

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КІРОЯНЦЬ МІДІЯ ОЛЕГІВНА

УДК 631.427:631.445.4:633.16"321"

**ДИСЕРТАЦІЯ
ФОРМУВАННЯ РИЗОСФЕРНОГО МІКРОБНОГО БІОМУ ЯЧМЕНЮ
ЯРОГО ЗА РІЗНИХ СИСТЕМ УДОБРЕННЯ В ЧОРНОЗЕМІ ТИПОВОМУ**

201 «Агрономія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело

М.О.Кіроянц

Науковий керівник:

Патика Микола Володимирович,
доктор сільськогосподарських наук,
професор, академік НААН

Київ - 2024

АНОТАЦІЯ

Кіроянц М.О. Формування ризосферного мікробного біому ячменю ярого за різних систем удобрення в чорноземі типовому. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 «Агрономія». – Національний Університет Біоресурсів і Природокористування України, Київ, 2024.

У дисертації наведено результати досліджень за 2017-2019 рр. щодо формування мікробіоти ризосфери ячменю ярого, виділення домінантних мікроорганізмів із загального пулу ризосферних бактерій, їх ідентифікації для подальшого вивчення корисних властивостей в аспекті індукції росту і захисту рослин ячменю ярого від фітопатогенів.

Досліджено мікробний комплекс чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого, вивчено його якісний та кількісний склад за різних систем удобрення, включаючи місцеві ресурси. Особливістю варіантів удобрення є ресурсне забезпечення рослинними рештками попередника для відтворення продуктивного потенціалу агроландшафту та внесення різних норм мінеральних добрив.

Проведені дослідження впливу таких варіантів удобрення на формування мікробного біому, на основі загальноприйнятої технології вирощування сільськогосподарських культур: контроль – без добрив; удобрення $N_{45}P_{42}K_{55}$, побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ та лише сама побічна продукція - 3,0 т/га.

Відбір та аналіз ґрунтових зразків проводили з верхнього (0–20 см) орного кореневмісного шару у фази цвітіння та воскової стиглості ячменю ярого. Визначення чисельності мікроорганізмів основних фізіологічних груп проводилось методом посіву ґрунтових суспензій на відповідні елективні поживні середовища. На основі отриманих даних були розраховані екологічні індекси Шеннона і Сімпсона, що свідчать про тісний зв'язок між показниками біорізноманіття та домінування мікроорганізмів у різні фази онтогенезу ячменю

ярого. Встановлено, що застосування органо-мінеральної системи удобрення ґрунту з меншою нормою мінеральних добрив оптимізує за груповим складом, чисельністю та активністю мікробні процеси в період активної вегетації ячменю ярого, так збільшується чисельність амоніфікувальних бактерій в 2,6–3,7 рази, азотфіксаторів - в 1,6–2,4, що використовують мінеральні форми азоту, в 2,5–6,5 спороутворюючих і в 1,5– рази целюлозоруйнівних мікроорганізмів.

Проведено комплексні молекулярно-біологічних дослідження ризобіому і структури прокаріот ґрунту, що формується в ґрунті за різного аграрного використання. Мікробний біом біоценозу ґрунту зумовлює основну функціональну роль у кругообігу речовин та енергії і є ключовим складовим елементом трансформації органічних решток, процесів мінералізації та іммобілізації біогенних елементів. Процеси синтезу і накопичення органічної речовини в агроценозах в першу чергу залежать від структури, різноманіття та активності мікробіоти, при цьому вона має прямий взаємозв'язок з умовами самого ґрунтового середовища. Тому дослідження біому ґрунтових мікроорганізмів є науковою основою для обґрунтування та розробки заходів, що спрямовані на розширене відтворення родючості чорноземів. Проведені дослідження структури метагеному мікробного комплексу та ідентифікація домінуючих представників еубактерій молекулярно-біологічними методами чорнозему типового в ризосфері ячменю ярого під впливом різних систем удобрення ґрунту. Так була проведена екстракція тотальної ДНК ґрунту, ампліфікація фрагментів 16S рРНК прокаріот за допомогою ПЛР реакції, та кількісна оцінка тотальної ДНК за допомогою спектрофотометра. Таксономічну структуру прокаріот визначали за методом аналізу поліморфізму довжин термінальних рестрикційних фрагментів tRFLP, та аналіз отриманих фрагментів 16S рРНК в автоматичному капілярному секвенаторі CEQ 8000 Genetic Analysis System («Beckman Coulter», США). Потім отримані результати аналізували за нуклеотидними послідовностями та ідентифікували їх з відповідними послідовностями 16S рРНК бази даних GenBank.

Виявлено різноманіття та трофічно складнішу будову філотипової структури ґрунтового бактеріального мікробоценозу за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅. Основу його структури складають два основних кластери домінуючих генотипів, що відносяться до представників 22 видів, 54 % з яких не культивуються на поживних середовищах. За варіанту удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + N₆₀P₅₀K₆₅ якісний склад структури ґрунтового мікробоценозу характеризувався трьома кластерами і видовим багатством з 17 видів, з яких 76 % некультивовані. Якісний склад домінуючих генотипів прокаріот багатший у майже два рази при застосуванні органо-мінерального удобрення з меншою нормою мінеральних добрив у порівнянні з варіантом контроль. Системи удобрення у значній мірі впливають на філотипове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів. Удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅ зумовлює диференціацію за кількістю домінуючих генотипів у різних шарах ґрунту.

Вивчення біому ґрунтових мікроорганізмів (особливо функціонально – значущих домінантних морфотипів) є науковою основою для розробки заходів, спрямованих на посилення відтворення родючості чорноземів. Два домінантних ізоляти бактерій було виділено з усього пулу ризосфери ячменю ярого на ґрунтах, які знаходяться в лісостеповій зоні України. Отримані ізоляти оцінювали за морфологічними та біохімічними властивостями. Отже, подальшою метою роботи було дослідити та ідентифікувати ці важливі функціональні властивості домінантних морфотипів бактерій.

Морфологічні особливості домінантних морфотипів мікроорганізмів ризосфери вивчали за допомогою системи візуалізації EVOS FL Imaging System, 40x lens. Проводили також фарбування за Грамом. Фізіологічні особливості вивчали за допомогою одного з найточніших методичних підходів у визначенні фізіологічного різноманіття асоціації ґрунтових мікроорганізмів – тест-системи KB009 TM HiCarbo Kit відносно утилізації джерел вуглецю. І на основі нашого дослідження щодо вуглецевих джерел живлення, фарбування за Грамом, мікроскопії та попередніх досліджень, а також класифікації за детермінантом

Берджі, ми дійшли висновку, що ізоляти GPA-1 належать до роду *Phyllobacterium*, а ізоляти GPA-7 належать до роду *Bacillus*.

Сучасні молекулярно-біологічні методи відкривають широку перспективу та нове розуміння щодо філогенетичного і функціонального різноманіття ризосферних мікробних угруповань. Подальший комплексний аналіз дає змогу провести оцінку таксономічної та функціональної структури домінантних морфотипів мікроорганізмів за допомогою вибору ген-специфічних праймерів і секвенування повнорозмірних геномів. Основним інструментарієм філогенетичних досліджень є порівняння первинних нуклеотидних послідовностей та подальша візуалізація результатів. Як філогенетичний маркер використовують структуру варіабельних ділянок гена 16S рРНК. Бактеріальну ДНК виділяли з суспензії бактеріальних клітин з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), згідно з протоколом виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') і 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTACGA CTT-3') за такого температурного режиму: 95°C, 2 хв; 30 циклів — 95°C, 30 с; 55°C, 45 с; 72°C, 90 с; кінцева елонгація 72°C, 7 хв. ПЛР-суміш об'ємом 25 мкл містила 12,5 мкл 2x DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 30 пкмоль кожного праймера та 50 нг ДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина). Продукти ПЛР розділяли у 1,7%-му агарозному гелі, що містив 0,01% бромистого етидію. Результати візуалізували в УФ-світлі. Отриманий амплікон розміром ~ 1500 п.н. вирізали з гелю і очищували за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі DS-11FX+(DeNovix, США). Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з даними бази GenBank за допомогою програми NCBI Blast ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Філогенетичний аналіз, вирівнювання нуклеотидних послідовностей 16S рРНК представників різних

видів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* здійснювали за допомогою програми MEGA 10. Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням 2-параметричної моделі Кімури по 1000 реплікам бутстреп-аналізу. Послідовності гена 16S рРНК референтних культур бактерій родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* використано з бази даних GenBank. У результаті проведених досліджень отримано нуклеотидну послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 загальною довжиною 991 нуклеотид та штаму *Bacillus velezensis* 10 — 1126 нуклеотидів. Первинний порівняльний аналіз сиквенсів досліджуваних штамів з послідовностями гена 16S рРНК, задепонованими у базі даних GenBank, виявив 99% подібності штамів до сиквенсів типових представників відповідних видів. Нуклеотидні послідовності штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 зареєстровано у базі GenBank під № МК947049 і МК947055, а *Bacillus velezensis* 10 – МК947050 і МК947056 відповідно. Відомо, що ці домінантні ризосферні мікроорганізми мають високий ступінь асоціативності з рослинами, адаптованими до ґрунтово-кліматичних умов. Вони здатні зв'язувати азот атмосфери, стимулювати ріст і розвиток рослин, що забезпечує підвищення продуктивності зернових культур. Виділений з апікальної частини коренів ячменю штам асоціативних бактерій *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 виявився активним азотофіксатором з властивостями стимуляції росту і розвитку рослин ячменю ярого. Виділений штам *Bacillus velezensis* 10, пов'язаний з формуванням кореневої системи рослин, позитивно впливає на морфометричні показники ячменю ярого, та є дуже активним протигрибковим і противірусним агентом рослин.

Проведені дослідження щодо проявлення домінуючими представниками бактеріального біому у ризосфері ячменю ярого, антагоністичної активності щодо фітопатогенних мікроміцетів. Ризосферні бактерії проявляли високу антагоністичну активність відносно фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу екзометаболітів різної хімічної природи, а також проявили себе як потенційні еліситори, за допомогою яких можливо контролювати та знижувати

рівень ураження фітопатогенами на стадіях онтогенезу рослин. Дослідження властивостей високоактивних мікроорганізмів як потенційних біоагентів препаратів зокрема захисної дії для застосування в екологічно безпечних агротехнологіях є одним із пріоритетних завдань сучасної сільськогосподарської мікробіології. Вивчали антагоністичну дію виділених домінантних ризосферних бактерій *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 проти фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch 18.77, надані з колекції кафедри фітопатології ім. академіка В. Ф. Пересипкіна НУБіП України. Антагоністичні властивості визначали дифузним методом подвійної культури в чашках Петрі на глюкозо-пептонному агаризованому середовищі (ГПА-Звягінцева). Зони затримки росту враховували через 3 і 10 діб культивування. У дослідженнях використано класичний метод блоків. У результаті проведених досліджень встановлено, що бактерії *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 інгібували ріст фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 45,1 % і 77,4 % відповідно, тест-культури *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 63,1 % і 66,6 %, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 65,2 % і 86,7 %. Бактерії *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 більш швидко заселяють субстрат і відповідно використовують поживні ресурси, у той же час мікроміцети втрачають можливість росту та не мають можливості далі заселяти субстрат, проявляється тенденція до загибелі. Отже, вочевидь, виявлена антагоністична активність, яка пов'язана із конкуренцією. У природних умовах антагонізм такого типу частіше всього спостерігається в ґрунтовому середовищі ризосфери рослин, де між мікроорганізмами відбувається конкуренція за джерела живлення (кореневі екsudати). Отже, антагоністична активність досліджуваних морфотипів бактерій, що домінують у ризосфері ячменю ярого, проявлялась уже на третю добу досліду. І далі ми спостерігали збільшення впливу домінантних мікроорганізмів на обмеження росту і розвитку фітопатогенних мікроміцетів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у використанні корисних властивостей виділених домінантних ризосферних морфотипів, здійснено оцінку їх біологічної ефективності. Адже комплексні дослідження біологічної системи «рослина-грунт» є надзвичайно перспективними, особливо для пошуку нових універсальних агентів як основи біопрепаратів, розробки біотехнологічних аспектів формування рослинно-мікробних взаємодій в зернових агроценозах. Для цього проводили визначення ефективності інокуляції домінантними морфотипами бактерій ризосфери *P. ifriqiyense 1* та *B. velezensis 10* насіння ячменю ярого, оцінювали фізіологічні параметри росту і розвитку культури в модельних умовах. Мікробіологічний аналіз чисельності життєздатних колонієутворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл) суспензії здійснено за методом прямого підрахунку клітин у камері Горяєва. Мікроскопічні дослідження готових препаратів проводили за допомогою сучасної безокулярної системи візуалізації клітин EVOS FL. У лабораторному досліді експозиція насіння ячменю ярого в бактеріальних суспензіях штамів *P. ifriqiyense 1*, *B. velezensis 10* складала 5-7 хвилин за вихідного показнику титру $6,0 \times 10^7$ КУО/ мл суспензії та у розведенні 1:1. Тривалість модельного досліду - 10 діб, за умови постійного зволоження фільтрувального паперу у чашках Петрі. Для аналізу брали 10 рослин на варіант, повторність у досліді – триразова. Дослідження змін функціонального стану і активності фотосинтетичного апарату тест рослин ячменю виконували, застосовуючи біофізичний метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), фіксуючи дані портативним приладом вітчизняного виробництва «Флоратест» за загальноприйнятою методикою. В умовах модельного вегетаційного досліду встановлено, що штам *P. ifriqiyense 1* сприяв збільшенню довжини коренів на 84,3 % відносно контролю та на 42,2 % у варіанті з використанням штаму *B. velezensis 10*. Довжина проростків на відповідно 33,7 % та 16,0 % – без розведення. Встановлено, що обробка бактеріальними суспензіями *P. ifriqiyense 1* та *B. velezensis 10* сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що вперше була проведена комплексна оцінка мікробного біому ризосфери ячменю ярого. Були виділені і більш детально досліджені домінантні функціонально-значущі бактеріальні морфотипи ризосфери, їх фізіологічні та біохімічні властивості, спрямованість метаболічних процесів та антагоністична дія, біологічна ефективність впливу на початкових фазах онтогенезу рослин.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що ми тепер можемо оцінити застосовані агроприйоми з точки зору мікробіологічної складової, зробити комплексний виробничо-біолого-екологічний висновок відносно їх ефективності. А також запропонувати комплекси поєднання мікробних препаратів і агротехнічні системи вирощування сільськогосподарських культур.

Аналізуючи сучасні світові дослідження, можемо зробити висновок, що сучасне сільське господарство орієнтоване на біологізацію землеробства, перспективним напрямом підвищення урожайності сільськогосподарських культур є науково-обґрунтоване збільшення використання добрив на основі агромічно-цінних мікробних агентів і препаратів на їх основі. Виділені нами ізоляти ефективно взаємодіють з рослинами і формують ефективний біом в ризосфері ячменю ярого, при цьому враховуються особливості самої культури, ґрунту та еколого-кліматичних умов певної території. Так досліджені нами домінантні морфотипи вперше виділено саме з ризосфери ячменю ярого. Та знаючи їх морфологію та функціональну значущість, а саме: метаболічні шляхи вуглецевого живлення, антагоністичні властивості щодо фітопатогенних мікроміцетів, провівши їх філогенетичний аналіз та оцінку біологічної ефективності, можемо з впевненістю сказати, що дані штами заслуговують широкомасштабного використання як PGPR (ріст-стимулюючі ризобактерії). Тому наші дослідження мають виняткове значення, оскільки раніше мікроорганізми цих видів у нашій країні не використовувалися у складі біодобрив під ячмінь ярий.

Ключові слова: PGPR, ризосфера, домінантні морфотипи, *Bacillus velezensis* 10, *Phyllobacterium ifriqiyense* 1, антагоністична активність,

філогенетичний аналіз, біом ґрунтових мікроорганізмів, системи удобрення, вуглецеві джерела живлення, біологічна ефективність.

SUMMARY

Kiroiants M.O. **Formation of rhizospheric microbial biome of spring barley under different fertilization systems in typical chernozem.** - Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 201 “Agronomy”.
– National University of Life and Environment Sciences of Ukraine, Kyiv, 2022.

The dissertation presents the results of researches in 2017-2019 years in the formation of spring barley rhizosphere microbiota, selection of dominant microorganisms from the entire pool of rhizosphere bacteria, they were identified for further study of beneficial properties for growth induction and protection of spring barley plants from phytopathogens.

The microbial complex of chernozem, typical in the agrophytocenosis of spring barley, was studied, its qualitative and quantitative composition under different fertilization systems with local resources.

