

І. М. Пищур

ОСОБЛИВОСТІ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ *BACILLUS POLYMYXA KB* У РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ УМОВАХ

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

Показано, що сучасні інсектициди і фунгіциди, які використовуються для протруєння насіння цукрового буряку, суттєво негативно не впливають на інокулюм *Bacillus polymyxa KB*. Рекомендується поєднувати обробку насіння цими пестицидами з бактеризацією.

Ключові слова: фосфоробактерин, бактеризація, протруєння насіння, цукровий буряк

I. M. Pishchur

Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

FEATURES OF HABITABILITY *BACILLUS POLYMYXA KB* IN MISCELLANEOUS ECOLOGICAL CONDITIONS

It is shown that modern insecticides and fungicides, which are applied for sugar beet seed treatment do not have any negative vital influence the inoculum. It is recommended to combine seed treatment with these pesticides and bacterization.

Key words: phosphobacterin, bacterization, seed treatment, sugar beet.

Штам бактерій *Bacillus polymyxa KB* (депонований у Всеросійському інституті сільськогосподарської мікробіології під № В-324-Д) є основою для виробництва поліміксобактерину – препарату для поліпшення фосфорного живлення та стимуляції росту і захисту сільськогосподарських культур, зокрема цукрового буряку. Як відомо, бактеріальні препарати, бактеріальні добрива є одним із важливих агротехнічних засобів альтернативного («біологізованого») землеробства. За можливістю зменшити хімічне навантаження на ґрунт і навколишнє середовище (зменшити норми туків і обмежити застосування пестицидів) вони відповідають екологічній ідеології. Так, застосування бактеріальних препаратів до останніх років обмежувалось агрозаходом з протруєння насіння. Суміщення бактеризації з протруєнням допускалось у виключних випадках, зокрема при застосуванні слабкотоксичних для бактерій фунгіцидів – фундазолу, бавистину. Пробактеризоване в таких умовах насіння необхідно було негайно висівати.

В. І. Канівець і Л. М. Токмакова отримали штам бактерій *Bac. polymyxa KB*, що виявився резистентним до фунгіциду ТМТД та інсектициду адифура (патент UA 20206; Токмакова, 1997; Канівець 2000). На цій основі вперше була запропонована технологія бактеризації насіння разом з обробкою їх указаними пестицидами на насінневих заводах.

Останнім часом ми переконались, що резистентність, індіферентність до фунгіцидів і інсектицидів є серед бактерій досить поширене явище (Канівець, Пищур, 2001). Виявилось, що протруєне насіння, зокрема цукрового буряку, обсім'янене безліччю різноманітних видів бактерій. Подолання перепони у вигляді агрозаходу з протруєння насіння відкриє широкі можливості щодо застосування бактеризації насіння – цього екологічно безпечного методу поліпшення ґрунтового живлення рослин. Завдання наших досліджень полягали у вивченні можливостей штаму *Bac. polymyxa KB* зберігати життєздатність в середовищах з сучасними інсектицидами та фунгіцидами, адже тут залишається ще низка невирішених питань. Зокрема, недостатньо досліджені характер проявлення резистентності в різних умовах, методи оптимізації умов для тривалого зберігання бактерій інокулянта на протруєному сухому насінні, вплив пестицидів на приживлення інокулянта в ризосфері та його взаємовідносини з дотичною до нього мікрофлорою ґрунту. Не вивчався можливий вплив пестицидів на агрономічно цінні властивості штаму.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Використовували найпоширеніші на сьогодні протруйники насіння цукрового буряку – адифур (діюча речовина – карбофуран), гаучо (діюча речовина – імідаклоприд), тачигарен (діюча речовина – гімексазол), сульфокарбатіон, а також клейку речовину

НаКМЦ. Дослідження вели з насінням сорту Білоцерківська 45. Застосовували методи лабораторних мікробіологічних і польових досліджень, зокрема метод класичного польового досліду (площа дослідної ділянки – 25 м², повторність – чотириразова). Польові досліді проводили на чорноземі вилугуваному легкосуглинковому з такими головними агрономічними показниками: гумус в орному шарі – 3,2–3,4 %, $pH_{\text{вод.}}$ – 5,9–6,0, уміст P_2O_5 за Чиріковим – 14–17 мг/100 г, K_2O за Масловою – 12–14 мг/100 г.

Методи мікробіологічних досліджень. Якісну реакцію штаму бактерій на пестициди вивчали методом паперових дисків (Сзги, 1983). Для вивчення дії пестицидів на життєздатність клітин бактерій в технологічних умовах протруєння насіння готували суспензію, яка складалась 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 шляхом висіву суспензії на тверді регламентні середовища та за впливом на ріст культури на агаризованому середовищі навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у цій суспензії.

Морфологію бактеріальних клітин вивчали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії (МБИ-6). Титр клітин бактерій і спор визначали за допомогою камери Горяєва.

