

## **ВПЛИВ ТРИМАНУ-1 НА ПРОЦЕС АСОЦІАТИВНОЇ АЗОТФІКСАЦІЇ ТА РОЗВИТОК АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ У КОРЕНЕВІЙ ЗОНІ ЯЧМЕНЮ**

**<sup>1</sup>Волкогон В.В., <sup>2</sup>Бакун О.І., <sup>1</sup>Волкогон К.І.,**

**<sup>1</sup>Штанько Н.П., <sup>3</sup>Дульнєв П.Г.**

<sup>1</sup>Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

<sup>2</sup>Чернігівський інститут агропромислового виробництва УААН,  
смт. Прогрес, Чернігівська обл., 17035, Україна

<sup>3</sup>Науково-інженерний центр “АКСО” ІБОНХ НАН України,  
Харківське шосе, 50, м. Київ, 02160, Україна

*В лабораторних та польових умовах досліджено вплив регулятора росту рослин триману-1 на розвиток азотфіксувальних бактерій та процес азотфіксації в кореневій зоні ярого ячменю. Показано, що триман-1 сприяє підвищенню активності асоціативної азотфіксації при внесенні в ґрунт мінеральних азотних добрив у невеликій дозі ( $N_{30}$ ). Застосування рістстимулятора по фоні вуглеамонійних солей сприяє більшій ефективності асоціативного симбіозу, ніж при внесенні аміачної селітри.*

*Ключові слова: асоціативна азотфіксація, азотфіксувальні бактерії, азотні добрива, інокуляція, стимулятори росту рослин*

Серед сільськогосподарських культур зони помірного клімату, в ризосфері яких інтенсивно проходить процес азотфіксації, особливе місце належить ярому ячменю. Продуктивність асоціативної азотфіксації в агроценозах з цією культурою сягає значних показників [1]. У зв'язку з високим потенціалом азотфіксації ячмінь є цікавим об'єктом для вивчення як процесу зв'язування атмосферного азоту мікроорганізмами, асоційованими з його корінням, так і дії окремих екологічних факторів на перебіг цього процесу.

Відомо, що на активність асоціативної азотфіксації можуть суттєво впливати передпосівна інокуляція насіння активними штамми азотфіксаторів [2], рівень азотного мінерального живлення, форма азотних добрив [3], а також обробка рослин у певні фази вегетації регуляторами росту ауксинової і цитокінінової дії [4].

В роботі наведено результати дослідження впливу вищеназваних факторів на активність біологічної азотфіксації в кореневій зоні ячменю та розвиток азотфіксувальних бактерій.

**Матеріали й методи.** Дослідження проводили з ячменем ярим (*Hordeum sativum* Lessen), сортів Носівський і Прима Білорусії.

Загальну чисельність бактерій у ризосферному ґрунті рослин визначали шляхом висіву серійних розведень на картопляний агар. Кількість азотфіксувальних мікроорганізмів вивчали при висіві розведень суспензій на напіврідкі середовища Ешбі та Доберейнер з наступним тестуванням за ацетиленредукцією [5].

Активність азотфіксації в кореневій зоні ячменю вивчали ацетиленовим методом у модифікації [6].

Дослідження впливу окремих чинників на процес азотфіксації в кореневій зоні рослин ячменю проводили в умовах польових дослідів на дерново-підзолистому ґрунті ( $pH_{\text{сол}} - 5,5$ ; вміст гумусу – 0,9-1,2 %) Чернігівського Інституту АПВ. Досліди, схеми яких наведено у відповідних таблицях, проводили в чотириразовому повторенні; площа дослідних ділянок – 50 м<sup>2</sup>.

Мікровегетатійний дослід з використанням різних субстратів (промий і прожарений при 600 °С річковий пісок та дерново-підзолистий ґрунт) проводили в посудинах ємністю 200 мл. В посудини вносили суміш Прянишнікова з 0,5 дози азоту. Рослини вирощували протягом 35 днів у люміностації за інтенсивності освітлення 20 тис. люкс, світловому періоді 16 годин та температурі  $26 \pm 2$  °С. Статистичну обробку одержаних даних проводили за Доспеховим [7].

У дослідях використовували регулятор росту рослин ауксиново-цитокінінового типу дії триман-1, синтезований у Науково-інженерному центрі “АКСО” ІБОНХ НАН України. В польових дослідях водний розчин триману-1 застосовували з розрахунку 5 г/500 л води/га. Обробку рослин проводили у фазі виходу в трубку. В умовах мікровегетатійного дослідження триман-1 застосовували в такій же концентрації для передпосівного обробітку насіння. Вплив регулятора росту на процес азотфіксації в польових дослідях вивчали при внесенні в ґрунт вуглеамонійних солей (ВАС) та аміачної селітри (АС) по фоні  $P_{45}K_{45}$ .

