диска – 5 мм	зона стимуляції росту бактеріальної маси навколо паперового диска – 2 мм
<i>E. aerogenes</i> 30Ф	бактерії індиферентні до пестициду	бактерії індиферентні до пестициду	бактерії індиферентні до пестициду
<i>A. radiobacter</i> 204	бактерії індиферентні до пестициду	бактерії індиферентні до пестициду	бактерії індиферентні до пестициду

Вплив менших концентрацій пестицидів цим методом не вивчали, тому що в поживному середовищі пестицид дифундує, створюючи градієнт концентрацій від максимальної до 0, і вплив менших концентрацій можна спостерігати на деякій відстані від протруєного паперового диска. Цей метод певною мірою моделює ситуацію в ґрунті, коли поблизу інокулянта перебуває пестицид.

При поєднаному застосуванні мікробних препаратів і пестицидів важливою є відсутність бактерицидного впливу на інокулюм. Вивчаючи дію пестицидів на життєздатність клітин бактерій в технологічних умовах протруєння насіння, готували суспензію, яка складалася з пестициду і водного змиву бактеріальної маси з агаризованого середовища (1:3). Титр клітин бактерій у водному змиві становив 2-3 млрд/мл. Життєздатність мікроорганізмів контролювали через добу, для чого суспензію висівали на тверді регламентні середовища. Було встановлено, що клітини бактерій можуть зберігати життєздатність в суспензіях із пестицидами (табл. 2), за винятком *Flavobacterium sp.* Л-30. У суспензіях з раксиллом ці мікроорганізми гинуть. При виділенні їх із суспензій, які містили вінцит і фундазол, відбулися зміни фізіологічних властивостей. Зокрема, пігментація колоній бактерій із помаранчевої змінювалась на сірувато-білу.

Таблиця 2. Життєздатність бактерій в суспензіях з пестицидами через 1 добу

Штам бактерій	% життєздатних бактерій від внесених в суспензію		
	раксил	вінцит	фундазол
<i>Flavobacterium sp.</i> Л-30	0	32,9	24,8
<i>E. aerogenes</i> 30Ф	89,8	98,6	85,4
<i>A. radiobacter</i> 204	74,9	98,7	62,9

При сумісному застосуванні бактеріальних препаратів і пестицидів важливими є не тільки відсутність значного впливу останнього на життєздатність інокулянта, але й збереження властивостей його клітин.

Щоб вивчити вплив пестицидів на культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій, готували суспензії, які складалися з культуральної рідини бактерій і пестициду (3:1). Через добу із цих суспензій виділяли пштами бактерій і перевіряли їх культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні властивості. За контроль правили властивості музейних пштамів бактерій *Flavobacterium sp.* Л-30, *E. aerogenes* 30Ф, *A. radiobacter* 204.

У табл. 3 наведені результати дії фунгіцидів на культурально-морфологічні і фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних бактерій. Встановлено, що раксил, вінцит і фундазол не мають негативного впливу на культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості пштаму бактерій *E. aerogenes* 30Ф, що дає можливість рекомендувати його для бактеризації насіння зернових культур одночасно з протруєнням вище наведеними фунгіцидами.

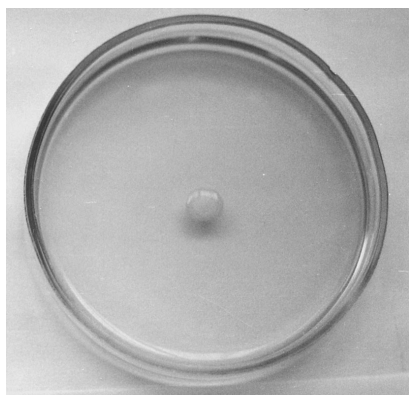
Життєздатність і росту активність клітин бактерій пштаму *E. aerogenes* 30Ф під впливом пестицидів було також підтверджено при культивуванні їх на агаризованому картопляному середовищі. Навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у суспензії фунгіцидів (вінцит, фундазол, раксил) і біопрепарату ризоентерину спостерігався ріст біомаси (рис.).