Активність продукування фізіологічно-активних речовин визначали за методом Берестецького на проростках кукурудзи (Берестецький, 1972).

Здатність штамів розчиняти трикальційфосфат визначали в рідкому середовищі Муромцева. Уміст фосфору в культуральному середовищі визначали фосфоро-молібденовим методом.

Вивчення впливу пестицидів на параметри росту штаму бактерій проводили в умовах періодичного культивування на рідкому поживному середовищі – МПБ, у контрольних і дослідних варіантах. Засів проводили суспензією бактерій з попередньо визначеним титром. Інкубацію інокульованих середовищ (об'єм 50 мл) здійснювали в колбах об'ємом 200 мл на качалці при t 28°С. У динаміці через кожні 0,5–1,0 год. визначали титр бактерій за допомогою камери Горяєва. У відібраних пробах для попередження розмноження та прилипання мікроорганізмів до скла використали розчин, який містив 0,85 % $NaCl$, 0,5 % (за об'ємом) формаліну, нейтралізованого до pH 7,5 розчином Na_2HPO_4 , та сліди аніонного детергенту додецилсульфату натрію (Мейнелл Дж., Мейнелл Э., 1978). На основі одержаних даних будували графіки залежності між логарифмом титру (біомаси) і тривалістю культивування. Для розрахунку питомої швидкості росту, тривалості подвоєння чисельності мікроорганізмів використовували загальноприйняті формули (Перт С. Дж., 1978).

Вивчення ступеня приживання бактерій в ризосфері та динаміки зберігання на протруєному і не протруєному насінні цукрового буряка проводили з використанням методу генетичного маркування популяцій. Використовуючи метод поступової адаптації бактерій до підвищеної дози стрептоміцину, отримували стрептоміцинстійку форму, яка добре росла на середовищі, що містило 1000 одиниць стрептоміцину в 1 мл середовища. Їх зберігали на середовищі без антибіотика і з антибіотиком. Сталість цієї властивості перевірялась посівом бактерій на середовище, яке містило стрептоміцин і середовища без стрептоміцину.

Одержаним мутантом інокульовали насіння цукрового буряка одночасно з протруєнням з розрахунку 1×10^6 клітин бактерій на насінину. Спостерігали за збереженням клітин бактерій на насінні в повітряно-сухих умовах при кімнатній температурі та приживленням інокулянта в ризосфері.

Життєздатність і чисельність клітин бактерій на бактеризованому і не бактеризованому насінні контролювали шляхом змиву клітин і висіву їх на відповідне поживне середовище. Динаміку чисельності мікроорганізмів спостерігали протягом кількох місяців

Чисельність мікроорганізмів окремих еколого-трофічних груп і таксономічних груп у ризосфері і в ґрунті визначали методом посіву ґрунтової суспензії на відповідні тверді живильні середовища та методом серійних розведень (Мейнелл Дж., Мейнелл Э., 1978).

Методи агрохімічних досліджень. Уміст рухомого фосфору в ґрунті визначали за методом Чирікова, рухомого калію – за методом Маслової, $pH_{\text{вод.}}$ і $pH_{\text{сол.}}$ ґрунту – визначали потенціометрично.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив пестицидів на життєздатність штаму. Методом паперових дисків на агаризованому поживному середовищі встановили, що з використаних пестицидів лише сульфокарбатіон справляв сильну негативну дію на ріст бактеріальної культури. Радіус відсутності росту навколо паперових дисків з сульфокарбатіоном складав 20–30 мм. Паперові диски, змочені адифуром, гаучо, тачигареном (концентрація води до пестициду = 3 : 1), не пригнічували наростання на агарі бактеріальної маси *Vac. polytuxa KB*.

Раніше Л. М. Токмаковою (1997) було показано, що в технологічній суміші з адифуром штам *Vac. polytuxa KB* не лише зберігається, але й активно розмножується.

При поєднаному застосуванні бакпрепаратів і пестицидів за заводською технологією важливою умовою є відсутність бактерицидного впливу пестицидів в суспензії, якою обробляється насіння. Установлено, що штам у достатній мірі зберігає життєздатність в суспензіях з адифуром і тачигареном, значно гірше – з гаучо і ще гірше – із сульфокарбатіоном (табл. 1).

Таблиця 1
Збереження життєздатності клітин бактерій, шт. *Vac. polytuxa KB* у суспензіях з пестицидами протягом однієї доби

Варіанти дослідів	% життєздатних від внесених
Контроль	79,3
Адифур	60,3
Гаучо	30,1
Тачигарен	76,6
Сульфокарбатіон	22,4

що, з одного боку, бактеріальна оболонка є достатньо жорсткою в порівнянні з грибною чи тваринною, вона насичена гідролітичними ферментами, є практично непроникною для великих молекул пестицидів, з іншого – мембрана бактеріальної клітини, як відомо, також має іншу біохімічну будову, ніж мембрана клітин грибів і клітин комах, і її проникність для молекул не однакова.