Studies of the influence of different fertilizer options on the formation of the microbial biome were conducted, based on the generally accepted technology of growing agricultural crops: control - without fertilizers; fertilizer $N_{45}P_{42}K_{55}$, by-products (3.0 t/ha) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, by-products (3.0 t/ha) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ and just by-products - 3.0 t/ha.

The selection and analysis of soil samples was carried out in the phase of flowering and waxy maturity of spring barley from the upper (0–20 cm) arable root-containing layer of the soil. The number of microorganisms of the main physiological and taxonomic groups was determined by the method of sowing soil suspensions on the appropriate elective nutrient media. A comparative assessment of the ecological indices of microbiota formation in typical black soil showed a significant relationship between Shannon's indicators of biodiversity and Simpson's dominance in different phases of the ontogenesis of spring barley. It was determined that the use of ecological and industrial farming systems makes it possible to optimize microbiological processes during the period of active vegetation of spring barley, which contributes to the creation of conditions for increasing the number of ammonifying bacteria by 2.6–3.7

times, oligonitrophilic bacteria by 1.6–2.4 times, which use mineral forms of nitrogen, 2.5–6.5 times spore-forming and 1.5 times cellulose-destroying microorganisms.

Comprehensive studies of metagenomic resources and the structure of prokaryotic diversity, which is formed in soils under various agricultural uses, were also conducted. The microbial biome and metagenome of the soil biocenosis determine the main functional role in the circulation of substances and energy and are key components of the transformation of organic remains, such as mineralization and immobilization of biogenic elements. The processes of synthesis and accumulation of organic matter in agrocenoses primarily depend on the structure, diversity and activity of microbiota, while it has a direct relationship with the conditions of the soil environment itself. Therefore, the study of the biome of soil microorganisms is the scientific basis for the development of measures aimed at the expanded reproduction of the fertility of chernozems. A study of the structure of the microbial complex and biodiversity of typical chernozem, changes in the domain of microbiota groups under the influence of cultivation systems and fertilization options was carried out using molecular biological methods. Extraction of total soil DNA, amplification of the 16S rRNA fragment of prokaryotes using a PCR reaction, and quantitative assessment of total DNA using a spectrophotometer were carried out. The taxonomic structure of prokaryotes was determined by the method of tRFLP terminal restriction fragment length polymorphism analysis, and the analysis of the obtained 16S rRNA fragments was performed in an automatic capillary sequencer CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA). Then, their nucleotide sequences were analyzed and their identity was compared with the corresponding 16S rRNA sequences of the GenBank database.

The diversity and trophically more complex structure of the phylotype structure of the soil bacterial microbocenosis after fertilization with by-products (3.0 t/ha) + N₄₅P₄₂K₅₅ was revealed. It is based on two main clusters of dominant genotypes belonging to representatives of 33 species, 54% of which are uncultivated. Under the option of by-products fertilization (3.0 t/ha) + N₆₀P₅₀K₆₅, the qualitative composition of the soil microbocenosis was characterized by three clusters and a species richness of

17 species, of which 76% were uncultivated. The qualitative composition of the dominant genotypes of prokaryotes is 3.1 times richer when using organo-mineral fertilizer with an average rate of mineral fertilizers compared to the control option. Fertilization systems significantly affect the phylotype diversity of soil microorganisms. Fertilization with by-products (3.0 t/ha) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ leads to differentiation in the number of dominant genotypes in different soil layers.

The study of the biome of soil microorganisms (especially dominant strains) is a scientific basis for the development of measures aimed at increasing the reproduction of chernozem fertility. Two dominant isolates of endophytic bacteria were isolated from the entire rhizosphere pool of spring barley in the central part of Ukraine. New isolates were evaluated by morphological and biochemical characteristics. Therefore, the aim of the work was to investigate and identify these important dominant strains of bacteria.

Morphological features of the dominant strains of rhizosphere microorganisms were studied using the EVOS FL Imaging System, 40x lens. Gram staining was also carried out. Physiological features were studied with the help of one of the most accurate methodological approaches in determining the physiological diversity of the association of soil microorganisms - the KB009 TM HiCarbo Kit test system regarding the utilization of carbon sources. And based on our study of carbon sources, Gram stain, microscopy and previous studies, and Bergey's classification, we concluded that the GPA-1 isolates belong to the genus *Phyllobacterium* and the GPA-7 isolates belong to the genus *Bacillus*.

Modern molecular biological methods open a wide perspective and new understanding of the phylogenetic and functional diversity of rhizosphere microbial communities. Further complex analysis makes it possible to evaluate the taxonomic and functional structure of the dominant strains of microorganisms using the selection of gene-specific primers and sequencing of full-length genomes. The main tool of phylogenetic research is the comparison of primary nucleotide sequences and sequential visualization of the results. The structure of the variable regions of the 16S rRNA gene is used as a phylogenetic marker. Bacterial DNA was isolated from the

bacterial cell suspension using the GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), according to the manufacturer's protocol. Amplification of the 16S rRNA gene was carried out with primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTTACGA CTT-3') at the following temperature regime: 95°C, 2 min; 30 cycles — 95°C, 30s; 55°C, 45s; 72°C, 90s; final elongation 72°C, 7 min. A 25 µl PCR mix contained 12.5 µl 2x DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 30 pmol of each primer, and 50ng of DNA. PCR was performed on a Mastercycler Personal 5332 amplifier (Eppendorf, Germany). PCR products were separated in a 1.7% agarose gel containing 0.01% ethidium bromide. The results were visualized in UV light. The resulting amplicon was ~ 1500 bp in size, excised from the gel and purified using the GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). DNA concentration was determined on a spectrophotometer DS-11FX+ (DeNovix, USA). The purified PCR product was sequenced in two directions on the device "Genetic Analyzer 3130" (Applied Biosystems, USA) using the set of reagents "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit". The obtained nucleotide sequence was compared with the data of the GenBank database using the NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Phylogenetic analysis, alignment of 16S rRNA nucleotide sequences of representatives of various species of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium* was carried out using the MEGA 10 program. A dendrogram of phylogenetic relationships was built using the Neighbor Joining method using the 2-parameter Kimura model with 1000 bootstrap replicates-analysis. The sequences of the 16S rRNA gene of reference cultures of bacteria of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium* were used from the GenBank database. As a result of the research, the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment of *Phyllobacterium ifriqiyense* strain 1 with a total length of 991 nucleotides and *Bacillus velezensis* strain 10 — 1126 nucleotides were obtained. The primary comparative analysis of the sequences of the studied strains with the sequences of the 16S rRNA gene deposited in the GenBank database revealed 99% similarity of the strains to the sequences of typical representatives of the respective species. Nucleotide sequences of *Phyllobacterium ifriqiyense* strain 1 are registered in the GenBank database under the

numbers MK947049 and MK947055, and *Bacillus velezensis* 10 - MK947050 and MK947056, respectively. It is known that these dominant rhizosphere microorganisms have a high degree of association with plants adapted to soil and climatic conditions. They are able to bind atmospheric nitrogen, stimulate the growth and development of plants, which ensures an increase in the productivity of grain crops. *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 strain of associative bacteria isolated from the apical part of barley roots turned out to be an active nitrogen fixer with the properties of stimulating the growth and development of spring barley plants. The isolated *Bacillus velezensis* 10 strains associated with the formation of the root system of plants has a positive effect on the morphometric parameters of spring barley.

The purpose of further work was to conduct research on the manifestation of antagonistic activity against phytopathogenic micromycetes by representatives of the bacterial biome dominating the rhizosphere of spring barley. Rhizosphere bacteria can exhibit high antagonistic activity against phytopathogenic microorganisms due to the synthesis of exometabolites of various chemical natures, as well as act as potential elicitors, with the help of which it is possible to control and reduce the level of damage by phytopathogens at the stages of plant ontogenesis. The study of the properties of highly active microorganisms as potential bioagents of drugs, particularly those with a protective effect for use in ecologically safe agrotechnologies, is one of the priority tasks of modern agroecology. The antagonistic effect of selected dominant rhizosphere bacteria *Bacillus velezensis* 10 and *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 was studied against phytopathogenic micromycetes *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch 18.77, provided from the collection of the V. F. Peresyphkin Department of Phytopathology of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Antagonistic properties were determined by the diffusion method of double culture in Petri dishes on glucose-peptone agar medium (HPA-Zvyagintseva). Zones of growth retardation were taken into account after 3 and 10 days of cultivation. The classic block method was used in the research. As a result of the research, it was established that the bacteria *Bacillus velezensis* 10 and *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 inhibited the growth of

phytopathogenic micromycetes *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – on 45.1% and 77.4%, respectively, test culture *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 63.1% and 66.6%, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 65.2% and 86.7%. *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 bacteria colonize the substrate more quickly and use nutrients accordingly, at the same time, micromycetes lose the ability to grow and do not have the ability to further colonize the substrate, a tendency to death is manifested. So, apparently, the revealed antagonistic activity is related to competition. Under natural conditions, this type of antagonism is most often observed in the soil environment of the rhizosphere of plants, where there is competition between microorganisms for food sources (root exudates). Therefore, the antagonistic activity of the studied bacterial strains dominating the rhizosphere of spring barley was manifested already on the third day of the experiment and strengthened its influence on the growth and development of phytopathogenic micromycetes throughout the experiment.

But in order to fully understand the importance and useful properties of selected dominant rhizosphere strains, an assessment of their biological effectiveness was carried out. After all, complex studies of the biological system "plant-soil-microbiota" are extremely promising, especially for the search for new universal agents of biological preparations, the development of biotechnological aspects of the formation of plant-microbial interactions in grain agrocenoses. To do this, we determined the effectiveness of inoculation of spring barley seeds with the dominant strains of rhizosphere bacteria *P. ifriqiyense* 1 and *B. velezensis* 10 and the physiological parameters of growth and development of the culture in model conditions. Microbiological analysis of the number of viable colony-forming units in 1 ml (CFU/ml) of the suspension was carried out by the method of direct cell counting in the Goryaev chamber. Microscopic studies of the finished preparations were carried out using a light microscope Sigeta MV-130, magnification 40x, immersion objective 90x, microscope "Axiostar plus", ICS, magnification 100x, in "living drop" preparations, as well as fixed preparations stained with fuchsin. The modern EVOS FL eyeless cell imaging system was used in the experiments. In a laboratory experiment,

the exposure of spring barley seeds in bacterial suspensions of *P. ifriqiyense 1*, *B. velezensis s 10* strains were 5-7 minutes at initial titer values of 6.0×10^7 CFU/ml of suspension and at a 1:1 dilution. The duration of the model experiment is 10 days, with constant moistening of filter paper in Petri dishes. For the analysis, biological repetition was taken - 10 plants per variant, repetition in the experiment - three times. The study of changes in the functional state and activity of the photosynthetic apparatus of test barley plants was carried out using the biophysical method of induction of chlorophyll fluorescence (ICF), recording data with a portable device "Floratest" according to the generally accepted method. In the conditions of the model vegetation experiment, it was found that the strain *P. ifriqiyense 1* increases the length of the roots by 84.3% compared to the control and by 42.2% in the variant using the strain *B. velezensis 10*. The length of the seedlings was respectively 33.7% and 16,0% - no dilution. It was established that treatment with bacterial suspensions of *P. ifriqiyense 1* and *B. velezensis 10* promotes the activation of the functions of the photosynthetic apparatus of barley plants in laboratory conditions.

The scientific novelty of the obtained results is that for the first time, a comprehensive assessment of rhizosphere microorganisms of spring barley was carried out. The dominant strains of the rhizosphere, their physiological and biochemical properties, the direction of metabolic processes and antagonistic action, the biological effectiveness of the influence on seed germination in the laboratory were isolated and studied in more detail.

The practical significance of the obtained results is that we can now evaluate the used agricultural methods from the point of view of microbiology, draw a conclusion and say how effective they are. And also make a proposal for the development of a microbiological preparation.

We can conclude, based on international studies of recent years, that in modern agriculture, focused on organic farming, one of the ways to increase the yield of agricultural crops is the wide use of fertilizers based on active strains of various microorganisms. And the dominant strains studied by us were first isolated from the rhizosphere of spring barley. But knowing their morphology, metabolic pathways of

carbon nutrition, antagonistic properties against phytopathogenic micromycetes, having conducted their phylogenetic analysis and assessment of biological efficiency, we can say with confidence that these strains deserve wide-scale use as PGPR. Therefore, our research is of exceptional importance, since microorganisms of these species have not previously been used in biofertilizers for spring barley in our country.

Key words: PGPR, rhizosphere, dominant strains, *Bacillus velezensis* 10, *Phyllobacterium ifriqiense* 1, antagonistic activity, phylogenetic analysis, biome of soil microorganisms, fertilization systems, carbon sources of nutrition.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у періодичних наукових виданнях,
включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України
та/або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних
Scopus та/або Web of Science Core Collection**

1. Патика М. В., Тонха О. Л., Патика Т. І., **Кіроянц М. О.**, Веретюк С. В. Оцінка метагеному прокаріотного комплексу чорнозему за аграрного використання. Мікробіологічний журнал. 2018. № 80 (6). С. 109–122. *(Патикою М. В. проведено аналіз метагеному прокаріотного комплексу, виділення та очищення ґрунтової ДНК, секвенування та ампліфікація зразків. Тонхою О. Л. побудовано дендрограми та філогенетичні дерева, проведено відповідні статистичні розрахунки. Патикою Т. І. сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень. Кіроянц М. О. узгоджено з рештою співавторів висновки, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання, здійснено корегування статті за рекомендаціями видавництва. Веретюком С. В. підготовлено список використаних джерел та проаналізовано сучасні видання).*

2. **Kiroiants M.**, Patyka M. The use of methods for identification and studying the functional features of the dominant rhizosphere microorganisms of the barley. The Annals of Oradea University, Biology Fascicle. 2023. Vol. 30 (1). P. 7–15. *(Kiroiants M. проведено аналіз на джерела вуглецевого живлення за допомогою сучасної системи HI CARbo KIT, проаналізовано та описано результати дослідження. Patyka M. здійснено ідентифікацію домінантних штамів за допомогою визначника Берджі, проведено контроль основних етапів дослідження).*

**Статті у наукових виданнях,
включених до Переліку наукових фахових видань України**

3. Кіроянц М. О. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого за різних систем землеробства. Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. 2019. Вип. 30. С. 39–48.

4. **Кіроянц М. О.,** Патика Т. І., Патика М. В. Філогенетичний аналіз домінантних мікроорганізмів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium*, ізольованих з ризосфери ячменю ярого. Вісник аграрної науки. 2020. № 5 (806). С. 48–53. *(Кіроянц М. О. проведено філогенетичний аналіз домінантних морфотипів. Патиною Т. І. опрацьовано наукові літературні джерела. Патиною М. В. проведено узагальнення отриманих експериментальних даних).*

5. **Кіроянц М. О.,** Патика Т. І., Патика М. В. Антагоністична активність бактерій, що домінують, ізольованих із ризосфери ячменю ярого щодо фітопатогенних мікроміцетів. Рослинництво та ґрунтознавство. 2021. Т. 12. № 2. С. 54–59. *(Кіроянц М. О. підготовлено поживні середовища та чисті культури домінантних штамів, проведено інокуляцію антагоністичних штамів блочним методом. Патиною М. В. проведено облік на 3 і 10 добу антагоністичної активності домінантних морфотипів, здійснено оцінку результатів. Патиною Т. І. проаналізовано та систематизовано результати досліджень).*

6. **Кіроянц М. О.,** Патика М. В., Патика Т. І. Оцінка біологічної ефективності перспективних домінантних штамів бактерій ризосфери ячменю ярого. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2021. № 1 (89). URL: <https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/14722> *(Кіроянц М. О. проведено підготовку препаратів жива крапля, мікроскопію зразків домінантних штамів у камері Горяєва. Патиною М. В. розроблено протокол дослідження, узагальнено результати, написано висновки. Патиною Т. І. проведено інокуляцію рослин домінантними штамами, вирощування та догляд за лабораторними зразками інокульованих рослин, облік параметрів росту інокульованих рослин).*

Тези наукових доповідей

7. Кіроянц М. О. Оценка функционально-значимых растительно-микробных взаимодействий ризосферы пшеницы яровой в агрофитоценозах чернозема типичного. Микробное биоразнообразие: актуальные проблемы и решения: Международная научно-практическая конференция, посвященная 25-летию Независимости Республики Казахстан. Астана, 2016. С. 199–201.