Передпосівну інокуляцію насіння проводили, використовуючи суспензію бактерій *Azospirillum brasilense* 410 з розрахунку 30

200 тис. клітин на рослину. Штам депонований у колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту с.-г. мікробіології УААН та колекції мікроорганізмів Всеросійського НДІСГМ.

**Результати та їх обговорення.** Визначення активності асоціативної азотфіксації свідчить про суттєвий вплив на цей процес як інокуляції, так і триману-1 (табл. 1). При цьому доза мінерального азоту 30 кг/га, незалежно від форми добрив, була найбільш сприятливою. В той же час, застосування триману-1 по фоні ВАС в дозі  $N_{60}$  забезпечувало практично такий же рівень активності азотфіксації, як і при внесенні даного виду добрив у дозі  $N_{30}$ . На відміну від цього, в контролі та у варіанті з інокуляцією внесення ВАС у дозі  $N_{60}$  пригнічувало активність досліджуваного процесу порівняно з дозою  $N_{30}$ . Вплив АС у більш високій дозі був негативним по всіх трьох варіантах.

**Таблиця 1. Активність азотфіксації в кореневій зоні ячменю під впливом інокуляції та триману-1 в залежності від агрофону (польовий дослід)**

Вид азотних добрив*	Доза добрив, кг/га	Варіанти досліду	Активність азотфіксації, мг N/m <sup>2</sup> за годину**
ВАС	$N_{30}$	контроль	2,126
		інокуляція	3,658
		триман-1	4,900
	$N_{60}$	контроль	1,691
		інокуляція	1,704
		триман-1	4,458
АС	$N_{30}$	контроль	1,853
		інокуляція	2,530
		триман-1	3,034
	$N_{60}$	контроль	1,009
		інокуляція	1,387
		триман-1	1,225
$НП_{05}$	по досліду		0,12
	для видів добрив		0,07
	для внутрішньблокових факторів і взаємодії		0,06

\* азотні добрива вносили по фоні  $P_{40}K_{40}$

\*\*визначення проводили в фазу молочної стиглості зерна

Отже, триман-1 сприяє реалізації потенціалу азотфіксації в кореневій зоні ячменю в більшій мірі при застосуванні ВАС. Негативного впливу підвищеної дози добрива на процес азотфіксації при цьому не виявлено.

При порівнянні впливу на перебіг азотфіксації азотних добрив також бачимо, що по фоні ВАС активність азотфіксації перевищує відповідні показники у варіантах з внесенням у ґрунт АС (табл. 1).

Результати дослідження асоціативної азотфіксації в іншому польовому досліді також свідчать про зростання активності цього процесу при застосуванні мінерального азоту в невеликій дозі ( $N_{30}$ ) (табл. 2). Сам факт підвищення азотфіксувальної активності в кореневій зоні рослин при внесенні азотних добрив не є новим. Відомо, що активність процесу зростає при застосуванні фізіологічно оптимальних доз мінерального азоту [3]. Більш цікавим у наших дослідженнях є встановлення особливостей перебігу даного процесу при застосуванні різних форм азотних добрив. Позитивний вплив ВАС на активність асоціативної азотфіксації в досліді був сильнішим у порівнянні з дією АС у перший строк проведення аналізів (фаза розвитку рослин-кущіння), проявлявся меншою мірою – в другий (фаза виходу в трубку) і нівелювався наприкінці вегетаційного періоду.

*Таблиця 2. Активність азотфіксації в кореневій зоні ячменю під впливом триману-1 та азотних добрив (польовий дослід)*

Агрофон	Варіанти	Активність азотфіксації, мкг N/m <sup>2</sup> за годину		
		фаза кущіння	фаза виходу в трубку	фаза молоч- но-воскової стигlosti
P <sub>60</sub> K <sub>60</sub>	контроль	96,2	24,1	24,1
	триман-1	–	48,1	24,1
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + ВАС (N <sub>30</sub> )	контроль	417,0	96,2	28,1
	триман-1	–	385,0	160,1
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + АС (N <sub>30</sub> )	контроль	192,2	72,2	28,1
	триман-1	–	320,4	192,3
НІР <sub>05</sub>	по досліді	31,0	28,9	24,1
	для агрофонів		14,5	12,1
	для триману і взаємодії		14,5	12,1

Застосування триману-1 у фазі виходу в трубку сприяло зростанню активності азотфіксації по всіх трьох агрофонах, причому по фону ВАС – у найбільшій мірі. В фазу молочно-воскової стиглості триман-1 не діяв на безазотному фоні, помітно підсилював активність процесу у варіантах з внесенням азотних добрив, але в дещо більшій мірі – по фону АС. Очевидно, це пояснюється тим, що аміачна селітра має більш пролонговану дію у порівнянні з ВАС.