Таблиця 2
Бактеріальний ріст *Vac. polytuxa KB* навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у суспензії пестициду і рідкого препарату

Пестициди	Бактеріальний ріст
Адифур	++
Гаучо	++
Тачигарен	++
Сульфокарбатіон	–

Умовні знаки: «+++» – добрий бактеріальний ріст; «–» – відсутність бактеріального росту.

ні в активності росту культури, ні в досягнутому титрі, ні в активності цінних фізіологічних властивостей під впливом пестицидів не відбулося.

*Вплив пестицидів на параметри росту бактерій штаму *Vac. polytuxa KB*.* Після посіву в ґрунт протруєного і пробактеризованого насіння на початковому етапі інокулюму прийдеється розвиватися в присутності пестициду. У зв'язку з цим вивчали вплив пестицидів на параметри росту штаму в рідкому середовищі.

Як показали результати досліджень, динаміка збільшення чисельності клітин бактерій характеризується класичною кривою. За даними графіків залежності логарифма

Змочені в добовій технологічній суміші з бактерією паперові диски розклали на агаризоване поживне середовище. Результати представлені в табл. 2, з якої видно, що добове витримування клітин штаму в концентрованій суспензії з адифуром, гаучо і тачигареном не вплинуло на активність бактеріального росту. Відсутність росту навколо диску із сульфокарбатіоном свідчить про його бактеріостатичну дію.

Таким чином, можна заключити, що штам є достатньо резистентним до дії досліджуваних пестицидів. Це можна пояснити тим,

Важливим є не тільки відсутність значного впливу пестицидів на життєздатність інокулюму, але й збереження ним агрономічно цінних фізіологічних властивостей. Для вивчення культурально-морфологічних і фізіологічних змін, які могли відбутися під дією пестицидів, виділили культуру мікроорганізму з дослідних суспензій. Виділену культуру і контрольну тестували на середовищах без пестицидів, порівнювали культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні (у тому числі агрономічно-цінні) їх властивості.

Отримані дані засвідчили, що суттєвих змін

чисельності ($\log_2 N$) від часу культивування в експоненціальній фазі розраховали тривалість подвоєння чисельності клітин. Виходячи з неї, провели розрахунки питомої швидкості росту.

Як видно з табл. 3 вплив протруйників залежав від концентрації препарату. Так, карбофуран при вмісті в середовищі 0,1 і 1 г/л діє на клітини бактерій бактеріостатично, ріст їх чисельності не спостерігався. У варіанті з концентрацією 0,01 г/л питома швидкість росту збільшувалася порівняно з контролем на 15,6 %. При цьому максимальна біомаса та лаг-фаза перевищували контроль. Імідаклоприд негативно впливав на накопичення біомаси та подовжував лаг-фазу, особливо в концентрації 1 г/л – у 18,8 рази. Гімексазол у всіх досліджуваних концентраціях збільшував у порівнянні з контролем питому швидкість росту на 16,2–25,3 % та максимальну біомасу на 1,3–15,7 %, і подовжував лаг-фазу в 1,7 рази. Сульфокарбатіон у концентрації 1 г/л діяв бактеріостатично. Ріст спостерігали в концентрації 0,1 г/л, але при цьому він подовжував лаг-фазу і зменшував швидкість росту в порівнянні з контролем.

Таблиця 3

Вплив протруйників насіння цукрового буряку на параметри росту бактерій *Vac. rotulifera* KV у періодичній культурі

Пестициди	Концентрація пестицидів, г/л	Тривалість лаг-фази, год.	Тривалість періоду подвоєння чисельності, хв.	Питома швидкість росту, год ⁻¹	Максимальна біомаса, г/л
Контроль	0	1,50	39	1,067	20,54
	0,01	7,57	34	1,234	23,87
Карбофуран («адифур»)	0,10	–	–	–	–
	1,00	–	–	–	–
	0,01	3,70	35	1,178	19,08
Імідаклоприд («гаучо»)	0,10	3,67	40	1,040	17,39
	1,00	28,27	44	0,936	12,54
	0,01	2,50	31	1,337	20,81
Гімексазол («тачигарен»)	0,10	2,50	31	1,317	21,07
	1,00	2,47	34	1,240	23,76
	0,01	3,27	41	1,026	18,71
Сульфокарбатіон	0,10	29,87	46	0,901	16,04
	1,00	–	–	–	–

Примітка. «–» – ріст відсутній.