8. Патика М. В., **Кіроянц М. О.** Оцінка функціонально-значущих рослинно-мікробних взаємодій ризосфери ячменю ярого. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: V Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, 21 квітня 2017 року: тези доповіді. Центральне, 2017. С. 100. *(Патикою М. В. визначено мету та актуальність дослідження. Кіроянц М. О. підготовлено матеріал до друку).*

9. **Кіроянц М. О.**, Колодяжний О. Ю, Пшеничний С. Ю. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофитоценозі ячменю ярого. Цілі сталого розвитку третього тисячоліття: виклики для університетів наук про життя: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 23–25 травня 2018 року: тези доповіді. Київ, 2018. С. 35. *(Кіроянц М. О. проведено аналіз мікробного комплексу чорнозему типового. Колодяжним О. Ю. проведено відбір зразків ґрунту. Пшеничним С. Ю. проведено аналіз статистичних даних).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	25
ВСТУП	26
РОЗДІЛ 1 ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРИ ТА РІЗНОМАНІТТЯ МІКРОБІОТИ В АГРОЦЕНОЗІ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО, ЇЇ РОЛЬ У ГРУНТОУТВОРЕННІ	33
1.1. Роль ризосфери у формуванні мікробного біому агрофітоценозу ґрунту	33
1.2. Основні особливості рослинно-мікробних взаємодій	36
1.3. Вплив агротехнічних заходів на структуру та функціонування мікробних ценозів ґрунту	37
1.4. Значення мікроорганізмів у регулюванні ґрунтового- мікробних процесів при створенні високопродуктивних агроекосистем	45
1.5. Висновки до розділу	49
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	51
2.1. Методика проведення досліджень	51
2.3. Кліматичні умови проведення польового досліджу	54
2.4. Матеріали та методи дослідження	60
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ РІЗНИХ ВАРІАНТІВ УДОБРЕННЯ НА ФОРМУВАННЯ МІКРОБНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО В АГРОЦЕНОЗІ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО	75
3.1. Вивчення особливостей кількісного формування різних фізіологічних груп мікроорганізмів у чорноземі типовому за різних варіантів удобрення	77
3.2. Формування якісного складу мікробного комплексу ґрунту в ризосфері ячменю ярого	87
3.3. Визначення спрямованості мікробних процесів чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого	98

		23
	3.4. Визначення екологічних індексів спрямованості мікробних процесів на основі біорізноманіття мікробного комплексу чорнозему типового	104
	3.5. Висновки до розділу	107
РОЗДІЛ 4	ОЦІНКА МЕТАГЕНОМУ ПРОКАРІОТНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ЗА АГРАРНОГО ВИКОРИСТАННЯ	110
	4.1. Оцінка сучасної метагеноміки у збереженні родючості ґрунту	110
	4.2. Значення формування ризосфери біому та метагеному ризосфери ячменю ярого, вплив систем удобрення на генетичну різноманітність ґрунтових прокаріот	113
	4.3. Висновки до розділу	121
РОЗДІЛ 5	ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ДОМІНАНТНИХ МОРФОТИПІВ РИЗОСФЕРИ ЯЧМНЮ ЯРОГО	121
	5.1. Дослідження домінантних ризосферних мікроорганізмів як невід’ємний етап розвитку сучасного сільського господарства	115
	5.2. Визначення морфологічних, функціональних та біохімічних особливостей домінантних морфотипів ризосферних мікроорганізмів	123
	5.3. Значення молекулярної філогенетики як основи генетичної структури популяції екосистеми	127
	5.4. Визначення таксономічного положення домінантних ризосферних бактерій	130
	5.5. Висновки до розділу	134
РОЗДІЛ 6	ДОСЛІДЖЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДОМІНАНТНИХ МОРФОТИПІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ	136

	24
6.1. Дослідження антагоністичних властивостей домінантних штамів РРБ проти фітопатогенних мікроміцетів	137
6.2. Висновки до розділу	140
РОЗДІЛ 7 ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ ТА ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕРСПЕКТИВНИХ ДОМІНАНТНИХ МОРФОТИПІВ БАКТЕРІЙ РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО	142
7.1. РРБ як механізми різних біотичних процесів екосистеми ґрунту	143
7.2. Дослідження ефективності інокуляції насіння ячменю ярого домінантними морфотипами бактерій ризосфери	144
7.3. Економічне обґрунтування вирощування ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту	151
7.4. Висновки до розділу	157
ВИСНОВКИ	158
ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА	162
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	163
ДОДАТКИ	199

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PGPR – plant growth - promoting rhizobacteria

АТФ – адинозин трифосфорна кислота

МПА – м'ясо - пептонний агар

ГПА – глюкозо - пептонний агар

КАА – крохмально – аміачний агар

ГрА – ґрунтовий агар

ГА – голодний агар

КУО – колонієутворювальна одиниця

ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція

ІФХ – індукція флуоресценції хлорофілу

ВМ – важкі метали

ЗЗР – засоби зазисту рослин

ГТК – гідротермічний коефіцієнт зволоження

tRFLP - terminal restriction fragment length polymorphism

MSA - multiple sequence alignment

АВС – АТФ зв'язувальні касетні транспортери

МАТЕ – мультипереносник препаратів і токсинів екструзії

bp – base pair

pH – водневий показник

H – індекс біорізноманіття Шеннона

C – індекс біорізноманіття Сімпсона

ОНГЛ - орто-нітрофеніл-β-галактопираноза

ВСТУП

Актуальність теми. Мікроорганізми є основним визначальним ресурсом, який формує ґрунт та обумовлює його властивості. Важливою складовою біому ґрунту є мікробіота. Її роль визначається активною участю в метаболізмі органічних речовин, трансформацією та іммобілізацією біогенних елементів, які забезпечують життєдіяльність всіх трофічних ланцюгів біоценозу [11, 77].

Мікробний ценоз – це один із найскладніших і найрізноманітніших типів просторово-функціональної організації живих угруповань на Землі [18, 22, 65]. Мікроорганізми є основним джерелом генетичного різноманіття, яке об'єднує широку видову та функціональну варіабельність. Різноманіття мікробіоти має значно більшу історію еволюції, ніж рослин і тварин.

Кількість мікробних видів в ризосфері може коливатися від тисяч до мільйонів, і відповідно, взаємодія між кореневою системою і мікроорганізмами ґрунтів часто базується на коеволюційному тиску [108]. В ризосфері взаємодія рослин-мікроорганізмів відіграє важливу роль у низці життєво-важливих екосистемних процесів, таких як секвестрація вуглецю та цикл живлення біоти. Позитивні взаємодії між рослинами та мікробіотою включають симбіози рослинно-мікробних речовин, такі як рослинні асоціації з ріст-стимулюючими ризобактеріями рослин, епіфіти та мікоризні гриби. Показано, що ці взаємодії мають багато корисних впливів на рослини, включаючи підвищення резистентності до захворювань, збільшення доступності поживних речовин та їх поглинання, а також підвищення імунітету рослин до біотичних навантажень, що у результаті призводить до збільшення їх продуктивності [76]. У свою чергу, рослина забезпечує ґрунтову мікробіоту корневими ексудатами, які використовуються як субстрати та сигнальні молекули.

Завдяки складному видовому різноманіттю з відповідною ферментативною активністю, мікробіота відіграє виключно важливу роль у трансформації органічної матерії, процесах ґрунтоутворення та формуванні родючості ґрунтів [59].

Формування певного мікробного комплексу ґрунту, його структури та складу з відповідною функціональною активністю в значній мірі залежить від його типу, агрегатного складу, обумовленого аграрним використанням та особливостями вирощуваних сільськогосподарських культур [291].

Вивчення взаємодій між рослинами та їх мікробними спільнотами у ризосфері має важливе значення для розробки методів сталого управління виробництва сільськогосподарських продуктів, таких як біологічні добрива та біопестициди [12]. Коренева система продукує широкий спектр хімічних сполук для створення симбіотичних зв'язків з мікроорганізмами у ризосфері. У свою чергу, ці мікроорганізми, за допомогою різних механізмів (наприклад, продукуючи фітогормони, амінокислоти та вітаміни; або забезпечуючи доступ рослин до поживних речовин, чи проявляючи антагоністичну дію проти фітопатогенів), впливають на розвиток, ріст і здоров'я рослин.

Об'єктивним напрямом пошуку нових високоефективних, екологічно безпечних систем землеробства стала екологізація галузі, складовими якої є науково обґрунтовані ланки системи землеробства з раціональним використанням мікробної складової ґрунту [195]. Збереження гомеостазу біорізноманіття, оптимізація структури та текстури (закономірності розподілу чисельності та груп за горизонтами ґрунту) метагеному мікробного комплексу з метою підвищення продуктивності культурних рослин і збереження родючості ґрунтів є ключовою задачею при створенні стійких високопродуктивних агроєкосистем [102].

Ефективна взаємодія мікроорганізмів ризосфери є зазвичай синергічною. Вона відбувається на всіх рівнях, починаючи з молекулярного, та має велику екологічну значимість. Особливості мікробних угруповань ризосфери оцінюються згідно їх ефективної взаємодії в основному щодо сільськогосподарських культур. Дослідження рослинно-мікробних комплексів сфокусовані на агрономічно-значущих мікроорганізмах які можуть використовуватись у сільському господарстві для оптимізації до 70% росту та розвитку рослин, включаючи різні види симбіотичних фіксаторів азоту,

ризобактерії, стимулюючи ріст та розвиток рослин, організми, контролюючи поширення патогенів та бактерій [49].

Крім того, дослідження біорізноманіття та генетичного потенціалу ґрунтових мікроорганізмів має фундаментальне значення для розуміння біогеохімічних процесів ґрунтоутворення і являє значний інтерес для вирішення прикладних питань в мікробіології, екології, біотехнології, землеробстві та рослинництві [87].

На даний час залишаються малодослідженими питання щодо формування метагеному та філотипової структури прокаріотних комплексів ґрунтів за аграрного використання, що формуються під впливом різних агрозаходів з метою розкриття механізмів взаємодії між мікробоценозами та середовищем їх існування в системі ґрунт – мікроорганізми – рослина [65, 113].

Таким чином, розробка та використання інноваційних наукових біотехнологічних методів, що забезпечать підвищення врожайності культурних рослин є надзвичайно актуальним науковим питанням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

НДР МОН України № 110/99-Ф «Оцінка структури та різноманіття мікробного метагеному чорнозему типового та дослідження еколого-біологічних механізмів формування його функціональних особливостей», 2017-2019 рр. (факультет захисту рослин, біотехнологій та екології, кафедра екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України).

Мета і завдання досліджень. Метою досліджень було вивчити особливості формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого (сорт Себастьян). Провести порівняльну характеристику чисельності основних фізіологічних і таксономічних груп мікроорганізмів, аналіз якісного складу, структури та різноманіття мікробного комплексу чорнозему типового, що формується в онтогенезі ячменю ярого за різних систем удобрення ґрунту. Вивчити їх функціональну спрямованість біологічних процесів. Дослідити метагеном прокаріотного комплексу за аграрного використання, його значення у формуванні ризосфери. Провести

ідентифікацію функціональних особливостей домінантних морфотипів ризосфери ячменю ярого, визначити їх морфологічні, функціональні та біохімічні особливості. Проаналізувати філогенетичну належність домінантних морфотипів, їх антагоністичну активність та біологічну ефективність.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені наступні завдання:

- визначити основні агрохімічні властивості ґрунту та продуктивні показники ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту;
- оцінити чисельність мікроорганізмів, ґрунтового біорізноманіття та структуру якісного складу мікробного комплексу ризосфери чорнозему типового в основні фази росту та розвитку ячменю ярого за різних систем удобрення;
- визначити екологічні індекси домінування та мікробного різноманіття мікробного комплексу ґрунту за різних систем удобрення;
- дослідити вплив різних варіантів удобрення на спрямованість мікробних процесів чорнозему типового при вирощуванні ячменю ярого;
- оцінити метагеном прокаріотного комплексу чорнозему типового за аграрного використання;
- ідентифікувати основні особливості домінантних морфотипів ризосфери ячменю ярого, визначити їх метаболічні, структурні та функціональні особливості;
- провести філогенетичний аналіз домінантних мікроорганізмів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium*, ізольованих з ризосфери ячменю ярого;
- дослідити антагоністичну активність ризосферних домінантів ячменю ярого щодо фітопатогенних мікроміцетів
- оцінити економічну та біологічну ефективності перспективних домінантних морфотипів бактерій для їх подальшого використання як агентів PGPR.

Об'єкт дослідження – формування структури та різноманіття мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого та функціонально-значущі домінантні мікроорганізми, що впливають на ріст і

розвиток ячменю ярого, їх біохімічні, морфологічні та функціональні властивості.

Предмет дослідження – мікробіота чорнозему типового, що формується в основні фази росту та розвитку ячменю ярого у кореневмісному шарі ґрунту за різних систем удобрення.

Методи дослідження. Польові (відбір зразків ризосфери ячменю ярого у різні фази росту та за різних систем удобрення ґрунту); агрохімічні (визначення основних фізико-хімічних та агрохімічних показників ґрунту); морфологічні (вивчення структури, розмірів та форми виділених мікроорганізмів, таксономічний аналіз); фізіологічні (вивчення функцій та біохімічних процесів, які забезпечують життєдіяльність мікроорганізмів та їх взаємодія з рослинами); мікробіологічні (визначення чисельності основних фізіологічних груп та структури і якісного складу мікробного комплексу, спрямованості і функціонального значення мікробних процесів, аналіз антагоністичної активності виділених ізолятів); молекулярно-біологічні (визначення метабеномного складу та філотипової структури прокаріот мікробного комплексу); екологічні (порівняльна характеристика індексів біорізноманіття та домінування мікробіоти); порівняльно-розрахункові (оцінка економічної та біологічної ефективності); та статистичні (математична та статистична обробка експериментальних даних).

Наукова новизна одержаних результатів. З поєднаним використанням загальноприйнятих класичних мікробіологічних досліджень на поживних середовищах для вивчення фізіологічних груп мікроорганізмів, та молекулярно-біологічних методів - проведена комплексна оцінка особливостей формування структури та біорізноманіття мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого за різних систем удобрення ґрунту.

Уперше показано, що застосування побічної продукції (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ дає можливість оптимізувати мікробіологічні процеси в період активної вегетації ячменю ярого, що сприяє створенню умов для формування

більш складної філотипової структури та високого рівня біорізноманіття прокаріот чорнозему типового.

На основі дослідження з використанням одного з найточніших методичних підходів мультисубстратного тестування на джерела енергії вуглецю KB009 ТМ HiCarbo Kit (HiMedia), який має високу продуктивність та роздільну здатність, задовільну відтворюваність і служить високотехнологічним і ефективним інструментом оцінки фізіологічного різноманіття – була проведена ідентифікація та класифікація домінантних морфотипів ризосфери ячменю ярого.

На основі філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific) проведено визначення таксономічного положення домінантних мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого (штами *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 робочої колекції кафедри фітопатології імені академіка В. Ф. Пересипкіна НУБіП України). Ці штами вперше виділено саме з ризосфери ячменю ярого, та досліджено їх позитивний функціональний вплив на ріст і розвиток рослин. А також дані морфотипи показали високий ступінь антагоністичної активності проти фітопатогенів, що робить наше дослідження досить цікавим у призмі подальших експериментів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані про особливості формування кількісної, якісної структури мікробного комплексу та спрямованості мікробних процесів чорнозему типового мають практичне значення для аграрного виробництва, яке полягає у корегуванні агроприйомів, що використовуються. Також, знаючи властивості мікробіоти і використовуючи їх, ми можемо запропонувати основу для виробництва біопрепарату.

Досліджено науково-методичні підходи та біотехнологічні прийоми для удосконалення адаптивних методів удобрення при створенні стійких високопродуктивних агроєкосистем та управління ґрунтовою родючістю в цілому, з урахуванням наукового обґрунтування мікробних процесів.

Виділено штами домінуючих морфотипів аборигенної мікробіоти, які є перспективними для біотехнологічної селекції агентів біопрепаратів

сільськогосподарського призначення та отримання цільових продуктів мікробного синтезу.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота виконана автором і є самостійним науковим дослідженням. Автором особисто проведено аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури, проведено аналітичні, лабораторні та вегетаційні дослідження. Самостійно оброблено експериментальні дані, проаналізовано, систематизовано та узагальнено одержані результати, обґрунтовано теоретичні положення, підготовлено матеріали до публікацій. Планування роботи, аналіз результатів та формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи проведено здобувачем за участі наукового керівника, доктора сільськогосподарських наук, професора, академіка НААН, М. В. Патики.