**Таблиця 3. Дія фунгіцидів на культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості штамів бактерій *Flavobacterium* sp. Л-30, *E. aerogenes* 30Ф, *A. radiobacter* 204**

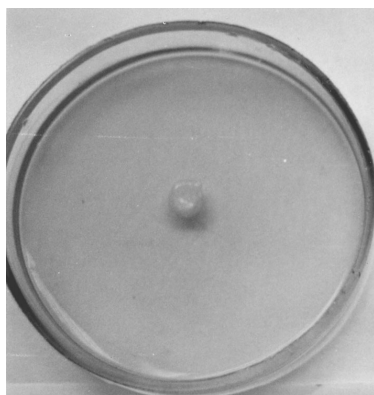
Вихідні культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості штамів бактерій	Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивостей штамів бактерій після впливу пестицидів
<i>Flavobacterium</i> sp. Л-30	
<p>Колонії на МПА – випуклі, гладенькі, жовтогарячі, блискучі, слизисті, з рівними краями діаметром 2-3 мм.</p> <p>Через 2 доби росту в МПБ при 28 °С без аерації утворювалась плівка на поверхні і слабке помутніння середовища. Осаду не було.</p> <p>При мікроскопії бактеріальної культури спостерігались нерухомі палички розміром 0,5 × 1,0-3,0 мкм.</p> <p>Титр клітин бактерій був у межах 1,2-1,8 млрд/мл.</p> <p>Нітрогеназна активність в напіврідкому середовищі Ешбі становила в середньому 120 нм С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>/мл/год.</p>	<p><i>Вінцит</i>. Втрачена пігментація колоній (стали сіруватобілими і напівпрозорими), значно знизилася нітрогеназна активність, яка становила 0,5-1,2 нм С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>/мл/год. (≈100-600 разів).</p> <p><i>Фундазол</i>. Втрачена пігментація колоній (стали матовими і напівпрозорими).</p> <p>Значно знизилася нітрогеназна активність, яка складала 0,1-2,4 нм С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>/мл/год. (≈50-1200 разів)</p>
<i>Enterobacter aerogenes</i> 30Ф	
<p>Колонії на МПА круглі, випуклі з рівними краями, не забарвлені, блискучі, діаметром 1,5-2,5 мм.</p> <p>Через 2 доби росту в МПБ при 28 °С без аерації спостерігалось сильне помутніння всього середовища і біла плівка на поверхні, яка відриваючись тонула,</p>	<p>Штами бактерій, виділені із суспензій з раксилом, вінцитом і фундазолом, за культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями не відрізнялися від вихідного штаму.</p>

1	2
<p>осаду не було.</p> <p>При мікроскопічному дослідженні бактеріальної культури спостерігались рухливі палички розміром <math>1,6-3,2 \times 0,4-0,6</math> мкм.</p> <p>Титр клітин бактерій – 4,1-4,7 млрд/мл.</p> <p>Нітрогеназна активність у напіврідкому середовищі Ешбі становила в середньому 200 нм <math>C_2H_4</math>/мл/год.</p>	
<p><i>Agrobacterium radiobacter 204</i></p>	
<p>Колонії на МПА не пігментовані, не забарвлені, гладенькі, утворює багато полісахаридного слизу.</p> <p>Через 2 доби росту в МПБ при 28 °С без аерації спостерігали слабку муть по всьому об'єму середовища і білу плівку на поверхні, осаду нема.</p> <p>При мікроскопії бактеріальної культури спостерігали рухливі палички розміром <math>3,0-6,0 \times 0,6-1,0</math> мкм.</p> <p>Титр клітин бактерій – 2,3-2,9 млрд/мл.</p> <p>Нітрогеназна активність в напіврідкому середовищі Ешбі становила в середньому 140 нм <math>C_2H_4</math>/мл/год.</p>	<p>Мікроорганізми під дією фунгіцидів, які використаних у дослідах, не проявляли нітрогеназної активності.</p> <p>За допомогою мікроскопії виявлено, що певна кількість клітин бактерій <i>Agrobacterium radiobacter 204</i> під впливом вінциту стає спареною (не розділились).</p>

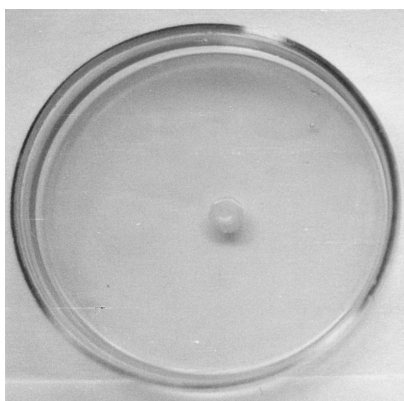
*Примітка.* В 2-ій колонці після назви пестициду подано тільки зміни, виявлені при тестуванні мікроорганізмів. Інші властивості вихідного штаму бактерій, які не змінилися під впливом пестицидів, не наводяться.