Слід відмітити, що в умовах експерименту в деяких випадках хімічні препарати збільшували швидкість росту порівняно з контролем. Так, тачигарен значно стимулював швидкість росту бактерій в експоненціальній фазі в концентраціях препарату 0,01, 0,1 і 1 г/л. З літератури відомо, що тачигарен – протруйник насіння і є регулятором росту рослин. Він поглинається корінням, стимулює утворення коренів, підвищує врожайність і стійкість цукрового буряку до низьких температур, не накопичується в ґрунті внаслідок мікробіологічного розкладу (Пестициды, 1992).

Згідно з літературними даними, стимулятори росту рослин можуть прискорювати розвиток деяких бактерій. Крім того, на швидкість росту могло вплинути використання бактеріями препарату як джерела енергії й елементів живлення. Отже, в умовах експерименту негативний вплив протруйників на ріст штаму бактерій *Vac. rotulifera* KV зменшувався в такому порядку:

адифур > сульфокарбатіон > гаучо > тачигарен.

Оскільки в ґрунтових умовах концентрація препаратів значно нижча і вона різко падає з віддаленням від насінини, то вплив протруйників на бактерії інокулюму в ризосфері не повинен бути суттєвим.

Вивчення динаміки зберігання клітин на сухому протруєному насінні. Як раніше згадувалося, особливо привабливою є завчасна (за кілька місяців) бактеризація насіння сумісно з обробкою пестицидами в спеціальних машинах для протруєння. Головною умовою для цього є властивість бактерій тривалий час зберігати достатню кількість життєздатних клітин на сухому протруєному насінні. У зв'язку з цим нами проведені відповідні дослідження з вивчення динаміки збереження бактерій інокулюму на насінні цукрового буряку. Припущення, що клітини будуть зберігатись, ґрунтувалось на згаданих вище даних, що протруєне насіння не є стерильним і містить велику кількість різноманітних мікроорганізмів (Канивец, Пищур, 2001).

У досліджах використали бактеріальний препарат, що виготовлений згідно з відповідними Технічними умовами (ТУ) і мав відповідний титр. Бактеризацію насіння проводили в лабораторних умовах з розрахунку 1 млн клітин бактерій на 1 насінину – сумісно з протруєнням його рекомендованою кількістю пестицидів. Для вивчення впливу адгезивноактивних речовин на збереження бактерій використали NaКМЦ з розрахунку 2 % в суспензії для бактеризації. Оброблене насіння висушували протягом доби при кімнатній температурі ($t = 18-20^{\circ}\text{C}$). Насіння зберігали в чашках Петрі при кімнатній температурі.

Ю. Бородуліна із співробітниками (Бородуліна и др., 1972), узагальнивши літературні дані щодо забезпечення приживлення в ґрунті бульбочкових бактерій, повідомляють, що бактеризація має забезпечити певну мінімальну кількість бактерій на одній насінині – не менше 100 тис. клітин бактерій.

Результати досліджень з вивчення динаміки збереження бактерій на насінні цукрового буряку представлені на рис. 1. Виявилось, що достатня чисельність інокулюму на насінні цукрового буряку зберігається протягом 4–5 місяців. Негативна дія протруйників на інокулюм – помірна, окрім сульфокарбатуону, який зменшує кількість інокулюму приблизно в 2 рази вже протягом доби, що скорочує термін використання бактеризованого насіння на місяць.

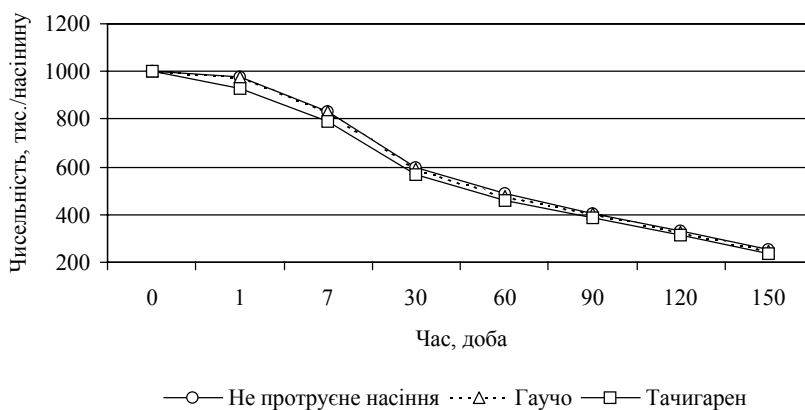


Рис. 1. Динаміка чисельності клітин бактерій *Bac. polymyxa KB* на насінні

Здатність бактерій зберігатись у повітряно-сухих умовах, а також резистентність до дії фунгіцидів й інсектицидів дозволяє використовувати бактерії *Bac. polymyxa KB* для завчасної бактеризації насіння цукрового буряку на насінневих заводах, що має важливе значення для виробництва. Отримані дані свідчать, що бактеризацію можна здійснювати за 4–5 місяців до посіву цукрового буряку (оптимально – 3 місяці, за умови використання вищевказаних протруйників і NaКМЦ).