Апробація результатів дисертації. Основні положення і результати дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: XV з'їзді товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського; Міжнародній науково-практичній конференції «Микробное биоразнообразие: актуальные проблемы и решения», присвяченій 25-річчю незалежності Республіки Казахстан; V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів (21 квітня 2017р., с. Центральне).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 9 наукових праць: 6 наукових статей, з яких 4 - у фахових виданнях України, 1 – у фахових виданнях України, що входять до міжнародних наукометричних баз, 1 – у міжнародному виданні країни ЕС; 3 матеріали тез доповідей наукових конференцій та з'їздів.

Обсяг та структура роботи. Дисертаційна робота у вигляді рукопису викладено на 203 сторінках комп'ютерного набору, що включає вступ, сім розділів, висновки та пропозиції виробництву, список використаних джерел літератури з 308 найменувань, додатки, містить 14 таблиць та 43 рисунки.

РОЗДІЛ 1.

ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРИ ТА РІЗНОМАНІТТЯ МІКРОБІОТИ В АГРОЦЕНОЗІ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО, ЇЇ РОЛЬ У ҐРУНТОУТВОРЕННІ

1.1. Роль ризосфери у формуванні мікробного біому агрофітоценозу ґрунту

Ґрунт є предметом багатьох наукових досліджень на сьогоднішній день. Найбільш активна частина ґрунту - ризосфера, в якій біогеохімічні процеси впливають на безліч процесів ландшафтного та глобального масштабів. Краще розуміння цих процесів має вирішальне значення для підтримки здоров'я планети та живлення організмів, що живуть на ній [1, 114]. Сучасні наукові дослідження спрямовані на використання потенціалу прикореневої частини ґрунту з метою збільшення потенціалу урожайності основних продовольчих культур, з метою задоволення прогнозованого подвоєння світового попиту на продукти харчування протягом наступних 50 років [123]. В умовах зміни глобального клімату та збільшення світового населення, що неминуче потребуватиме більшої кількості продуктів харчування та кормів при умовах вирощування на менш оптимальних (і часто безплідних) землях, вирішення глобальних проблем з кращим розумінням і контролем процесів ризосфери, стане одним із найважливіших наукових напрямків наступного десятиліття.

Ризосфера – прикоренева частина ґрунту, що характеризується різноманітністю функціональної активності біоти. Це активне середовище, що постійно змінюється та трансформується, де взаємодіють мікроорганізми, коріння рослин і абіотичні компоненти ґрунту - мінеральні та органічні речовини, ґрунтовий розчин і ґрунтові гази [162].

У 1904 році німецький агроном і фізіолог рослин Лоренц Хільтнер вперше для позначення прикореневої частини ґрунту використав термін "ризосфера", слово, що походить від грецького слова "rhiza", що означає корінь [178]. Хілтнер описував ризосферу як простір навколо коріння рослини, яка населена

унікальною кількістю мікроорганізмів, які, за його словами, мали вплив на хімічні речовини, які виділялися з коріння рослин.

В останні роки визначення ризосфери було уточнено, та почало в себе включати всі три прикореневі зони, які диференціюються відносної близькості до кореня та їх впливом на нього. Ризосфера поділяється на три такі зони: ендоризосфера, ризоплан і екторизосфера [194]. Ендоризосфера включає ділянки кори та ендодермію, в яких мікроорганізми і катіони можуть займати "вільне місце" між клітинами (апопластичний простір). Ризоплан - це медіальна зона, що безпосередньо прилягає до кореня, включаючи корінний епідерміс та слиз. Зовнішня зона - це екторизосфера, яка виходить з ризоплану у основну частину ґрунту.

Через властиву рослинам складність та різноманітність кореневих систем, ризосфера не є областю визначеного розміру чи форми, а, навпаки, складається з градієнта хімічних, біологічних та фізичних властивостей, які змінюються радіально і поздовжньо вздовж кореня.

Основою для формування і функціонування ризосфери, з одного боку, є рослина, яка постачає фотосінтати і органічні речовини у вигляді викидів та осаду, а з іншого - прикореневі мікроорганізми, що впливають на склад корневих виділень (ексудатів) і постачають доступні елементи живлення рослинам.

У ризосфері взаємодія між корінням рослин, ґрунтом та мікроорганізмами значно впливає на фізичні та хімічні параметри ґрунту, що, в свою чергу, змінює мікробну популяцію у ризосфері. Крім того, кореневі екsudати рослин мають велике значення для взаємодії між корінням рослин та мікроорганізмами у ризосфері. Корені виділяють 5% -21% фотосинтетично-зафіксованого вуглецю у вигляді розчинів цукрів, амінокислот або вторинних метаболітів, і вони використовуються мікробними спільнотами у ризосфері у якості джерел живлення [58].

Кореневі екsudати поділяються на два класи: сполуки низької молекулярної маси, такі як амінокислоти, органічні кислоти, цукри, фенольні

сполуки та інші вторинні метаболіти, а також високомолекулярні сполуки, такі як полісахариди та білки. Якісний і кількісний склад корневих ексудатів визначається сортом, видом рослин, стадією розвитку рослини та різними факторами навколишнього середовища, включаючи тип ґрунту, рН, температуру та наявність мікроорганізмів [276]. Ці відмінності створюють популяції мікроорганізмів які населяють ризосферу. Вони володіють певним ступенем специфічності для кожного виду рослин.

Рослини використовують різні транспортні механізми для транспортування та виділення сполук у ризосферу. Як правило, кореневі ексудати можуть виділятися корінням рослин за допомогою пасивних (дифузних), або активних (секреційних) механізмів. Більшість органічних сполук із низькою молекулярною масою виділяються з рослин дифузійно. Малі полярні та незаряджені молекули транспортуються шляхом прямої пасивної дифузії, процес, який залежить від проникності мембрани, полярності виділених сполук та цитозольного водневого показника (рН).

Кореневі клітини рослин виділяють інші сполуки, такі як вторинні метаболіти, полісахариди та білки за допомогою різних мембранних білків. Ці транспортні білки включають в себе, АТФ-зв'язувальні касетні транспортери (ABC), ряд мультипереносників токсинів екструзії (MATE), та ряд алюміній-активованих транспортерів малату. Незважаючи на те, що механізм дії цих транспортних білків, пов'язаних із мембраною, ще не досконало вивчені, їх прийнято пов'язувати з транспортуванням широкого спектру сполук у ризосфері.

Кнапп та ін. виявили, що 25 ABC генів транспортерів були значно гіперекспресовані у коріннях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. і грали важливу роль у цих секреторних процесах [62]. Крім транспортерів ABC, MATE також є активними транспортними засобами, які експортують широкий діапазон субстратів через мембрани, використовуючи електрохімічний градієнт інших іонів. Багато генів MATE, що відіграють роль у експорті різних сполук, таких як рослинні алкалоїди, токсичні сполуки, антибіотики, цитратні аніони та фенольні

сполуки, отримані з кореневих клітин, були ідентифіковані та охарактеризовані у арабідобсисі, сорго, ячмені та рисі.

1.2. Основні особливості рослинно-мікробних взаємодій

Ризодепозити роблять ризосферу бажаною нішею для розмноження мікробних спільнот. Одна чайна ложка ґрунту містить більше мікроорганізмів, ніж є людей на Землі, однак, ризосфера може мати в 1000-2000 разів більшу таку кількість, що робить її густонаселеним шаром ґрунту [3]. Кількість наявних живильних речовин для росту мікроорганізмів у верхньому шарі ризосфери більша, порівняно з нижніми шарами ґрунту [8]. Однак, багато мікроорганізмів конкурують за ці поживні речовини, деякі - більш успішно, ніж інші. Рослинно-мікробні взаємодії, які викликають найбільшу увагу у науковців – взаємодії бактерій *Rhizobia* та їх симбіотичних партнерів рослин, асоціації мікоризних грибів та ріст-стимулюючих ризобактерій рослин (PGPR), які сприяють росту та розвитку рослин.

Ріст-стимулюючі ризобактерії (PGPR)

Ріст-стимулюючі ризобактерії були вперше описані Клоєппером і Шротом як організми, які після інокуляції насіння могли успішно колонізувати коріння рослин і позитивно впливати на ріст рослин [122, 163]. Стимуляція росту рослин може спостерігатись безпосередньо на рослині за відсутності корневих патогенів шляхом вивільнення речовин, які стимулюють ріст рослин (наприклад, фітогормони, такі як ауксини або цитокініни) та покращення мінерального поглинання (наприклад, збільшення кількості доступного Fe) [171]. Стимуляція росту рослин може також відбуватися побічно, шляхом боротьби з патогенними мікроорганізмами (біоконтроль) шляхом синтезу антибіотиків або індукованої системної резистентності [218].

Мікробна колонізація поверхні кореню рослин не є однорідною, та трапляється частинами вздовж кореня, що в кінцевому підсумку охоплює ~ 15-40% від загальної поверхні коренів рослин. Щільність і структура мікробних

угруповань на поверхні кореня продиктовані наявністю поживних речовин та фізико-хімічними варіаціями по всій поверхні кореня [275]. Кореневі екsudати можуть служити джерелом живлення та хемоатрактантами для мікробів, які потім прикріплюються до поверхні кореня та утворюють мікроколонії. Зазвичай, такі місця для прикріплення і колонізації бактерій знаходяться в епідермальних клітинах, корінних волосків, клітин зовнішніх шарів кореня та місцях проростання бічних корінців. Мікроколонії можуть в кінцевому підсумку перетворюватися на більші біоплівки, що складаються з декількох шарів бактерій, які укладаються в екзополімерну матрицю. У багатьох випадках ефективність ризобактерій у сприянні росту залежить від щільності угруповань цих мікроколоній [296]. Після досягнення критичної мікробної щільності біоплівки починають діяти в унісон у процесі, відомому як кворум, який координує вивільнення сполук, що сприяє росту та розвитку рослин за допомогою прямого та непрямого механізму, зазначеного раніше.

1.3. Вплив агротехнічних заходів на структуру та функціонування мікробних ценозів ґрунту

Для оптимізації життєдіяльності ґрунтових мікроорганізмів у сучасних агроценозах необхідно проводити вивчення впливу антропогенних чинників на ґрунтову мікробіоту [6, 34]. Особливості формування структури та різноманіття мікроорганізмів ґрунту, яке визначає функціональну спрямованість мікробних процесів в агроценозах, значною мірою залежать від агротехнічних заходів (внесення органічних і мінеральних добрив, різних систем обробітку ґрунту, застосування регуляторів росту рослин, хімічних і біологічних засобів захисту рослин від хвороб, шкідників і бур'янів, меліорації і зрошення земель), які застосовуються при вирощуванні тієї чи іншої сільськогосподарської культури [101, 109]. Аналіз мікробного біорізноманіття ґрунтів, що знаходяться під антропогенним впливом, дозволяє кількісно оцінити можливий шкідливий вплив антропогенної діяльності на особливості формування структури мікробіому

[161]. Швидка відповідь мікробного біорізноманіття на фактори впливу також може бути використана для моніторингу результатів біоре mediaції забруднених ґрунтів.

Під системою землеробства слід розуміти науково обґрунтований комплекс взаємопов'язаних агротехнічних, меліоративних, ґрунтозахисних природоохоронних та організаційно-економічних заходів, які забезпечують раціональне й ефективне використання ґрунту, біологічного потенціалу рослин та вирощування високих і сталих урожаїв сільськогосподарських культур, збереження й підвищення родючості ґрунтів [177]. Кожен елемент системи землеробства впливає на чисельність та співвідношення фізіологічних груп мікроорганізмів, таксономічне й функціональне різноманіття, спрямованість мікробних процесів. Мікробні угруповання цілинних земель мають розгалужену сталу систему функціональних зв'язків, яка забезпечує рівновагу процесів синтезу і деструкції гумусу, а також збалансоване співвідношення між групами мікроорганізмів, які входять до складу мікробного угруповання, тобто між автотрофними і гетеротрофними, зимогенними й автохтонними мікроорганізмами.

За умов інтенсивного землекористування спостерігається спалах життєдіяльності мікроорганізмів і зсув рівноваги у бік переважного розвитку мікроорганізмів, які беруть участь у мінералізаційних процесах [278]. В умовах інтенсивного землеробства потрібно враховувати проблему мікробної трансформації азоту у ґрунті. Важливо приймати до уваги фізіологічну активність мікроорганізмів, які здійснюють такі процеси, як амоніфікація, нітрифікація, азотфіксація, денітрифікація [261]. Недостатня увага до мікробіологічного фактору трансформації азоту значною мірою призводить до низької ефективності використання мінеральних азотних добрив, що, в свою чергу, стало причиною надмірного накопичення нітратів в рослинній продукції та забруднення біосфери окисами азоту [306, 308].

Невід'ємним елементом кожної системи землеробства є система удобрення. Вплив мінеральних добрив на ґрунтову мікробіоту залежить від дози

і виду добрив, вирощуваної культури, типу ґрунту, метеорологічних умов та ін. Багато авторів вважають, що азотні добрива стимулюють мікробне руйнування ґрунтових азотовмісних органічних сполук. У той час наголошується, що азот, іммобілізований в мікробній біомасі, надалі мінералізується значно швидше, ніж ґрунтові органічні сполуки. У дерново-підзолистих ґрунтах істотні зміни в мікробіологічних угрупованнях викликає внесення навіть невисоких доз мінеральних добрив ($N_{60}P_{60}K_{60}$), в той час як на більш родючих чорноземних ґрунтах вплив таких доз несуттєвий. При одноразовому внесенні низьких і помірних доз мінеральних добрив негативного впливу на мікробіом не виявляється. Однак він проявляється після тривалого застосування. Так, разове внесення мінеральних добрив у нормі 1000 кг/га викликає такий же ефект, як і систематичне по 100 кг/га протягом 30 років. Несприятливий вплив мінеральних добрив на мікроорганізми, як правило, пояснюється тим, що відбувається підкислення середовища [302]. Найбільше порушується мікробне угруповання ґрунту в осередку при локальному способі внесення мінеральних добрив.

Дослідженнями Pushpakumara та ін. (2023) встановлено, що у більшості випадків застосування мінеральних добрив у помірних дозах позитивно впливає на розвиток мікроорганізмів і активність мікробних процесів, а підвищені дози ($N_{120}P_{180}K_{270}$ і більше) часто пригнічують активність фіксації азоту, нітрифікації, розкладу важкорозчинних фосфатів і целюлози; у той же час зростають швидкості денітрифікації і деструкції гумусу. Застосування азотних добрив знижує як симбіотичну, так і асоціативну азотфіксацію [210]. Встановлено, що внесення навіть 30 кг/га азоту знижувало симбіотичну фіксацію на 44 – 87 кг/га.

В інших дослідженнях описуються дані про зниження інтенсивності асоціативної азотфіксації за внесення мінерального азоту в нормі 60 і більше кг/га. Застосування мінеральних добрив призводить до видозміни складу мікробоценозу, відбувається його істотний перерозподіл. При систематичному внесенні азотних добрив у ґрунті активізуються денітрифікатори. Активізація цих бактерій є головною причиною утворення рухомих сполук азоту та вимивання їх у водні об'єкти. З цієї ж причини прискорюється утворення

газоподібних сполук азоту, які забруднюють атмосферу. Одним із проявів негативного впливу мінеральних добрив через зміну структури мікроценозу є порушення метабіозу (виникнення трофічних зв'язків між бактеріями). При тривалому систематичному використанні азотних добрив дуже сильно збільшується чисельність бактерій, здатних засвоювати його мінеральні форми. Але при цьому в малоактивний стан переходять інші групи, що докорінно змінює целюлозолітичні, нітрифікуючі, денітрифікуючі та інші властивості ґрунту.

Фосфорні добрива меншою мірою впливають на співвідношення бактерій циклу азоту, проте вони пригнічують фосфатазну активність мікроорганізмів, а також гальмують процес вивільнення фосфору з його нерозчинних мінеральних сполук. Ще одним негативним наслідком впливу застосування високих доз мінеральних добрив на структуру мікробіоценозу є погіршення фітосанітарного стану ґрунтів. Наприклад, розповсюдження коренових гнилей злакових культур пов'язують із застосуванням високих доз технічного азоту. В умовах застосування високих доз мінеральних добрив збільшується кількість фітопатогенних і токсиноутворюючих мікроміцетів.

Мінеральні добрива є основним джерелом забруднення ґрунтів важкими металами і токсичними елементами. Це пов'язано з вмістом в сировині для виробництва мінеральних добрив стронцію, урану, цинку, свинцю, ванадію, кадмію, лантаноїдів та інших хімічних елементів. Невеликі концентрації важких металів можуть стимулювати розвиток тих чи інших мікроорганізмів. При підвищенні концентрації ВМ виникає їх токсичний ефект. Встановлено, що токсична дія на мікроорганізми виявляється в пригніченні їх метаболізму, зміні кінетики росту та морфології: проростання спор, ріст міцелію, товщину міцелію, ріст конідій, накопичення біомаси мікроорганізмів в цілому. Встановлено, що вони впливають на загальну чисельність, видовий склад та активність ґрунтової мікробіоти. У значній мірі стійкими до забруднення виявляються целюлозоруйнівні бактерії, що використовують мінеральний азот. Збільшення чисельності при забрудненні ґрунту ВМ характерно для мікроміцетів.