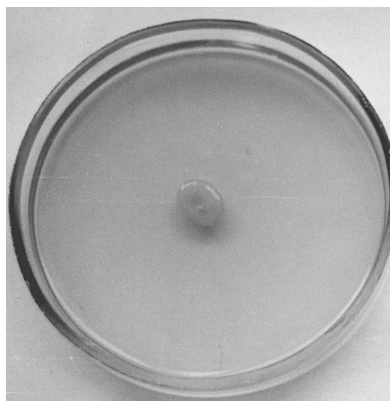
*Контроль*



*Вінцит*



*Фундазол*



*Раксил*

*Рис. Ріст бактерій навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у біопрепараті ризоентерині (контроль) та в суспензії фунгіцидів (вінцит, фундазол, раксил) з ризоентерином на агаризованому картопляному середовищі*

При дії фунгіцидів на штами бактерій *Flavobacterium sp.* Л-30 та *Agrobacterium radiobacter* 204 їхні культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості змінюються. Так, під впливом зазначених протруйників ці мікроорганізми практично втрачають нітрогеназну активність.

Таким чином, не рекомендується використовувати мікробні препарати діазофіт та флавобактерин для обробки насіння зернових

колосових культур разом з протруйниками, тоді як ризоентерин можна застосовувати одночасно з протруєнням насіння раксилом, вінцитом і фундазолом.

1. Волкогон В.В. Методичні рекомендації по визначенню активності азотфіксації в ґрунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом. – Чернігів: ЦНТЕІ, 1997. – 12 с.

2. Довідник із захисту рослин / Бублик А.І., Вапсечко Г.І., Васильєв В.П. та ін. – К.: Урожай, 1999. – 744 с.

3. Иванов Н.С., Белимов А.А. Влияние фунгицидов на рост ассоциативных азотфиксаторов и эффективность инокуляции ими ячменя // Тр. ВНИИСХМ. – 1989. – Т. 59. – С. 92-96.

4. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. – М.: Агропромиздат, 1991. – 129 с.

5. Протравливание семян зерновых культур. Рекомендации ВНИИЗР // Защита и карантин растений. – 1999. – № 2.

6. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: МГУ, 1983. – С. 133-134.

7. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Под ред. Г.С. Муромцева; Пер. с венгер. И.Ф. Куренного. – М.: Колос, 1983. – 296 с.

8. Токмакова Л.Н. Штаммы *Bacillus polymyxa* и *Achromobacter album* – основа для создания бактериальных препаратов // Микробиол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 131-138.



## **ВЛИЯНИЕ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН ЗЕРНОВЫХ КОЛОСОВЫХ КУЛЬТУР НА СВОЙСТВА БИОАГЕНТОВ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**Пищур И.Н., Овчарова Е.П.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
г. Чернигов

*Установлено, что ризоэнтерин (Enterobacter aerogenes 30Ф) можно применять одновременно с протравливанием семян зерновых колосовых культур фунгицидами раксиллом, винцитом и фундазолом.*

*Под воздействием фунгицидов биоагенты диазофита (Agrobacterium radiobacter 204) и флавобактерина (Flavobacterium sp. Л-30) теряют нитрогеназную активность.*

Ключевые слова: бактерии азотфиксирующие, микробные препараты, фунгициды

## **THE INFLUENCE OF GRAIN DRESSERS OF TAILINGS CULTURES ON THE PROPERTIES OF BIOAGENTS OF MICROBIC PREPARATIONS**

**Pyshchur I.M., Ovcharova O.P.**

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*It is established that it is possible to apply rhizoenterin (Enterobacter aerogenes 30Ф) simultaneously with seed treatment of grain tailings cultures with fungicides ( raxsil, vincit and fundazol). Bioagents of diazofit (Agrobacterium radiobacter 204) and flavobacterin (Flavobacterium sp. Л-30) lose their nitrogenase activity under fungicides action.*

Key words: nitrogen fixing bacteria, microbial preparations, fungicides.