Вище відмічалась відсутність росту штаму в умовах періодичного культивування при концентраціях карбофурану 0,1 і 1 г/л і сульфокарбатуону – 1 г/л. З графіка, показаного

на рис. 1, видно, що клітини зберігаються тривалий час на протруєному насінні. У такій ситуації обґрунтовуємо можливість розвитку – приживлення клітин у ризосфері – таким чином:

1. Адифур і сульфокарбатіон в технологічних концентраціях діють на штам бактерій *Bac. polytuxa KB* бактеріостатично, що вище було показано.
2. При проростанні насіння, на якому знаходиться протруйник, бактерії швидко вийдуть із зони дії препарату і заселять корінці.
3. Коли мікроорганізм росте у вигляді колонії або мікроколонії, то йому легше подолати негативний вплив навколишнього середовища, виділяючи екзоферменти і продукти метаболізму.

У табл. 3. показано результати вивчення впливу пестицидів на параметри росту *B. polytuxa KB* у рідкому середовищі при постійному перемішуванні. У таких умовах при концентрації діючої речовини (карбофурану, сульфокарбатіону) 1 г/л мікроорганізми не змогли подолати негативний тиск пестицидів.

Наші дані щодо збереження життєздатності клітин штаму на сухому насінні, протруєному новими пестицидами, підтверджують висновки Л. М. Токмакової (1997), які ґрунтувались на використанні ТМТД і адифуру.

Приживлення інокулюму в ризосфері цукрового буряку. Не вивченим було питання впливу нових пестицидів (гаучо, тачигарен, сульфокарбатіон) на приживання *Bac. polytuxa KB* в ризосфері цукрового буряку. Це обумовило проведення спеціальних досліджень у польовому дрібноділянковому досліді з цукровим буряком.

Використали адаптований до стрептоміцину штам бактерій *Bac. polytuxa KB*. Результати дослідів (рис. 2) показали, що в ризосфері бактеризованих рослин виявлено значну кількість стрептоміцинстійких мікроорганізмів у перший строк дослідження (30 діб). З часом чисельність клітин інокулюму поступово зменшувалась. Ця тенденція була ще помітною в другий строк досліджень (45 діб). Дія інсектициду гаучо на маркований інокулянт була найменш суттєвою. Аналогічно діяли адифур і тачигарен. Навіть при внесенні сульфокарбатіону клітини в певній мірі приживались.

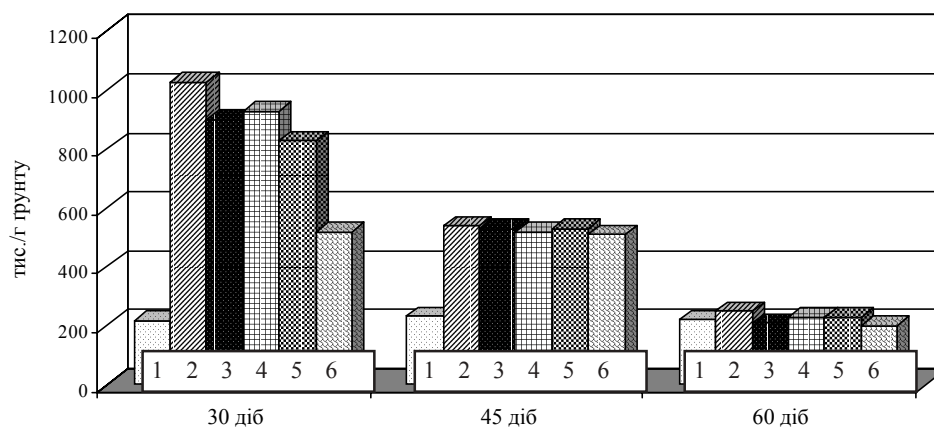


Рис. 2. Динаміка чисельності стрептоміцинстійких мікроорганізмів у ризосфері цукрового буряку: 1 – контроль (без бактеризації і протруєння насіння); далі при бактеризації стрептоміцинстійким штамом *Bacillus polytuxa*: 2 – контроль; 3 – адифур; 4 – гаучо; 5 – тачигарен; 6 – сульфокарбатіон

У досліді зі стандартним штамом також можна помітити факт приживлення інокулюму. Так, на 30-й день після посіву в інокульованих варіантах, у тому числі з пестицидами, загальна чисельність фосформобілізуючих бактерій зростала до 30 %. Пізніше чисельність вирівнювалась по варіантах, хоча останнє не обов'язково свідчить, що інокулюм зник. Важливо те, що на початкових етапах онтогенезу інокулюму проявляє життєдіяльність

у ризосфері і тим самим поліпшує фосфорне живлення рослин. Нестача фосфорного живлення в молодому віці не може бути виправлена пізніше (Лархер, 1978).