Відтворення органічної речовини в ґрунтах є показником адаптивності технологій вирощування сільськогосподарських культур до місцевих ґрунтово-кліматичних умов агроландшафтів. Застосування органічних добрив є частиною загальних заходів, направлених на використання відтворюваних ресурсів і дозволяють повернути в господарсько-біологічний кругообіг землеробства органічну речовину та елементи живлення, що винесені з урожаєм. Більшість дослідників відзначають позитивний вплив органічних добрив як на мікробіоту, так і на процеси гумусоутворення. Збільшення загальної біомаси та чисельності мікроорганізмів спостерігається як при внесенні гною, так і при заорюванні зеленої маси рослин (сидерації) або сухих рослинних решток (соломи). Встановлено, що заорювання у ґрунт фітомаси рапсу ярого і кореневих решток буркуну білого сприяє формуванню міцної трофічної структури мікробіологічних угруповань. У попередніх дослідженнях показано, що загальна біогенність ґрунту при використанні органічної речовини ріпаку зростала на 16 – 69%, а озимого жита – на 9 – 46%. Збільшення кількості бактерій, що використовують органічні форми азоту на 21 – 42%, мінеральні форми азоту на 20 – 60%, целюлозолітиків на 17 – 30%, вказує на протікання процесу мінералізації органічної речовини.

Вплив пестицидів на мікробіоту ґрунту багато в чому схожий за наслідками на результат при використанні мінеральних добрив. Отрутохімікатам властива більш жорстка дія на живі організми. Як правило, навіть одноразове їх застосування викликає хоча і оборотні, але суттєві зміни в діяльності різних груп мікробіому. Дані вивчення впливу пестицидів на мікробну клітину свідчать, що ці сполуки викликають різні ушкодження клітинних мембран і порушують їх проникність, знижують активність таких ферментів як АТФ-аза, цитохромоксидаза, нітрогеназа. У більшості випадків при застосуванні засобів хімічного захисту рослин можливе тимчасове пригнічення чисельності певних видів або груп мікроорганізмів із наступним їх відновленням. Багаторічне внесення гербіцидів спричиняє зменшення накопичення мікробної біомаси та збіднення видового різноманіття бактерій і грибів. Один і той же гербіцид

проявляє неоднаковий вплив на окремі групи мікроорганізмів. Негативна дія особливо помітна при багаторазовому або комбінованому застосуванні пестицидів. Зростання чисельності окремих більш стійких груп мікроорганізмів під впливом пестицидів відбувається в результаті загибелі конкуруючих з ними популяцій, як наслідок, поліпшення живлення за рахунок відмерлих ґрунтових організмів.

Відносно стійкими до дії пестицидів вважаються органоетеротрофні, педотрофні, оліготрофні, целюлозоруйнівні мікроорганізми. Більш чутливими є нітрифікуючі, вільноживучі азотфіксуючі та бульбочкові бактерії. Ряд пестицидів – атразин, симазин, політріазин, семерон є генетично небезпечними для ґрунтових мікроорганізмів. Ґрунт, який систематично обробляється гербіцидами (лінуроном, атразином, аліроksom, ацетазином), характеризується мутагенним фоном, що у 10 – 20 разів перевищує частоту спонтанних мутацій тест-мікроорганізмів [105].

Не менш важливим аспектом взаємодії мікроорганізмів і пестицидів є трансформація цих сполук мікроорганізмами-деструкторами. Роль мікробіому в цьому процесі оцінюється в межах 10 – 70%. При мікробіологічній деструкції отрутохімкатів у ґрунті можливе утворення хімічних речовин, токсичність яких вище вихідних сполук. Гербіцид 2,4-Д розкладають бактерії – представники родів *Flavobacterium*, *Nocardia*, симазин – гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, а також бактерії родів *Arthrobacter*, *Flavobacterium*. Описана також здатність представників роду *Pseudomonas* розкласти пестицид іпрардин, представників родів *Flavobacterium* та *Arthrobacter* – інсектициди [4]. Чим більший вміст мікробної біомаси у ґрунті, тим швидше відбувається деструкція внесених пестицидів. Повна деструкція пестициду однією, навіть активною культурою, практично не відбувається. Для ефективного розкладу цих сполук необхідні мікробні угруповання, що характеризуються різноманітним видовим складом. Отже, при тривалому застосуванні пестицидів відбувається перерозподіл мікробіологічних угруповань із переважним розвитком

мікроорганізмів, стійких до внесених сполук і здатних до утилізації цих речовин і їх аналогів.

Важливим елементом систем землеробства, що впливає на структуру та різноманіття мікробних комплексів ґрунту, є сівозміння. Монокультура призводить до ефекту «ґрунтовтоми», пригнічення росту рослин та негативно впливає на мікробіоту ґрунту. Дані свідчать, що при вирощуванні пшениці беззмінно збільшується кількість мікроміцетів та актиноміцетів при одночасному зниженні чисельності артробактерій та бактерій, що використовують мінеральні форми азоту. Відбувається підвищення чисельності оліготрофів з низькою ферментативною активністю

Встановлено, що при насиченні сівозміни до 50% однією культурою, наприклад льоном-довгунцем, спостерігаються істотні зміни у складі ґрунтової мікробіоти. При цьому в ґрунті зменшується біомаса мікроорганізмів, знижується кількість бацил, азотфіксаторів і целюлозоруйнівних мікроорганізмів, а також біологічна активність ґрунту [157]. Мобілізаційні процеси в ґрунті при чергуванні рослин протікають більш інтенсивно, ніж при насиченні сівозміни льоном-довгунцем. Беззмінні культури призводять до формування і накопичення в ґрунті грибів – продуцентів фітотоксинів, що обумовлює збільшення фітотоксичності ґрунтів, зниження продуктивності і загибель рослин. Використання молекулярно-біологічних методів дозволило встановити, що сукупна маса прокаріот в беззмінних посівах сільськогосподарських культур знижується. Беззмінна культура рослин призводить до збіднення генетичних ресурсів мікробіому ґрунту і корінної зміни його якісного складу, що пов'язано зі зниженням стійкості рослин до природних та антропогенних стресів [36]. В умовах сівозміни біомаса прокаріот зростає майже на порядок. Чергування сільськогосподарських культур в ланці сівозміни обумовлює видове оновлення мікробоценозів.

Формування відповідного мікробного комплексу з певною функціональною активністю, що приймає участь в трансформації органічної речовини, в значній мірі залежить від способів обробітку та агрегатного складу

грунту. Різний розмір ґрунтових часточок, нерівномірний розподіл поживних речовин, неоднорідність фізико-хімічних параметрів створюють умови для розвитку мікроорганізмів мікроосередками [206]. Особливо зростає значення обробітку ґрунту під час внесення добрив та меліорації. Роль обробітку ґрунту є важливою при біологізації землеробства, оскільки оптимальне забезпечення рослин поживними речовинами передбачається не за рахунок додаткового внесення мінеральних добрив, а завдяки створенню сприятливих умов для мікробних процесів мінералізації органічної речовини [188].

Шари ґрунту за глибиною різняться як за кількісним, так і за якісним складом мікроорганізмів. Як правило, верхній шар (0 – 2 см) підлягає висушуванню, інсоляції і є менш населеним мікроорганізмами. Під ним знаходиться шар, у якому краще зберігається волога, він більш насичений коренями рослин, які виділяють екsudати, тому кількість мікроорганізмів значно зростає [121]. Способи обробітку ґрунту впливають на чисельність мікроорганізмів. За умов мінімального обробітку рештки рослин на поверхні ґрунту та коренева маса зосереджуються у верхньому шарі (0 – 10 см). Мінімальний обробіток ґрунту сприяє підвищенню чисельності евтрофного мікробіому у шарі ґрунту 0 – 10 см порівняно з варіантами обробітку на глибину 25 – 30 см. Проте у більш глибоких шарах ґрунту (20 – 30 см) спостерігається протилежна закономірність – чисельність мікроорганізмів удвічі менше, ніж на варіантах з мінімальним обробітком. Накопичення свіжих рослинних залишків у верхньому шарі ґрунту за таких умов сприяє розвитку амоніфікуючих, амілолітичних, целюлозоруйнівних мікроорганізмів.

Мікробна сукцесія при трансформації рослинних залишків за умов безполицевого обробітку стає подібною до тієї, яка формується у цілинному ґрунті. Чисельність амоніфікуючих мікроорганізмів у шарі 0 – 40 см після оранки є вищою, ніж за плоскорізного обробітку на ту ж саму глибину. У шарі 0 – 10 см, навпаки, їх виявляється більше у варіанті плоскорізного обробітку. Після оранки спостерігається підвищення кількості нітрифікуючих мікроорганізмів у шарі ґрунту 0 – 40 см. Розвиток автохтонних мікроорганізмів,

які беруть участь у розкладі гумусових сполук, у верхньому шарі ґрунту при оранці відбувається більш активно, ніж при мінімальному і плоскорізному обробітку. Показано, що чисельність азотфіксаторів в орному шарі (0 – 20 см) є більшою при оранці, а в підорному шарі (30 – 40 см), навпаки, перевага за плоскорізним обробітком. Встановлено, що чисельність облигатних аеробів (нітрифікуючих бактерій) при оранці є істотно вищою, ніж при мінімальному обробітку. Кількість анаеробних (денітрифікуючих) мікроорганізмів у шарі 20 – 30 см підвищується при безплужному обробітку ґрунту.

Розробка ефективних і екологічно збалансованих агротехнологій тісно пов'язана з вивченням питання про раціональне об'єднання систем обробітку ґрунту і його удобрення. Наприклад, поєднання безполицевого обробітку з внесенням органічних добрив сприяє підвищенню активності мікробіологічних угруповань ґрунту, збільшує їх стійкість і інтегрованість, сприяє формуванню міцної структури трофічних зв'язків [160]. Отже, агротехнології біологічного землеробства сприяють утворенню міцної структури трофічних зв'язків у мікробних угрупованнях, підвищують їх інтегрованість і стійкість до несприятливих факторів. За умов біологічного землеробства у ґрунті активізуються процеси новоутворення гумінових кислот. Це підвищує реакційну здатність і біологічну активність гумусових сполук, сприяє депонуванню енергії та поживних речовин, що позитивно відображається на гомеостазі та різноманітті мікробіологічних угруповань ґрунту [166].

1.4. Значення мікроорганізмів у регулюванні ґрунтово-мікробних процесів при створенні високопродуктивних агроєкосистем

Значення ґрунтової мікробіології в сучасному ґрунтознавстві постійно підвищується в зв'язку з відкриттям нових екологічних функцій ґрунтової біоти. Розкривається її роль у процесах, що протікають у ґрунтах, їх біосферних функціях, у підтримці гомеостазу ґрунтових вод та атмосфери. Першочерговим завданням для розуміння механізмів взаємодії компонентів ґрунтової мікробіоти

та управління ґрунтовими процесами є дослідження біорізноманіття та структури мікробіологічних ценозів [35].

Науково обґрунтоване врахування та функціональне спрямування мікробіологічних факторів у землеробстві є основою для підвищення потенційної та ефективної родючості ґрунтів. Важливими мікробними процесами в кругообігу азоту є мінералізація азотовмісних органічних сполук та іммобілізація мінерального азоту. У процесі мінералізації азот органічних сполук переходить в мінеральний, що доступний для рослин. Мінералізація органічних сполук складається з процесів амоніфікації та нітрифікації. При наявності в ґрунті свіжого органічного матеріалу амоніфікуюча мікробіота стає найчисленнішою і найрізноманітнішою. Інтенсивність розкладу різних органічних азотовмісних сполук залежить, в першу чергу, від їх стійкості до мікробного впливу. Кількість аміаку, що вивільняється в процесі амоніфікації, визначається не тільки запасом органічного азоту, доступністю його для мікроорганізмів, а й від вмісту в субстраті вуглецю. При розкладанні кожних 100 г органічної речовини рослинних залишків (або в середньому 50 г вуглецю) амоніфікатори на синтез білка своїх клітин використовують приблизно 2 г ґрунтового азоту [64]. Так, виділення аміаку буде відбуватися при співвідношенні $C:N < 25:1$. Не вивільняється аміак при наявності в ґрунті безазотистих сполук, що слугують мікробіому джерелом вуглецю та енергії. Іммобілізація мінерального азоту являє собою трансформацію аміаку та нітратів в азот органічних сполук мікробних клітин та їх метаболітів. Даний процес здійснюють всі мікроорганізми, що здатні засвоювати аміачний, нітритний та нітратний азот. Найбільше значення при цьому має гетеротрофна мікробіота.

Особливо значна роль у процесах іммобілізації належить пліснявим грибам, целюлозоруйнуючим бактеріям, а також неспоровому мікробіому, що колонізує не тільки зону ризосфери, але й ґрунт віддалений від коренів [107, 208]. Максимум іммобілізації може бути досягнутий на перших 4 – 6 тижнях, а в деяких випадках навіть на 2 – 6 день розкладу рослинних решток. Під посівами найбільш інтенсивне закріплення азоту відбувається в перші 3 – 5 тижнів

вегетації рослин. Процеси іммобілізації азоту при внесенні соломи або целюлози в ґрунт проходять менш енергійно. У цьому випадку максимум закріплення мінерального азоту досягається пізніше, на 30 – 60 день. Інтенсивність та швидкість даного процесу у різних типах ґрунтів різна та залежить також від вмісту NPK в ґрунті. Поглинання мікроорганізмами певної кількості аміаку та нітратів супроводжується збільшенням їх чисельності та акумуляцією в ґрунті мікробної біомаси.

Іммобілізації піддається значна кількість азоту мінеральних добрив. Так, у польових умовах при використанні рослинами 30 – 40% азоту мінеральних добрив, іммобілізований азот в ґрунті може скласти 30 – 50% від внесеної кількості. У вегетаційних дослідках при використанні рослинами близько 60% азоту добрив, в органічній речовині ґрунту виявляється до 20% внесеного азоту. Поглинання мікроорганізмами мінерального азоту є однією з найбільш важливих сторін конкуренції між ними та рослинами за поживні речовини. При внесенні в ґрунт вуглеводів, що легко трансформуються, значно підсилюється використання ними мінерального азоту. Дослідження показали, що при внесенні в ґрунт целюлози та сахарози чисельність мікроорганізмів, що використовують азот збільшується в десятки й сотні разів. У зв'язку з тим, що процеси іммобілізації значно скорочують втрати мінерального азоту, їм відводиться значна роль в азотному балансі ґрунту.

Важливу роль у формуванні ґрунтової родючості та продуктивних показників рослин відіграють мікроорганізми, що здатні зв'язувати молекулярний азот повітря [223]. Кількість азоту, що фіксується бульбочковими бактеріями щорічно складає 2 млн т, що відповідає 9,5 млн т сульфату амонію. Приблизно 1,5 млн т атмосферного азоту засвоюється вільноживучими (асоціативними) азотфіксаторами. Мікробіологічне зв'язування молекулярного азоту – це єдиний шлях постачання рослинам азоту, що не впливає на порушення природного середовища. Здатністю до азотфіксації володіють багато мікроорганізмів: бульбочкові бактерії (симбіотичні азотфіксатори) – роди *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium*; вільноживучі бактерії

(асоціативна азотфіксація) – *Azotobacter*, *Clostridium*; ціанобактерії, мікобактерії, мікроміцети.

Важливе місце у сучасному природокористуванні займають процеси біологічного перетворення фосфору. Коефіцієнт використання фосфору сільськогосподарськими рослинами не перевищує 25 %, переважна кількість його фіксується в ґрунті, перетворюючись на важкодоступні для рослин форми. Багато мікроорганізмів мають потенційну здатність перетворювати фосфати ґрунту в засвоювану для рослин форму. Органічні сполуки фосфору розкладаються бактеріями роду *Pseudomonas*, *Bacillus*, грибами з родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, деякими стрептоміцетами, дріжджами та іншими бактеріями [262]. При розкладі органічних речовин мікроорганізмами, вони фіксують у своїх клітинах певну кількість фосфору, що міститься в цих речовинах. Тому внесення в ґрунт органічних сполук, надто бідних фосфором, наприклад соломи, може викликати біологічне закріплення фосфатів і пов'язане з цим фосфорне голодування рослин. Багато мікроорганізмів можуть перетворювати нерозчинні сполуки фосфорної кислоти у розчинний стан. До них належать бактерії, стрептоміцети родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micobacterium*, *Penicillium*, *Aspergillus* та ін. Створюючи сприятливі умови для розвитку фосфатмобілізуючих бактерій, можна підвищити ефективність використання фосфатів з ґрунту і добрив. Важливе місце у вирішенні даної проблеми належить ендомікоризі [303].