Відмічені особливості активності азотфіксації в кореневій зоні ячменю під дією вищезазначених факторів значною мірою підтверджуються результатами вивчення чисельності азотфіксувальних бактерій у ризосфері дослідних рослин. Так, показано, що мінеральний азот сприяє зростанню кількості бактерій, здатних зв'язувати молекулярний азот атмосфери, в два рази на стадії кушіння ячменю (табл. 3). У фазе виходу в трубку дія мінерального азоту на розвиток азотфіксаторів проявляється ще в більшій мірі. Але найбільш інтенсивно розвиваються представники азотфіксувальної мікрофлори в цей строк досліджень при застосуванні триману-1 – їх чисельність зростає на порядок, причому по фону ВАС дія триману-1 є більш вираженою (табл. 3). У фазі молочно-воскової стиглості ще можна відмітити вплив триману-1 і мінерального азоту на розвиток діазотрофів, проте ситуація дещо змінюється – найвища їх кількість спостерігається по фону АС як добрива з більш тривалим строком дії.

*Таблиця 3. Вплив триману-1 та мінерального азоту на розвиток азотфіксувальних бактерій у ризосфері ячменю (польовий дослід)*

Агрофон	Варіанти дослідів	Чисельність бактерій на середовищі Доберейнер, тис./г абсолютно сухого ґрунту		
		фаза кушіння	фаза виходу в трубку	фаза молочно-воскової стиглості
P <sub>60</sub> K <sub>60</sub>	контроль	4,0	9,8	0,9
	триман-1	–	25,6	0,9
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + ВАС (N <sub>30</sub> )	контроль	9,0	40,7	2,6
	триман-1	–	950,9	25,2
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + АС (N <sub>30</sub> )	контроль	9,0	25,1	4,8
	триман-1	–	450,2	150,9

Активний розвиток азотфіксувальної мікрофлори в кореневій зоні ячменю, підвищення активності процесу асоціативної азотфіксації під впливом триману-1 та мінерального азоту позначається на урожайності цієї культури. Продуктивність рослин зростає як під впливом азотних добрив, так і триману-1. Слід відмітити тенденцію до зростання урожайності при взаємодії триману-1 з ВАС у порівнянні з дією цього регулятора росту по фону АС (табл. 4).

*Таблиця 4. Урожайність ячменю під впливом триману-1 залежно від виду азотного добрива (польовий дослід)*

Агрофон	Варіанти дослідів	Урожайність, ц/га
P <sub>60</sub> K <sub>60</sub>	контроль	13,0
	триман-1	16,8
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + ВАС (N <sub>30</sub> )	контроль	21,4
	триман-1	25,3
P <sub>40</sub> K <sub>40</sub> + АС (N <sub>30</sub> )	контроль	21,0
	триман-1	24,8
НІР05	по досліді	0,24
	для агрофонів	0,17
	для триману і взаємодії	0,12

Очевидно, що в даному випадку позитивно позначається вплив ВАС на рослини ячменю у фази найбільш інтенсивного їх розвитку. Важливим при цьому може бути також і вплив вуглекислого газу, який вивільняється з вуглеамонійних солей. Позитивна дія CO<sub>2</sub> на розвиток рослин ячменю описана в літературі [8].

При порівнянні впливу триману-1 і інокуляції на активність азотфіксації в кореневій зоні ячменю (табл. 1) несподіваною є більш виражена дія регулятора росту рослин, адже аборигенні азотфіксувальні мікроорганізми, які формують асоціативний азотфіксувальний симбіоз з рослинами, як правило, не відрізняються високою нітрогеназною активністю, на чому власне і базуються наукові розробки щодо штучної бактеризації насіння відселекціонованими високоактивними штамами бактерій. Відповідь на це запитання ми спробували знайти при вивченні впливу триману-1 на розвиток азотфіксаторів насіння ячменю. Відомо, що епіфітні діазотрофи насіння окремих видів рослин можуть бути основним

джерелом бактерій при формуванні азотфіксувальних асоціацій [9]. Нашими попередніми дослідженнями особливостей утворення асоціацій азотфіксувальних бактерій з окремими видами злакових трав показано активну участь у цьому також і бактерій-ендофітів, які локалізовані під оболонкою насіння, в міжклітинниках алейронового шару [10]. В ході даної роботи було зроблено припущення, що триман-1 може впливати на розвиток насінневих азотфіксаторів (як епіфітів, так і ендоефітів). Дослідження цього питання підтвердило справедливність попередніх міркувань. Визначення загальної чисельності бактерій та кількості азотфіксувальних бактерій на нестерильному та поверхнево стерилізованому насінні свідчить, що вже через 48 годин після його обробки розчином триману-1 чисельність діазотрофів на проростках може сягати десятків тисяч клітин на одну насінину (проросток). Значний відсоток бактерій при цьому є ендоефітного походження (табл. 5).