Отже, досліджені пестициди суттєво не впливають на ефективність бактеризації цукрового буряку поліміксобактерином. Бактеризація насіння веде до збільшення чисельності фосформобілізуючих мікроорганізмів у ризосфері протягом двох місяців за рахунок інокулюму. Інсектициди адифур і гаучо, фунгіцид тачигарен також суттєво не впливають на розвиток ґрунтових аборигенних фосформобілізуючих мікроорганізмів. Відмічено тимчасовий негативний вплив на загальну чисельність фосформобілізуючих мікроорганізмів та інтродуковані бактерії фунгіциду сульфокарбатіон.

Вплив протруйників на мікрофлору ґрунту, прилеглою до насіння. Вияснимо, як впливають пестициди, що знаходяться на поверхні насіння, на мікрофлору прилеглою ґрунту. Відповідні спостереження проведені нами в спеціальних польових дослідах.

Було використано насіння, оброблене тачигареном і адифуром на Вінницькому насінневому заводі. Вплив пестицидів вивчали відносно групи бактерій, які використовують органічні і мінеральні сполуки азоту (чисельність на МПА і КАА), бактерій, які використовують фосфор з мінеральних водонерозчинних фосфатів (середовище Муромцева), бактерій-олігонітрофілів (середовище Ешбі), азотобактеру (середовище Федорова). Штам фосформобілізуючих бактерій, яким оброблялось насіння, виявляли на сприятливому для нього середовищі – на картопляному.

Дослідження проводили в дрібноділянковому польовому досліді зі стандартизованим ручним посівом (на точно визначену глибину – 3 см з відстанню між насіннями 1,5–2,0 см). Бактеризацію здійснювали за тиждень до посіву. Рослини вирощували до фази 5–6 справжніх листочків. Аналізувалась бактеріальна мікрофлора прилеглою до насіння ґрунту (1–2 мм), а також мікрофлора ризосфери.

Отримані дані наведені в табл. 4 і 5. З табл. 4 видно, що хімічні засоби захисту рослин негативно вплинули на загальну чисельність амоніфікаторів, на чисельність олігонітрофілів, а також на загальну чисельність бактерій, які ростуть на середовищі Муромцева. Негативний вплив, про який іде мова, спостерігали через 2 тижні після посіву насіння.

Таблиця 4

Вплив біопрепаратів та пестицидів протруєного насіння цукрових буряків на мікрофлору прилеглою до нього ґрунту (посів у ґрунт – 08.05.99 р.)

Час, доба	Варіанти дослідів	Загальна чисельність бактерій, млн/г ґрунту				
		середовище				
		МПА	КАА	Муромцева	рідке картопляне	Ешбі
15	Не протруєне насіння	10	37	6	17	11
	Протруєне насіння	3	35	2	16	4
	Поліміксобактерин	17	52	7	192	18
	Протруєне насіння + поліміксобактерин	16	49	6	183	16
22	Не протруєне насіння	1,1	5	1,3	2	1
	Протруєне насіння	1,0	4	1,2	3	1
	Поліміксобактерин	2,1	9	2,2	19	6
	Протруєне насіння + поліміксобактерин	2,1	8	1,9	16	6

Пестициди не пригнічували бактерій, які живляться мінеральними формами сполук азоту, а також не вплинули на чисельність анаеробних бактерій, які розвиваються на рідкому картопляному середовищі (кlostридіальні форми).

Так, уже через 3 тижні верхній шар ґрунту став більш прогрітим і чисельність усіх груп бактерій у прилеглому до насіння ґрунті вирівнялась порівняно з контрольним

варіантом. Тобто негативний вплив пестицидів припинився. Вони нейтралізувалися грунтом або розкладені мікроорганізмами. Бактеризовані ж варіанти вирізнялись більшою чисельністю бактерій на всіх поживних середовищах. Очевидно, що на них проростав, крім аборигенної мікрофлори, інокулюм, а також інокулюм стимулював і розвиток ґрунтових бактерій.

Вищезазначені наслідки негативного впливу позначились і на мікрофлорі ризосферного ґрунту (табл. 5). Але і тут спостерігаємо, що бактеризація у великій мірі знімає пригнічуючу дію протруйників (на прикладі азотобактера). У бактеризованому варіанті зросла кількість бактерій на селективному середовищі, сприятливому для розвитку інокулюму. Останнє, очевидно, зумовлене приживленням інокулюму. Про це свідчить морфологія бактеріальних колоній. Багатьом з них характерні ознаки інокулюму.

Таблиця 5

Вплив пестицидів протруєного насіння цукрових буряків та бактеризації на мікрофлору ризосфери проростків (посів – 08.05.99 р., облік бактерій 30.05.99 р.)

Варіанти досліду	Чисельність бактерій (млн/г) на середовищі:			
	МПА	агаризоване картопляне	Ешбі	азотобактер, %
Контроль (не протруєне насіння)	17,8	1,1	5,2	18
Протруєне насіння	9,4	0,7	1,8	5
Поліміксобактерин	–	3,1	–	12
Протруєне і бактеризоване насіння (поліміксобактерин)	–	2,5	–	10

Примітка. «–» – середовище не є селективним або сприятливим до інокулянта.