У сучасних умовах землеробства важливою є також можливість пригнічення мікробних процесів. Але це виявляється більш складною проблемою, ніж їх інтенсифікація. Вона частково вирішується по відношенню до певних груп мікроорганізмів: нітрифікаторів та денітрифікаторів. Деякі вчені вважають, що для збереження органічної речовини ґрунту, ймовірно, було б доцільно пригнічувати активність мікроміцетів. Оскільки гриби являються основним утилізатором органічних речовин у ґрунті, та зниження їхньої активності повинно досить сильно впливати на затримку швидкості розкладу органічних сполук. Але практичні результати в даному напрямі незначні.

Перспективною є розробка методів, що дозволяють регулювати кількість популяцій ґрунтових мікроорганізмів. Отже, маючи уявлення про вплив факторів на інтенсивність, швидкість та спрямованість мікробних процесів у ґрунті, можливо створювати умови, що стимулюють чи навпаки пригнічують той чи інший мікробний процес, і, таким чином, приймати участь в управлінні мікробними процесами, що визначають поживний режим ґрунту. Це є основою для науково обґрунтованого управління ґрунтово-мікробними процесами при створенні стійких високопродуктивних агроєкосистем [155]. Знаючи функціональні властивості та фізіологічні потреби мікробіоти можливо корегувати мікробні процеси в ґрунті за допомогою внесення в нього відповідних асоціацій чи консорціумів мікроорганізмів.

1.5. Висновки до розділу

За результатами проведеного науково-теоретичного аналізу досліджень вітчизняних та зарубіжних вчених ще раз доведена роль мікроорганізмів у функціонуванні ґрунту, охарактеризовано екологічні особливості ризосферних мікроорганізмів, вплив різних факторів на формування просторової та функціональної структури мікробних угруповань. Встановлено, що мікробні ценози ґрунту мають складну генетичну та просторову організацію і відносяться до одних з найбільш багатих за біорізноманіттям [224]. Структура і біорізноманіття ґрунтової мікробіоти в агроценозах в значній мірі піддається формуванню в залежності від використовуваних систем обробітку ґрунту, агротехнічних заходів та особливостей вирощуваної сільськогосподарської культури.

Вивчення біорізноманіття та просторово-функціональної структури мікробного комплексу має важливе значення для розуміння механізмів у системі ґрунт – мікроорганізми – рослина [196]. У зв'язку з цим, важливим завданням ґрунтової мікробіології є об'єктивна, комплексна характеристика мікробного біому чорноземних ґрунтів з метою раціонального використання

мікробіологічних факторів у сучасному землеробстві. Поєднання класичних і молекулярно-біологічних методів вивчення ґрунтової мікробіоти дає можливість розширити наші знання про генетичні ресурси і структуру мікробних комплексів, що формується в умовах довготривалого сільськогосподарського використання земель, та дозволяє розробляти заходи із збереження гомеостазу біорізноманіття. Оптимізація структури і текстури метагеному мікробного комплексу сприяє підвищенню продуктивності культурних рослин та збереженню родючості ґрунтів, що є ключовим завданням при створенні стійких високопродуктивних агроєкосистем [214]. Науково обґрунтоване управління ґрунтово-мікробними процесами є основою для біотехнологій із удосконалення систем землеробства при створенні стійких агроєкосистем та управління ґрунтовою родючістю в цілому.

РОЗДІЛ 2

ОБ’ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методика проведення досліджень

Дослідження проводились у Панфільській дослідній станції ННЦ «Інститут землеробства НААН», яка розміщена у Лівобережному Лісостепу у стаціонарному польовому досліді з вивчення агробіологічних основ підвищення ефективності короткоротаційних зернових і зерно-просапних сівозмін.

Ґрунт дослідної ділянки — чорнозем типовий неглибокий крупнопилувато-легкосуглинковий на карбонатному легкосуглинковому лесі. Будову профілю наведено нижче.

Таблиця 2.1.

Будова ґрунтового профілю

Н (к) (0-43 см)	Темно-сірий, пилувато-легкосуглинковий у верхній частині (0-8 см) більш світлий, розпилений, нижче дрібногрудкувато-зернистий, слабоущільнений. З глибини 30-35 см помітні окремі плями вицвіти карбонату кальцію; перехід поступовий як за кольором, так і за будовою.
Нрк 43-74 см	Темно-сірий з брудно-пальовим відтінком, пилувато-легкосуглинковий, грудкуватий; багато кротовин і черворийн, карбонати кальцію у формі псевдоміцелію по ходу коріння, особливо на глибині 60-70 см; перехід поступовий за забарвленням.
Phk 74-116 см	Брудно-палево-сірий, гумусованість плямиста, легкосуглинковий, комковато-зерниста, грудкувата, старі кротовини, по ходу коріння помітний наліт карбонату кальцію; перехід поступовий.
Рк >116 см	Палевий карбонатний легкосуглинковий лес.

У верхньому шарі чорнозему типового малогумусного вміст гумусу становить 3,08 - 3,15%, у підорному шарі – від 2,72 до 2,90% (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

**Фізико-хімічні та агрохімічні показники чорнозему типового пилувато-
легкосуглинкового**

Показники	Верхній гумусовий горизонт, см	
	0-30	30-50
рН водної витяжки	6,8 ± 0,15	7,5 ± 0,15
рН сольової витяжки	6,4 ± 0,15	-
Сума увібраних основ, мг-екв/100 г ґрунту	28,0 ± 2,8	-
Ємність катіонного обміну, мг-екв/100 г ґрунту	29,8± 2,7	31,5 ± 3,0
Загальний гумус, %	3,15 ± 0,06	2,72 ± 0,08
Азот легкогідролізованих сполук за Тюрнімом і Кононовою, мг/кг ґрунту	49,6 ± 10,41	44,2 ± 9,28
P ₂ O ₅ за Чиріковим (Мачигінім), мг/кг ґрунту	123 ± 13,1	21,8 ± 2,2
K ₂ O за Чиріковим (Мачигінім), мг /кг ґрунту	69 ± 7,1	206 ± 23

Загалом ґрунт характеризується сприятливими фізико-хімічними та агрохімічними показниками для росту сільськогосподарських культур [256].

Вміст гумусу в орному шарі ґрунту 2,15%, рН сольової витяжки – 6,4; ємність поглинання – 29,8 мг. –екв. на 100 г ґрунту. Польова вологоємність цього ґрунту в шарі 0 – 30 см складає 28,2 %, вологість розриву капілярів – 19,7 %, максимальна гігроскопічність – 7,46 %, недоступна для рослин вологість – 10 %, загальна щільність у рівноважному стані – 52 – 55% [78, 216, 249].

За вмістом легкогідролізованого азоту ґрунт дослідне поле відноситься до малозабезпеченого (за Кононовою – 49,6 мг на кг ґрунту), рухомого фосфору і обмінного калію – підвищена і середня забезпеченість.

Вивчення динаміки сталості чи мінливості корового біому мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого проводили в короткоротаційній сівозміні з таким чергуванням культур: ріпак - пшениця озима - кукурудза на зерно - ячмінь ярий (табл.2.3).

Таблиця 2.3

Схема стаціонарного дослідів (2017-2019 рр.)

Варіант сівозміни	Чергування й удобрення культур у сівозміні				На 1 га ріллі вноситься:			
	I	II	III	IV	Побічна продукція попередника, т	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
1	2	3	4	5	7	8	9	10
1	ріпак	пшениця озима	кукурудза	ячмінь ярий	-	-	-	-
2	ріпак N ₀ P ₃₀ K ₄₀	пшениця озима N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	кукурудза N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀	ячмінь ярий N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀	-	45	42	55
3	ріпак N ₀ P ₃₀ K ₄₀	пшениця озима N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	кукурудза N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀ 12 т/га соломи	ячмінь ярий N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀	3	45	42	55
4	ріпак озимий N ₆₀ P ₆₀ K ₈₀	пшениця озима N ₆₀ P ₆₀ K ₆₀	кукурудза N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀ 12 т/га соломи	ячмінь ярий N ₆₀ P ₄₀ K ₆₀	3	60	50	65
5	ріпак	пшениця озима	кукурудза на зерно 12 т/га	ячмінь ярий	3	-		

У системі удобрення використовували місцеві ресурси – побічна продукція попередника та мінеральні добрива. Досліджували такі варіанти удобрення:

- 1) Контроль – без добрив
- 2) N₄₅P₄₂K₅₅
- 3) Побічна продукція (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅
- 4) Побічна продукція (3,0 т/га) + N₆₀P₅₀K₆₅
- 5) Побічна продукція (3,0 т/га)

Внесення побічної продукції проводили у полі після збирання кукурудзи на зерно. Побічна продукція – тобто рослинні рештки попередника, які

залишаються після збирання урожаю, подрібнюються комбайнами та рівномірно розкидаються по полю. Кількість побічної продукції середня за 3 роки досліджень, то розраховувалась математично як % від зібраного урожаю кукурудзи. Розміщення варіантів проводили методом розщеплених ділянок. Повторення досліду триразове. Посівна площа однієї ділянки – 90 м² (6×15 м), облікова – 40 м². Розміщення ділянок – систематичне. Технологія вирощування сільськогосподарських культур у досліді загальноприйнята і рекомендована для зони проведення досліджень. Система обробітку – традиційна глибока зяблева оранка. Система захисту рослин від шкідників, хвороб та бур'янів сільськогосподарських культур була загальним фоном в розрізі культур і років.

Досліджували сорт ячменю ярого – Себастьян. Це інтенсивний датський ярий сорт, який дає стабільний високий урожай і адаптований для вирощування в Україні з 2008 року. Виведений методом схрещування, різновид – putans. Себастьян відрізняється високим кущенням і стійкістю до посухи, добре переносить ранні заморозки, має інтенсивний ріст на початку вегетації, добре реагує на внесення мінеральних добрив. Відноситься до найбільш перспективних сортів ячменю пивоварного напрямку.

2.2. Кліматичні умови проведення польового дослід

За даними спостережень Яготинської метеорологічної станції (м. Яготин), середня річна температура повітря становить 7,3 °С, середня багаторічна кількість опадів – 442 мм і варіює від 250 до 670 мм, відносна вологість повітря – 78%, середня тривалість вегетаційного періоду – 202 дні. Мінімальна температура повітря сягає – -37 °С, максимальна – +39 °С. Зима нестійка: холодні періоди чергуються з відлигами, що іноді обумовлює утворення притертої льодової кірки, яка є причиною часткової, а інколи і повної загибелі посівів озимих культур.

Сніговий покрив зберігається протягом 109 днів, початок його стійкого утворення припадає на першу декаду грудня, а середня дата танення снігу – 10 березня. У березні і квітні середня добова температура повітря стрімко змінюється від 1,1 °С до 7,8 °С, що несприятливо позначається на посівах озимих культур. Таке підвищення температури у весняний період часто супроводжується суховіями, які спричиняють погіршення умов для сівби і початку росту ярих культур. Різке підвищення температури повітря протягом червня-липня в окремі роки призводить до зниження врожайності зернових колосових культур.

У цілому погодні умови за роки досліджень формувалися у відповідності зазначеному агрокліматичному району, але кожен рік мав свої певні особливості з формування температурного режиму, вологозабезпеченості та коефіцієнта зволоження за Івановим.

У роки проведення досліджень погодні умови суттєво відрізнялися, що впливало на формування мікробної складової ґрунту у різні фази росту та розвитку ячменю ярого [233, 274].

З метою аналізу впливу погодних чинників на процес формування урожайності ячменю ярого нами визначався коефіцієнти суттєвості відхилень суми опадів та середніх добових температур від багаторічних даних (формула 1) [238]. Визначення коефіцієнтів суттєвості відхилення дає змогу класифікувати місяці та роки щодо сприятливості умов для розвитку рослин. Коефіцієнт суттєвості відхилень показників агрометеорологічного режиму років проведення польових досліджень від середніх багаторічних розраховували за формулою:

$$K_c = \frac{(X_i - \bar{X})}{\sigma}$$

де K_c – коефіцієнт суттєвості відхилень; X_i – показники поточної погоди; $\bar{X}$ – середня багаторічна величина; σ – середнє квадратичне відхилення.

Рівень коефіцієнтів суттєвості відхилень визначали за градацією: $K_c = 0-1$ – умови, близькі до звичайних; $K_c = 1-2$ – умови, що сильно відрізняються від середніх багаторічних; $K_c > 2$ – умови, наближені до рідкісних.

Погодні умови 2016 року не характеризувалися різкими змінами температурного режиму та відхиленнями від середніх багаторічних (рис. 2.1). Так, на період сівби ввесняний період характеризувався теплими та більш сухими умовами, що, можливо, трохи негативно вплинуло на відновлення активності мікробіоти ґрунту. Квітень характеризувався теж посушливістю, і кількість опадів була меншою на 40% за середні багаторічні дані. А температура була нижчою від середньобагаторічних даних майже на 1°C . Травень був трохи прохолоднішим, а кількість опадів була також досить низькою, і становила 68% від середньобагаторічних даних [247]. Середньомісячна температура була на рівні $14,5^{\circ}\text{C}$. Коефіцієнт суттєвості відхилення при цьому склав $-0,7$.

Температура повітря літніх місяців була незначно вищою за багаторічні показники. Червень місяць був не таким вологим, сумарна кількість опадів становила 42 мм, при середніх багаторічних показниках в 73мм. Кінець вегетації ячменю ярого припав на досить стабільний період. Середньомісячна температура липня становила $19,9^{\circ}\text{C}$. Опадів випало 83мм, що становило 98% від норми. Це сприяло нормальному вегетаційному періоду рослин та своєчасний перехід до фази стиглості [257].

Коефіцієнт суттєвості відхилень (K_c) опадів у вересні при цьому склав $-0,1$ (рис. 2.2). Жовтень був трохи прохолоднішим, порівняно з середніми багаторічними даними, але опадів випало вдвічі більше, коефіцієнт відхилень кількості опадів був 1,4.

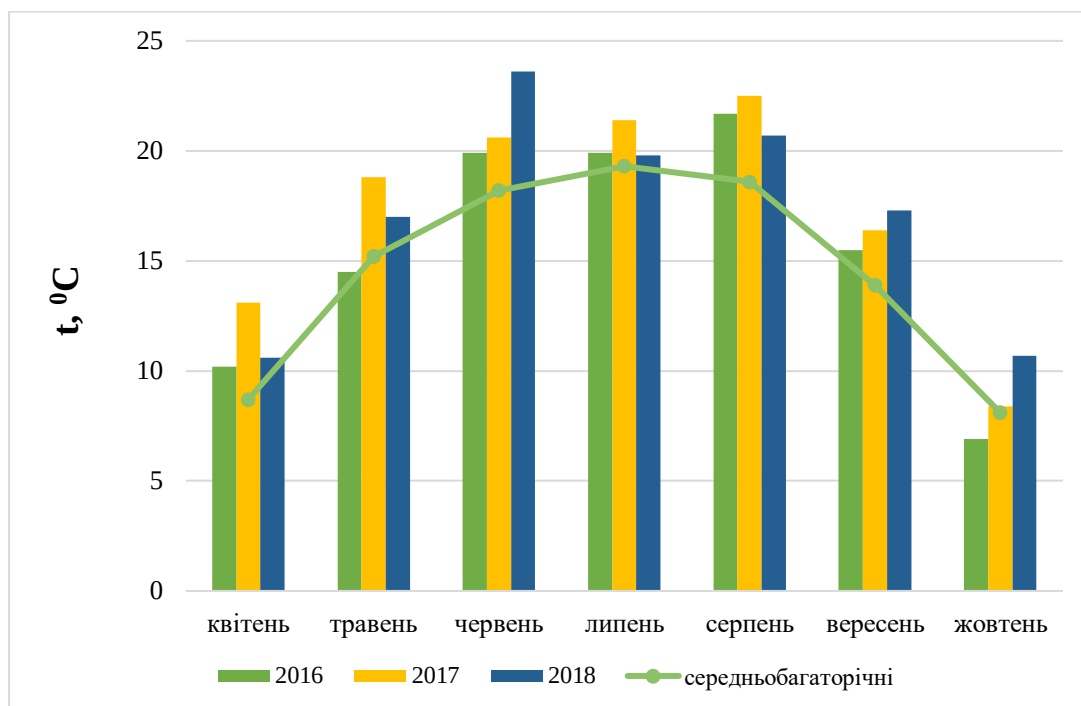


Рис. 2.1. Температура повітря за період проведення польового дослід, °C

У 2017 році початок весни характеризувався аномальними снігопадами та зниженням середньомісячної температури в березні до $-1,9^{\circ}\text{C}$. Сумарна кількість опадів склала 68 мм, що на 75% перевищило середні багаторічні дані. Квітень характеризувався значним підвищенням температури та сильною посушливістю. Температура збільшилась на $4,5^{\circ}\text{C}$ від норми, а кількість опадів навпаки зменшилась в 5,5 разів. Травень та червень відзначалися теплою та вологою погодою, середньомісячні температури перевищували багаторічну норму в середньому на $2,5^{\circ}\text{C}$. У травні кількість опадів була вдвічі меншою за норму, та становила 27мм. Сумарна кількість опадів за червень була майже такою ж, як і середньобагаторічні показники. Дані умови значно прискорили вегетаційний процес рослин та скоротили протікання основних фаз росту та розвитку ячменю ярого. Слід зазначити, що досить висока температура та значно підвищена вологість встановилася у липні. За даний період випало більше на 16 % опадів від норми. Середньомісячна температура липня та серпня склала $21,4^{\circ}\text{C}$ та $22,5^{\circ}\text{C}$ з максимальними значеннями $28,9^{\circ}\text{C}$ та $30,4^{\circ}\text{C}$ відповідно. Дані погодні умови призвели до швидкого дозрівання зернових культур та порівняно ранніх зборів урожаю.