**Таблиця 5. Динаміка чисельності бактерій на насінні (проростках) ячменю під впливом обробки розчином триману-1 (10 мг/л)**

Варіанти дослідів	Бактерії на картопляному агарі, млн КУО /10 насінин			Азотфіксувальні бактерії, тис./10 насінин					
	0 год.	24 год.	48 год.	бактерії, що утилізують органічні кислоти			бактерії, що утилізують цукри		
				0 год.	24 год.	48 год.	0 год.	24 год.	48 год.
<b>Нестерилізоване насіння</b>									
Контроль	0,280±0,030	90,2±2,5	108,0±1,4	2,0	16,0	95,0	9,5	25,0	25,0
Триман-1	0,270±0,009	81,5±1,2	119,0±2,3	2,0	7,5	250,0	9,5	95,0	95,0
<b>Поверхнево стерилізоване насіння</b>									
Контроль	0,300±0,100	90,2±2,5	102,0±2,9	0,45	2,5	2,5	0,45	2,5	15,0
Триман-1	0,080±0,009	81,5±1,2	103,0±3,5	0,45	2,5	9,5	0,45	2,5	95,0

Зроблені висновки підтверджуються результатами мікро-вегетаційного дослідів з ячменем. Визначення активності асоціативної азотфіксації у варіантах, що передбачали комбінації з вирощуванням нестерильного і поверхнево стерилізованого насіння на нестерильному і стерилізованому субстратах, свідчать, що основним джерелом азотфіксувальних бактерій, які беруть участь у

формуванні асоціативного симбіозу, є ендofітні бактерії. Так, при вирощуванні ячменю на стерильному субстраті (піску) з поверхнево стерилізованого насіння (варіант, який виключає надходження бактерій із субстрату та з поверхні насіння), розміри активності процесу азотфіксації не поступаються значенням, одержаним у варіанті з вирощуванням рослин з нестерилізованого насіння на нестерильному субстраті (грунті). Обробка насіння перед висівом розчином триману-1 діє однаково на формування азотфіксувальних асоціацій – активність процесу значно підвищується у порівнянні з контролем, але при цьому розміри азотфіксації знаходяться на одному рівні як для асоціацій, сформованих за участю поверхнево стерилізованого насіння, так і нестерильного (табл. 6). Отже, основним джерелом бактерій при формуванні асоціативного симбіозу з рослинами ячменю можуть виступати діазотрофи насіння, в тому числі і ендofітного походження.

**Таблиця 6. Вклад азотфіксаторів насіння ячменю і ґрунту в формування азотфіксувальних асоціацій**

Варіанти дослідів	Активність азотфіксації, мкг N/посудину/годину			
	стерилізований пісок		дерново-підзолистий ґрунт	
	нестерилізоване насіння	поверхнево стерилізоване насіння	нестерилізоване насіння	поверхнево стерилізоване насіння
Контроль	0,143	0,140	0,162	0,155
Триман-1	0,248	0,256	0,222	0,237

HP<sub>05</sub> по досліді 0,051  
 для субстратів 0,025  
 для триману і взаємодії 0,027

Очевидним є те, що триман-1 впливає на розвиток азотфіксувальних бактерій не прямо, а опосередковано – через вплив на метаболічний стан проростків. Такий висновок ми робимо після вивчення впливу триману-1 на розвиток ряду бактеріальних штамів, виділених із зони коренів ячменю – представників *Azospirillum brasilense* та *Azotobacter chroococcum* в умовах культивування чистих культур на живильних середовищах. Додавання триману-1 до середовищ у невисоких концентраціях (до 0,2 мкг/мл) не впливало на розвиток бактерій та їх нітрогеназну активність;



підвищення концентрації знижувало дані показники.

Отже, вуглеамонійні солі та стимулятор росту рослин триман-1 сприяють активному розвитку асоціативних азотфіксувальних бактерій у кореневій зоні ячменю та підвищенню ефективності асоціативного азотфіксувального симбіозу. Основним джерелом азотфіксувальних бактерій при цьому можуть бути діазотрофи-ендофіти насіння.

1. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. – М.: МГУ, 1986. – 136 с.

2. Мікроорганізми і альтернативне землеробство /Патика В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. та ін. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

3. Umarov M., Shabaev V., Smolin V., Aseeva O. Incorporation of “biological” nitrogen by nonleguminous plants during associative N<sub>2</sub>-fixation // IX Int. Symp. Soil. Biol. and Conservation of the Biosphere – Par. Sorpon. – 1985. – P. 65

4. Волкогон В.В., Дульнев П.Г., Ковтун Е.П. и др. Влияние фитогормонов и их синтетических аналогов на активность ассоциативной азотфиксации // Микробиология. – 1996. – Т. 65, N 6. – С. 850-854.

5. Villemin G., Balandreau J., Dommerques Y. Utilization du test de reduction de l'acetilene pour la numeration des bacteries libres fixateurs d'azote // Ann. Microbiol. ed Enzimol. – 1974. – Vol. 24, N 2. – P. 87-94.

6. Волкогон В.В. Способ определения активности азотфиксации в почве // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, N 2. – С. 89-9.

7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 415 с.

8. Пухальская Н.В., Боковая М.М. Генеративное развитие ячменя при выращивании растений на двух уровнях азотного питания в атмосфере, обогащенной CO<sub>2</sub> // Агрехимия. – 1996. – N 5. – С. 16-20.

9. Калининская Т.А., Редькина Г.В. Микрофлора семян риса как источник азотфиксирующих микроорганизмов в его ризосфере //Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1981. – N 4. – С. 617-621.

10. Волкогон В.В., Мамчур А.Е., Лемешко Е.В., Миняйло В.Г. Азоспириллы – эндофиты семян злаковых растений //Микробиол. журн. –1995. – Т. 57, N 1. – С. 14-18.

## **ВЛИЯНИЕ ТРИМАНА-1 НА ПРОЦЕСС АССОЦИАТИВНОЙ АЗОТФИКСАЦИИ И РАЗВИТИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В КОРНЕВОЙ ЗОНЕ ЯЧМЕНЯ**

**<sup>1</sup>Волкогон В.В., <sup>2</sup>Бакун О.И., <sup>1</sup>Волкогон Е.И.,  
<sup>1</sup>Штанько Н.П., <sup>3</sup>Дульнев П.Г.**

<sup>1</sup>Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,  
г. Чернигов

<sup>2</sup>Черниговский институт агропромышленного производства УААН,  
пгт. Прогресс

<sup>3</sup>Научно-инженерный центр “АКСО” ИБОНХ НАНУ, г. Киев

*В лабораторных и полевых условиях исследовано влияние регулятора роста растений тримана-1 на развитие азотфиксирующих бактерий и процесс азотфиксации в корневой зоне ярового ячменя. Показано, что триман-1 способствует увеличению активности ассоциативной азотфиксации при внесении в почву минеральных азотных удобрений в небольшой дозе ( $N_{30}$ ). Применение ростстимулятора по фону углеаммонийных солей способствует большей эффективности ассоциативного симбиоза, чем при внесении аммиачной селитры.*

*Ключевые слова: ассоциативная азотфиксация, азотфиксирующие бактерии, азотные удобрения, инокуляция, стимуляторы роста растений*

## **THE INFLUENCE OF TRIMAN-1 ON ASSOCIATIVE NITROGEN FIXATION AND NITROGEN FIXING MICROORGANISMS IN BARLEY ROOT ZONE**

**<sup>1</sup>Volkogon V.V., <sup>2</sup>Bakun O.I., <sup>1</sup>Volkogon E.I., <sup>1</sup>Shtanko N.P.,  
<sup>3</sup>Dulnev P.G.**

<sup>1</sup>Institute of agriculture microbiology UAAN, Chernihiv

<sup>2</sup>Chernihiv institute of APV UAAN, Progress

<sup>3</sup>Scientific Engineering Centre “ACSO” of IBCOC NANU, Kyiv

*The influence of plant growth regulator triman-1 on nitrogen fixing bacteria and nitrogen fixation process in barley root zone was studied in the laboratory and field conditions. It was shown that triman-1 enhances associative nitrogen fixation activity when mineral nitrogen fertilizers ( $N_{30}$ ) was used. The use of triman-1 increases efficiency of associative symbiosis more effectively with the use of carboammonium salts rather than with ammonium nitrate.*

*Key words: associative nitrogen fixation, nitrogen fixation bacteria, nitrogen fertilizes, inoculation, plant growth regulators.*