Отже, хімічні засоби захисту насіння цукрових буряків вибірково негативно діють на фізіологічні групи бактерій ґрунту.

Обробка насіння препаратами поліміксобактерин зменшує певною мірою негативний вплив хімічних протруювачів насіння на вразливі до них форми ґрунтових мікроорганізмів. Інокулюм, який індиферентний до присутності пестицидів, розвивається навколо насінини і в ризосфері рослини. Це може сприяти деградації та блокуванню використаних хімічних препаратів. Крім того, пригнічуючи аборигенну мікрофлору, пестициди також створюють сприятливі умови для конкуренції бактерій інокулюму.

Вивчення впливу поєднаного застосування бактеризації з обробкою насіння новими інсектицидами і фунгіцидами на урожайність цукрового буряку. Дослідження провели в класичному польовому досліді. Отримані дані (рис. 3) свідчать, що протруєння пестицидами, які зараз використовуються на виробництві, суттєво не знижують ефективність бактеризації. Приріст урожайності коренеплодів при поєднанні цих операцій від бактеризації коливався в межах 6,2–8,7%. Отже, протруєння насіння цукрового буряку адифуром, гаучо, тачигареном і сульфокарбатионом не впливає негативно на ефективність бактеризації поліміксобактерином.

Про самоочищення ґрунту. Протруєння насіння є порівняно малим фактором забруднення середовища. З насінням попадає в ґрунт в переважній більшості випадків не більше 100 г/га (не більше 0,3 мг/кг ґрунту) пестицидів. Але маємо знати подальшу «долю» і цієї невеликої кількості хімічних забруднювачів.

Відомо, що головну роль у самоочищенні ґрунту від залишків пестицидів несуть ґрунтові мікроорганізми. Чим вища біологічна активність ґрунту, тим швидше протікає його самоочищення. Відомо також, що ризосфера – це зона найвищої біологічної активності ґрунту. Протруйники, знаходячись в цій зоні, через деякий час повинні розкладатися мікроорганізмами. Це знижує небезпеку забруднення навколишнього середовища залишками пестицидів.

Але пестициди можуть також мати і позитивне значення для мікробіоценозу, сприяючи розширенню екологічної ніші в ризосфері рослини для бактерій інокулюму, адже наш інокулюм є резистентним до дії цього пестициду. Для бактерій інокулюму пестицид створює сприятливі умови конкуренції з певними фізіологічними групами ґрунтових мікроорганізмів.

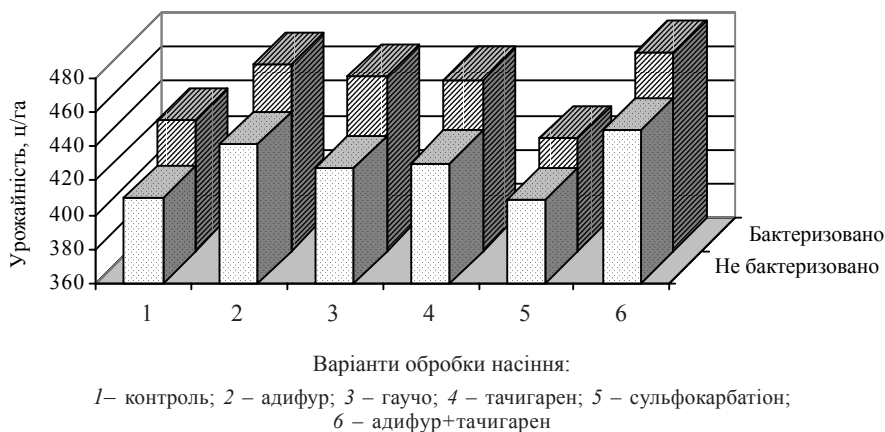


Рис. 3. Вплив протруєння і бактеризації насіння цукрового буряку поліміксобактерином на врожайність коренеплодів (чорнозем вилугуваний легкосуглинковий, 2000 рік)

*Обговорення резистентності *Vas. rotulifera* KB.* Вважаємо, що резистентність обумовлена принциповою різницею будови прокаріотних бактеріальних клітин, з одного боку, і еукаріотних клітин грибів, тварин, найпростіших – з іншого боку. Як відомо, бактеріальна клітина в тисячі разів менша еукаріотичної, і не тільки не має оформленого ядра, але і низки важливих органел. Для неї характерна інша цитоплазматична мембрана і принципово інші надмембранні структури. Бактеріальній клітині властива щільна, жорстка оболонка, яка містить до 20 % сухої речовини клітини і яка складається із мурену – співполімеру ацетилглюкозаміну і ацетилмурамової кислоти, геміцелюлози, включає діамінопимелінову кислоту, яка зустрічається лише у прокаріот (Заварзин и др., 1992).