Погодні умови осіннього періоду характеризувалися незначним відхиленням від багаторічних даних. Середньомісячна температура повітря (рис. 2.2) вересня та жовтня була на $2,5^{\circ}\text{C}$ та $0,3^{\circ}\text{C}$ відповідно вищою за середню багаторічну. При цьому максимуми температур були зафіксовані на рівні $25,4^{\circ}\text{C}$ та $26,1^{\circ}\text{C}$. Кількість вологи у вересні на 32 % була меншою від середньої багаторічної. Жовтень був також недостатньо вологим, з сумою опадів 22 мм, що майже в 1,5 рази менше за середню багаторічну.

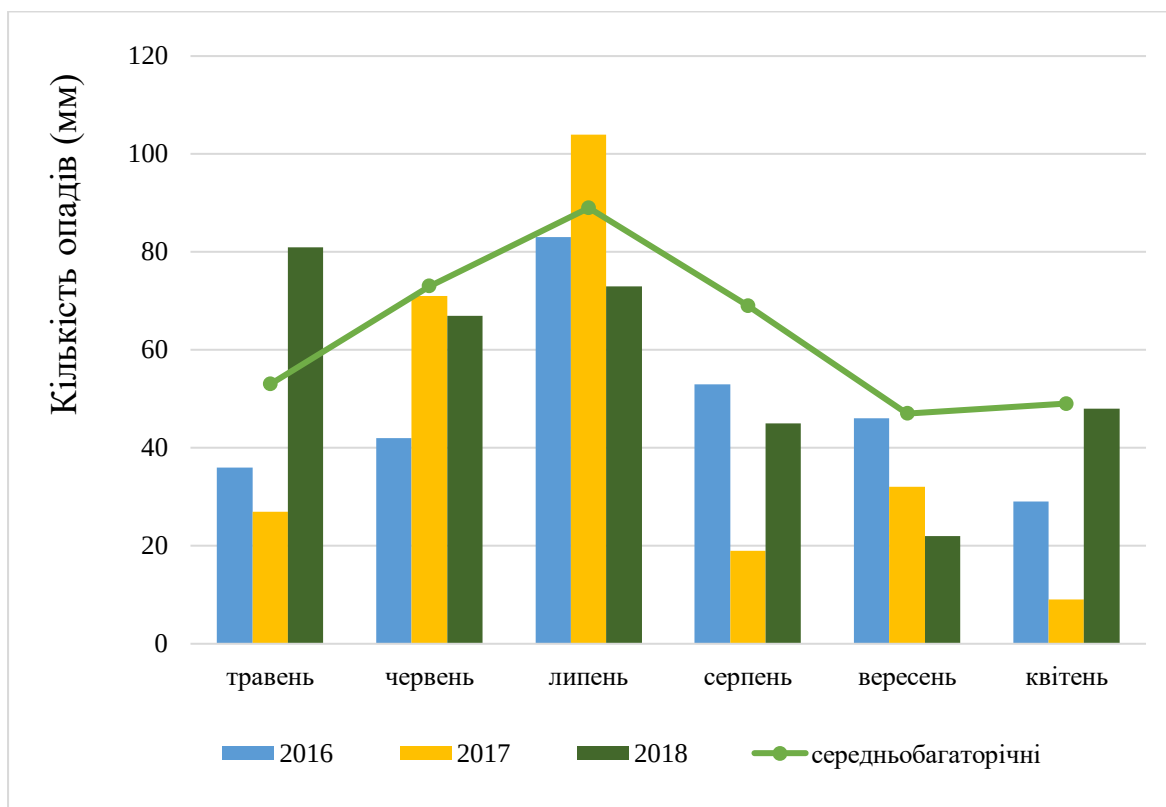


Рис. 2.2. Кількість опадів за період проведення польового дослідження

мм

Таким чином, погодні умови 2017 року в цілому можна вважати аномальними та нетиповими умовами для даної зони. Така ситуація негативно вплинула на вирощування рослин та ґрунтово-мікробіологічні процеси, що супроводжували ріст і розвиток ячменю ярого.

Весняний період 2018 року був сприятливим. Середня температура повітря березня становила $5,1^{\circ}\text{C}$, що у 3 рази перевищувало середньобагаторічні дані. Максимальна температура становила $16,9^{\circ}\text{C}$. Квітень був достатньо теплим та вологим із середньомісячною температурою $10,6^{\circ}\text{C}$ та кількістю опадів 48 мм.

Спостерігалось суттєве підвищення температури до 17°C у травні. Місяць характеризувався значною кількістю опадів (81 мм), що у 1,5 рази перевищувала середню багаторічну.

Літо 2018 року було жарким, особливо червень місяць, максимальні температури в якому становили $32,5^{\circ}\text{C}$. Кількість опадів була нижчою у всі літні місяці. Серпень характеризувався посушливістю, кількість опадів була на 45 % нижчою за середню багаторічну.

В осінньому періоді характеризувались підвищеними значеннями від середніх багаторічних. Середньомісячна температура вересня була на $3,4^{\circ}\text{C}$ вищою за середню багаторічну і становила $17,3^{\circ}\text{C}$. При цьому максимум був на рівні $24,4^{\circ}\text{C}$, а мінімум – $5,2^{\circ}\text{C}$. Місяць характеризувався низькою вологістю, оскільки кількість опадів була у 2 рази нижчою за середні багаторічні дані. Жовтень був відносно теплим з середньомісячною температурою $10,7^{\circ}\text{C}$ та досить посушливим з сумою опадів 13 мм.

Таким чином, метеорологічні умови у період з травня 2016 року по серпень 2019 року були характерними для даної зони з незначними відхиленнями від середньобагаторічних даних.

2.3. Матеріали та методи дослідження

Методи польових досліджень.

Відбір ґрунтових зразків проводили в основні фази онтогенезу ячменю ярого (цвітіння, молочно-воскова стиглість) з верхнього (0 – 20 см) орного кореневмісного горизонту методом конверту з 5-ти точок у 3-х повтореннях згідно ДСТУ ISO 10381–1:2004.

Методи агрохімічних досліджень

Визначення вологості ґрунту проводили гравіметричним методом згідно ДСТУ ISO 11465:1993. Гранулометричний склад ґрунту (%), досліджували згідно ГОСТ 12536. Визначення рН водної витяжки проводили згідно ГОСТ 26423 ДСТУ ISO 10390; рН сольової витяжки - ГОСТ 26483. Гідролітична кислотність (мгекв/100 г) ґрунту визначали згідно ГОСТ 26212. Суму увібраних основ (мекв/100 г) ґрунту - ДСТУ ISO 11260. Визначення групового складу гумусу (%) за методом Тюріна у модифікації Кононової та Бельчикової проводили згідно ДСТУ 7855:2015. Азот легкогідролізованих сполук визначали за Тюріним і Кононовою (мг/кг) ґрунту. Визначення рухомих сполук фосфору і калію проводили за модифікованим методом Чирикова (мг/кг) ґрунту згідно ДСТУ 4115-2002.

Методи мікробіологічних досліджень.

Для визначення чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп використовували наважки ґрунту по 10 г, з яких готували суспензії відповідних 10-ти кратних розведень [189].

Чисельність амоніфікувальних та спороутворюючих бактерій визначали висівом розведеної ґрунтової досліджуваної суспензії на м'ясо-пептонний агар (МПА).

Загальну кількість мікроорганізмів, які здатні використовувати мінеральні форми азоту, та актиноміцети виявляли на крохмально-аміачному агарі (КАА).

Чисельність азотфіксаторів визначали на середовищі Ешбі.

Кількість педотрофних та оліготрофних мікроорганізмів виявляли на ґрунтовому агарі (ГрА) та голодному агарі (ГА) відповідно.

Облік чисельності целюлозоруйнівних мікроорганізмів проводили на середовищі Гетчинсона.

Чисельність мікроміцетів визначали шляхом глибинного висіву ґрунтової суспензії на середовище Чапека з додаванням стрептоміцину.

Результати чисельності мікроорганізмів представляли кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 г абсолютно сухого ґрунту (КУО/г) [111].

Вивчення структури якісного складу бактеріальної та грибної мікробіоти ґрунту проводили на твердих поживних середовищах Звягінцева (ГПА) та Чапека шляхом опису морфолого-культуральних ознак колоній мікроорганізмів [97].

Для оцінки структури бактеріального та грибного ценозу використовували наступні показники:

1) частота трапляння, $\% = (n \times 100) / N$, де:

n – кількість чашок, де виявлено морфотип; N – загальна кількість чашок.

2) насиченість виду, $\% = (a \times 100) / A$, де:

a – кількість колоній певного морфотипу; A – загальна кількість колоній.

За даними показниками виділяли наступні групи видів мікроорганізмів: домінанти ($> 10\%$), субдомінанти ($5 - 10\%$), часто трапляються ($1 - 5\%$), випадкові ($< 1\%$).

Виділення домінуючих морфотипів в чисту культуру здійснювали на поживні середовища Звягінцева (бактерії), КАА (стрептоміцети), Чапека (мікроміцети) відповідно до загальноприйнятих методик [86].

Спрямованість мікробних процесів ґрунту визначали за допомогою наступних коефіцієнтів:

- коефіцієнт мінералізації-іммобілізації азоту розраховували за співвідношенням кількості мікроорганізмів, що засвоюють мінеральний і органічний азот

- коефіцієнт педотрофності – як співвідношення чисельності педотрофних мікроорганізмів (ГрА) та амоніфікувальних мікроорганізмів (МПА)
- коефіцієнт оліготрофності – як співвідношення оліготрофів та сумарної кількості мікроорганізмів на МПА і КАА
- коефіцієнт трансформації органічної речовини за співвідношенням суми колоній на МПА + КАА та коефіцієнтом мінералізації.

Оцінка екологічних параметрів мікробного комплексу ґрунту проводилась за допомогою індексів біорізноманіття Шеннона (H) та домінування Сімпсона (C):

- індекс різноманіття Шеннона

$$H = \sum P_i \times \log_2 P_i, \text{ де:}$$

P_i – міра значимості кожного виду;

індекс домінування Сімпсона

$$C = S (P_i/S)^2, \text{ де}$$

P_i – міра значимості кожного виду;

N – сума оцінок значимості;

P – кількість видів.

Морфологічні особливості домінантних морфотипів ризосфери були досліджені за допомогою системи візуалізації EVOS FL Imaging System, 40x lens. Це новітня та потужна система візуалізації клітин з високою роздільною здатністю.

Виконано також фарбування за Грамом (або метод Грама) — емпірично виведений метод розрізнення бактерій за допомогою фарбування їх певним методом на дві великі групи: Грам-позитивні і Грам-негативні, що розрізняються за хімічними та фізичними властивостями їх клітинної стінки [137].

Аналіз антагоністичної активності домінантних морфотипів. При аналізі антагоністичної активності використано ідентифіковані та класифіковані морфотипи мікроорганізмів, що домінують – *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiense* 1 (GenBank MK947056, MK947049). Штами фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch 18.77 (рис.

2.4), надані з колекції кафедри фітопатології ім. академіка В. Ф. Пересипкіна НУБіП України.

Fusarium sporotrichioides є патогенним мікроміцетом рослин, одним із різновиду *Fusarium*, що призводить до ураження сільськогосподарських культур, зокрема спричиняє стан, відомий як фузаріозний фітофтороз колоса у пшениці та ячменю, отже, має важливе сільськогосподарське значення.

Alternaria alternata — мікроміцет роду *Alternaria*. Вид є широко відомим сапрофітом (розкладачем) органічних речовин у ґрунті. Крім того, він може проявляти себе як паразит на численних дикорослих і культурних рослинах. Як збудник хвороб він особливо небезпечний, наприклад, для картоплі (хвороба чорної плямистості) або зернових культур (чорна цвіль). У зернових культурах патоген з'являється при взаємодії з іншими мікроміцетами, такими як *Cladosporium* або *Epicoccum* у вигляді так званого чорного гриба. Вони не колонізують життєво важливі органи рослин, а заселяють відмерлі або дозрілі частини, де харчуються вже відмерлими тканинами. Явними симптомами є чорне забарвлення (цвіль) уражених ділянок. Руйнівна дія полягає, перш за все, в утворенні цвілевих токсинів, які можуть потрапити в зібраний урожай і тим самим знизити його якість. Чорна цвіль контролюється за допомогою цілеспрямованого внесення фунгіцидів.

Nigrospora oryzae – мікроміцет, що є збудником небезпечної хвороби, яка найчастіше вражає саме зерно у період воскової стиглості. При цьому культура втрачає господарську цінність, зерно швидко пліснявіє, а насіння має низьку схожість після посіву. Молоді паростки не мають достатньої енергії для виходу на поверхню ґрунту.

Антагоністичні властивості визначали дифузним методом подвійної культури в чашках Петрі на глюкозо-пептонному агаризованому середовищі (ГПА-Звягінцева) [246]. У дослідженнях використано класичний метод блоків.

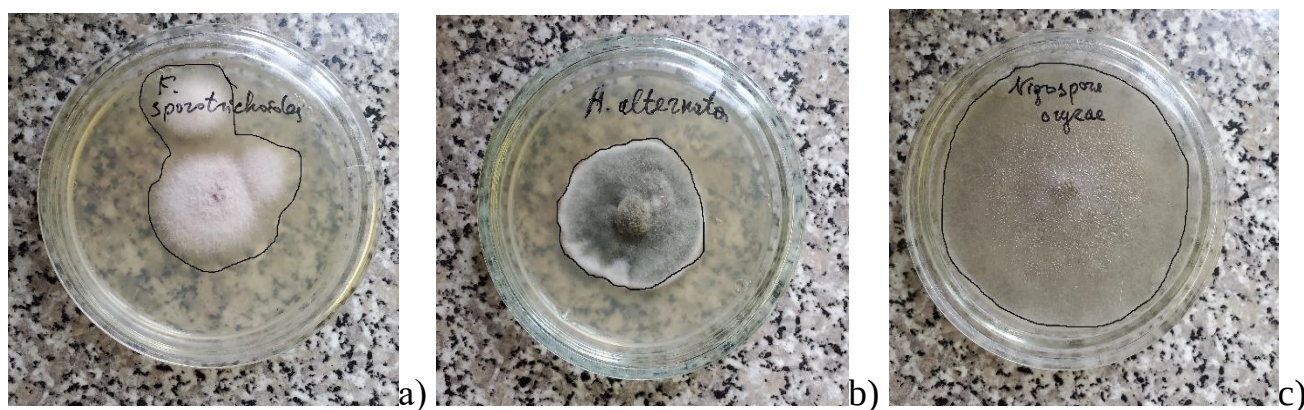


Рис. 2.4. Фітопатогенні мікроміцети

Примітка: а) *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2; б) *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45; в) *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch 18.77

Під час дослідження ризосферних бактерій їх культивували впродовж доби за 28 °С для утворення й накопичення в агаризованому поживному середовищі біологічно-активних метаболітів. Пробопідготовку десятидобових тест-культур фітопатогенних мікроміцетів здійснено за умов інкубації блочним способом та температурним діапазоном від 24 до 28 °С. Антагоністичну активність ризосферних прокаріот оцінювали за ступенем інгібування росту та розвитку тестових мікроміцетів. Діаметр колонії вимірювали на 14 добу, визначали відсоток інгібування росту колоній грибів за формулою:

$$\text{Інгібування росту (\%)} = \frac{Дк - Дд}{Дк} * 100\%$$

де: Дк – діаметр колонії гриба в мм у контролі, Дд – діаметр колонії гриба в мм у досліді.