Оболонка у гіфів грибів більш тонка і складається, як і у клітин покривних тканин комах, із хітину. Переважна маса клітин тварин взагалі не мають захисної стінки. У середині клітинної стінки бактерій і на її поверхні містяться гідролітичні ферменти, які розщеплюють субстрат. Вплив пестицидів нейтралізується потужним ферментативним апаратом клітинної стінки бактерій. Клітини бактерій в більшості випадків огорнуті слизовою капсулою. Все це надає їм відому більшу стійкість у жорстких умовах зовнішнього середовища, у тому числі протидіяти деяким хімічним засобам захисту рослин.

Особливу роль у вибіркового поглинанні речовин, як відомо, відіграє мембрана. Мембрана прокаріотної клітини також принципово відрізняється від еукаріотної. У ній білкова частина переважає над ліпідною. У мембрані еукаріотичної клітини співвідношення між цими речовинами 1 : 1 (Заварзин и др., 1992.). При цьому відрізняється якісний склад білків і ліпідів. За даними Стейнера (Stanier, 1970), плазматична мембрана у прокаріот не пристосована для переносу великих молекул в клітину. В еукаріот існує і фагоцитоз, і піноцитоз.

Варіювання надмембранних структур, субмембранного компоненту, особливості мембрани обумовлюють характер їх проникності для речовин різної хімічної природи, при цьому виникає неоднакова чутливість до різних пестицидів – індиферентність, резистентність, бактеріостатичність. Тому не дивно, що у царства дроб'янок – інше відношення до ряду пестицидів, ніж у представників, наприклад, комах, грибів.

ВИСНОВКИ

Нові пестициди гаучо і тачигарен, що застосовуються зараз для протруєння насіння, як і адифур, не проявляють суттєвого негативного впливу на життєздатність та агрономічно цінні фізіологічні властивості клітин штаму *Vac. polymyxa KB* – основи, на якій виготовляють препарат комплексної позитивної дії на рослини – поліміксобактерин. Застосування поліміксобактерину для бактеризації насіння є ефективною і в поєднанні з протруєнням насіння препаратами гаучо і тачигарен.

Селекція агрономічно цінних, стійких до пестицидів штамів, для виготовлення бактеріальних препаратів-добрив розширює можливості альтернативного, біологізованого землеробства. Вона знаходиться в руслі екологічної ідеології, зокрема, надає можливості зменшувати норми туків.

* * *

*Виражаю вдячність професору В. І. Канівцю – науковому керівнику роботи, а також завідувачці лабораторії біологічного фосфору Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН Л. М. Токмаковій за надану можливість провести дослідження зі штамом *Vac. polymyxa KB*.*

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Берестецький О. О. Простий метод виявлення фітотоксичних речовин, утворюваних мікроорганізмами // Мікробіологічний журн. – 1972. – Т. 34, № 6. – С. 798-799.
- Бородулина Ю. С., Самсонова С. П., Кронгауз Е. А., Петрушенко О. П. Производство и применение сухих бактериальных удобрений в СССР. – М., 1972. – 90 с.
- Заварзин А. А., Харазова А. Д., Молитвин М. Н. Биология клетки: Общая биология. – С.-Пб.: Изд-во С.-Пб. ун-та, 1992. – 320 с.
- Канівець В. І. Життя ґрунту. – К.: Аграрна наука, 2000. – 132 с.
- Канівець В. І., Пищур І. Н. Бактериальная микрофлора протравленных семян сахарной свеклы // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 370-373.
- Лархер В. Экология растений: Пер. с нем. / Под ред. Т. А. Работнова. – М.: Мир, 1978. – 384 с.
- Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. – М.: Мир, 1978. – 347 с.
- Патент України № 20206. Штам бактерій *Vac. polymyxa* ВНДІСГМ В-324 Д для виробництва стимулятора росту цукрового буряку / В. І. Канівець, Л. М. Токмакова, Ю. М. Мелимука. – Опубл. 27.02.98; Бюл. № 1. – 6 с.
- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
- Пестициды: Справочник / В. И. Мартыненко, В. К. Промоненков, С. С. Кукаленко и др. – М.: Агропромиздат, 1992. – 368 с.
- Сэги Й. Методы почвенной микробиологии: Пер. с венгер. / Под ред Г. С. Муромцева. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
- Токмакова Л. Н. Штаммы *Bacillus polymyxa* и *Achromobacter album* – основа для создания бактериальных препаратов // Мікробіологічний журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 131-138.
- Stanier R. Y. Some aspects of biology of cells and their possible evolutionary significance // Charles and Knight (eds.), Organization and control in prokaryotic and eucaryotic cells, Cambridge University Press. – 1970.

Надійшла до редколегії 14.01.04