Діаметр колонії вимірювали в радіально протилежних сторонах двічі, та розраховували середнє арифметичне значення [255]. Ступінь антагоністичної активності випробуваних штамів ризосферних бактерій, визначали відповідно до розміру зони пригнічення росту тест-штаму навколо агарового блоку [183]. Зони затримки росту враховували через 3 і 10 діб культивування. Статистичну обробку проводили за допомогою Microsoft Excel.

Оцінка біологічної ефективності перспективних домінантних морфотипів бактерій. Для дослідження ефективності обробки та продуктивності зерен ячменю ярого (також сорт Себастьян) домінантними морфотипами бактерій ризосфери ми проводили прямий підрахунок життєздатних колонієутворюючих одиниць за допомогою камери Горяєва. Камера Горяєва - пристрій, призначений для підрахунку кількості клітин у заданому обсязі суспензії [212]. Зазвичай її використовують для визначення кількості формених елементів у зразку. За допомогою камери Горяєва можна визначити збільшення і розмір поля зору оптичного мікроскопа. Являє собою прозорий паралелепіпед (предметне скло), з борознами та нанесеною мікроскопічною сіткою. Розміри малих поділок клітини сітки становлять 0,05 мм, а великих – 0,2 мм. При цьому сітка нанесена на майданчик (ділянка скла), розташована на 0,1 мм нижче, ніж два сусідні майданчики. Ці майданчики слугують для притирання покривного скла. В результаті об'єм рідини над квадратом, утвореним великими поділами сітки Горяєва, становить 0,004 мікролітра.

Мікробіологічний аналіз чисельності життєздатних колонієутворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл) суспензії підраховували за формулою:

$$M = \frac{Ax400}{1000}, \text{ млрд./мл}$$

де, M — титр (10^{-9}); A - середнє значення клітин бактерій ($\frac{\Sigma}{16}$).

Мікроскопічні дослідження готових препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопу Sigeta MB-130, збільшення 40х, у препаратах «жива крапля».

У лабораторному досліді витримували експозицію насіння ячменю ярого в бактеріальних суспензіях домінантних морфотипів протягом 5-7 хв. при вихідних (чистих) суспензіях та у розведенні 1:1. Тривалість модельного досліді - 10 діб, при постійному зволоженні фільтрувального паперу у чашках Петрі [246].

Дослідження змін функціонального стану і активності фотосинтетичного апарату тест-рослин ячменю виконували, застосовуючи біофізичний метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ) за допомогою портативного приладу вітчизняного виробництва «Флоратест» (рис. 2.5) за загальноприйнятою методикою [151].



Рис. 2.5. Вимірювання індукції флуоресценції хлорофілу

Фотохімічну активність листків визначали в лабораторії кафедри генетики, селекції і насінництва ім. проф. М.О. Зеленського НУБіП України. Портативний прилад «Флоратест» (Україна) оснащений рідинно-кристалічним дисплеєм (128x64 пікселів) і виносним оптоелектронним датчиком із довжиною хвилі опромінення 470 ± 15 нм, площею плями опромінення не менш як 15мм^2 та освітленості в її межах не менш як $2,4\text{ Вт/м}^2$. Спектральний діапазон вимірювання інтенсивності флуоресценції – від 670 до 800 нм. Дані, виміряні приладом, опрацьовували за допомогою програмного забезпечення «Флоратест», отримані результати відображено у табличній або графічній формі. Темнова адаптація листків перед вимірюваннями становила не менш як 20 хв. Повторність вимірювань у кожному варіанті триразова [169]. Коефіцієнти K1, K2 та K3 розраховували, як середнє арифметичне трьох показників приладу «Флоратест». Статистичний аналіз проведено за програмою Statistica 8.0, дані обчислено за MS Excel.

Фізіолого-біохімічні методи дослідження.

Функціональну спрямованість та особливості виділених ізолятів вивчали одним із найточніших методичних підходів для визначенні метаболічних шляхів вуглецевого живлення мікробіоти ґрунту - системою тестування KB009 ТМ HiCarbo Kit [24, 29, 120]. KB009 - це комплексна система тестування, яка може використовуватися для вивчення біохімічного профілю широкого спектру організмів (рис 2.4). Вона включає комбінацію з 35 тестів вуглеводних джерел живлення мікроорганізмів. Набір містить частину А, частину Б, кожна з яких містить 12 тестів на утилізацію цукрів і частину С, яка містить 11 середовищ з цукрами та 1 контроль. Випробування засновані на принципі зміни рН та використання субстрату мікроорганізмами. Під час інкубації в організмах відбуваються метаболічні зміни, які можна виявити за зміною кольору середовища [150].



Рис. 2.4. Загальний вигляд тест-системи KB009 ТМ HiCarbo Kit

Десять комплектів частини А показують використання таких цукрів - (KB009A) - лактози, ксилози, мальтози, фруктози, декстрози, галактози, рафінози, трегалози, мелібіози, сахарози, L-арабінози, маннози.

Десять комплектів частини В - (KB009B1) - інουλін, глюконат натрію, гліцерин, саліцин, дульцитол, інозитол, сорбіт, маніт, адонітол, арабітол, еритритол, альфа-метил-D-глюкозид.

Десять комплектів частини С - (KB009C) - рамноза, целлобіоза, мелозітоза, альфа-метил-D-манозид, ксиліт, ONPG (орто-нітрофеніл-β-галактопираноза), ескулін, D-арабіноза, цитрат, малонат, сорбоза та 1 контроль.

KB009 Hicarbohydrate набір інокулювали бактеріальними культурами окремо та інкубували при 30 ± 2 °C протягом 48 годин [93]. Після інкубації результати спостерігали та порівнювали відповідно до колориметричної таблиці набору. (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Інтерпретація результатів системи KB009 Hicarbohydrate

Тест	Принцип дії	Початковий колір середовища	Позитивна реакція	Негативна реакція
Утилізація вуглеводів	Визначення використання вуглеводів	Рожево-червоний/червоний	Жовтий	Червоний/рожевий
ONPG	Визначення активності β-галактопиранози	Без кольору	Жовтий	Без кольору
Гідроліз ескуліну	Визначення гідролізу ескуліну	Кремовий	Чорний	Кремовий
Утилізація цитрату	Визначення можливості утилізації мікроорганізмами цитрату як джерела вуглеводів	Зелений	Синій	Зелений
Утилізація малонату	Визначення можливості утилізації мікроорганізмами малонату натрію як джерела вуглеводів	Салатовий	Синій	Салатовий

Вуглеводний тест: колір середовища змінюється з червоного на жовтий через утворення кислоти, якщо тест позитивний. Якщо тест негативний, колір середовища залишається червоним.

Подальшу ідентифікацію ми проводили за допомогою визначника Берджі [28]. Він призначений саме для ідентифікації бактерій, не торкаючись класифікації. Якщо дослідники вже виділили мікроорганізми і далі необхідна подальша ідентифікація загальний підхід до вирішення цієї задачі включає наступні шість етапів:

- 1) Особливості схеми ідентифікації бактерій (аналізуються ряд ознак для диференціації мікроорганізмів).
- 2) Визначення природи ізолята як прокаріотичного чи еукаріотичного мікроорганізма (аналізується таблиця ознак, по яким прокаріоти відрізняються від еукаріот – представників пліснявих грибів, дріжджів, водоростей або найпростіших).
- 3) До якої з основних категорій належить виділений мікроорганізм. Для практичних цілей бактерії ділять на чотири основні категорії:
 - грамнегативні еубактерії, що мають клітинну стінку
 - грампозитивні еубактерії, що мають клітинну стінку
 - еубактерії, що не мають клітинної стінки
 - архебактерії
- 4) До якої групи належать виділені мікроорганізми (це наступний крок після визначення основної категорії бактерій, який полягає в тому, щоб установити розділ довідника, де вона розглянута. Для цього необхідно проаналізувати переліки груп всередині кожної основної категорії і короткий опис особливостей бактерій, що відносяться до кожної групи).
- 5) До якого роду відноситься виділений мікроорганізм (для більшості груп у довіднику приведені таблиці або ключі, де вказані признаки, що дозволяють провести диференціацію родів всередині групи).
- 6) До якого виду відноситься виділений мікроорганізм (описи більшості родів забезпечені таблицями, за допомогою яких можна провести диференціацію виду всередині даного роду).

Молекулярно-біологічні методи дослідження

Методика метагеномного дослідження. В основі виділення ДНК лежать як фізичні, так і хімічні процеси. При екстракції ДНК з ґрунтових прокаріот необхідно не тільки дезактивувати клітинні ферменти, але і «видалити» запасні речовини, наприклад, полісахариди та вторинні метаболіти, такі як алкалоїди, фенольні сполуки, терпени, які не просто заважають ізолюванню ДНК, але й негативно впливають на її якість [39]. Так, певні групи полісахаридів при виділенні ДНК утворюють із нею в'язку желеподібну масу [192]. Серйозний вплив, що пошкоджує ДНК, спричиняють окислювачі різної біохімічної природи, у тому числі фенольні сполуки. Значно розрізняється склад метаболітів представників різних таксонів.

В цілому, процедура виділення ДНК включає такі обов'язкові етапи:

- руйнування клітин;
- видалення мембранних ліпідів;
- видалення вторинних метаболітів і запасних речовин;
- видалення білків;
- видалення РНК;
- осадження ДНК

При метагеномному дослідженні всього пулу ґрунтових прокаріот ввідпрацьовано оригінальну методику екстракції тотальної ДНК мікроорганізмів, за основу якої був взятий метод J.J. Doyle, J.L. Doyle [84]. Електрофоретичне розділення загальної мікробної ДНК ґрунту проводили у 1% агарозному гелі. Візуальну детекцію зразків ДНК і очищення ґрунтової ДНК від домішок гумінових кислот здійснювали за методом D. Moreira. В дослідженні використовували маркер молекулярних мас (1500 bp, Geneuler DNA Ladders від ThermoScientific).

Для ампліфікації фрагменту 16S рРНК прокаріот проводили ПЛР реакцію з флуоресцентно-міченими праймерами EU3 (63f* : 5'-AGGCCTAACACATGCAAGTC-3', 1494г: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC-3'). ПЛР проводили для подальшого визначення поліморфізму довжин

рестрикційних фрагментів. Кількісну оцінку тотальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів проводили за допомогою спектрофотометра Beckman DU 1260. Таксономічну структуру прокаріот визначено за методом аналізу поліморфізму довжин термінальних рестрикційних фрагментів (Terminal restriction fragment length polymorphism – tRFLP). tRFLP аналіз отриманих фрагментів 16S рРНК проводили в автоматичному капілярному секвенаторі CEQ 8000 Genetic Analysis System («Beckman Coulter», США) згідно з рекомендаціями виробника. Ступінь насичення метагеному окремими таксономічними одиницями визначали і описували за допомогою двох параметрів – довжини термінальних рестрикційних фрагментів маркерного гена (положення окремого піка на tRFLP профілі) і частки цього фрагменту в сумарній ДНК (площа піку). Для видової класифікації фрагментів tRFLP використовували програму TRFLP Fragsort. Крім цього, аналізували нуклеотидні послідовності та перевіряли їх ідентичність з відповідними послідовностями 16S рРНК бази даних GenBank. Аналіз результатів секвенування здійснювали за допомогою програми Vector NTI Advance. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за загальноприйнятими у ґрунтовій мікробіології методиками з комп'ютерним опрацюванням отриманих даних за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2017.

Методика філогенетичного аналізу домінантних морфотипів. Для філогенетичного аналізу домінантних мікроорганізмів мікробного комплексу чорнозему типового використовували аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК [110]. Бактеріальну ДНК виділяли з суспензії бактеріальних клітин з використанням набору GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), згідно з протоколом виробника. Ампліфікацію гена 16S рРНК проводили з праймерами 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') і 1492r (5'-CGGTTACCTTGTTACGA CTT-3') за такого температурного режиму: 95°C, 2 хв; 30 циклів — 95°C, 30 с; 55°C, 45 с; 72°C, 90 с; кінцева елонгація 72°C, 7 хв. ПЛР-суміш об'ємом 25 мкл містила 12,5 мкл 2x DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 30 пкмоль кожного праймера та 50 нг ДНК. ПЛР проводили на

ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf, Німеччина) [231]. Продукти ПЛР розділяли у 1,7%-му агарозному гелі, що містив 0,01% бромистого етидію. Результати візуалізували в УФ-світлі. Отриманий амплікон розміром ~ 1500 п.н. вирізали з гелю і очищували за допомогою набору GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі DS-11FX+(DeNovix, США). Очищений ПЛР-продукт секвенували у двох напрямках на приладі «Genetic Analyzer 3130» (Applied Biosystems, США) з використанням набору реактивів «BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit».

Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з даними бази GenBank за допомогою програми NCBI Blast ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Філогенетичний аналіз, вирівнювання нуклеотидних послідовностей 16S рРНК представників різних видів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* здійснювали за допомогою програми MEGA 10.

Етапи побудови філогенетичного дерева:

- 1) Виділення біополімерів (ДНК, РНК, білок) є багатоступеневим і кропітким процесом (може бути гомогенізація, фракціонування, хроматографія, електрофорез, секвенування).
- 2) Побудова дерев з використанням філогенетичних методів
 - відбір послідовностей для аналізу
 - вирівнювання послідовностей, застосування дистанційних методів для побудови (UPGMA, Neighbor-joining)

Дистанційні методи засновані на оцінці відстаней: обчислюються еволюційні відстані між всіма листками і будується дерево, в якому відстані між вершинами найкращим чином відповідає матриці попарних відстаней.

Дендрограму філогенетичних зв'язків будували за допомогою методу найближчого зв'язування (Neighbor Joining) з використанням 2-параметричної моделі Кімури по 1000 реплікам бутстреп-аналізу.

Генетичні дистанції між нуклеотидними послідовностями можна визначати багатьма методами, але ми використовували метод Кімури. Мотоо Кімура запропонував метод обчислення дистанції, який отримав назву

«двохпараметрична дистанція Кімури» [47]. Модель Кімури припускає, що різні варіанти заміни нуклеотидів нерівноймовірні і розглядає два типи замін:

- 1) Транзиції – заміна нуклеотиду без зміни його типу, наприклад заміна пуринової основи на пуринову ($A \leftrightarrow G$), або піримідинової на піримідинову ($C \leftrightarrow T$).
- 2) Трансверсії – зміна типу основи з пуринового на піримідинову або навпаки (A або $G \leftrightarrow C$ або T).

Дистанція в моделі Кімури визначається за формулою:

$$d_{2\gamma} = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2P - Q) - \frac{1}{4} \ln(1 - 2Q)$$

Де P – частка транзицій, Q – частка трансверсії.

Принципи дистанційних методів

Першим етапом побудови філогенетичного дерева за допомогою дистанційних методів є встановлення попарних еволюційних дистанцій між аналізованими послідовностями, що представляються у вигляді матриці дистанцій. Таким чином, при побудові дерева за допомогою будь-якого дистанційного методу важливий вибір еволюційної моделі, оптимального методу розрахунку еволюційних дистанцій між послідовностями [282]. Дистанційні методи дозволяють будувати філогенетичні дерева на основі даних про генетичні дистанції між аналізованими послідовностями – таких, як дані ДНК-гібридизації, рестрикційного аналізу, імунної реактивності і т.д., необхідно лише представити ці дані у вигляді матриці дистанцій. Після цього матриця дистанцій переводиться в графічний формат – власне дерево – з використанням різних алгоритмів.

Послідовності гена 16S рРНК референтних культур бактерій родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* використано з бази даних GenBank [146].

Показники економічної ефективності (собівартість, прибуток, рентабельність) визначали за допомогою методики детермінованого факторного аналізу [234].

В роботі використовували наступну двохфакторну модель:

$$C = B/Y, \text{ де:}$$

C – собівартість 1 т продукції, грн.;

B – витрати на 1 га, грн.;

Y – урожайність зерна, т.

Кількісний вплив зміни досліджуваних факторів на відхилення прибутку в розрахунку на 1 га визначали за наступною моделлю:

$$\Pi = (Y \times \text{Ц}) - B, \text{ де}$$

Π – прибуток в розрахунку на 1 га, грн.;

Y – урожайність, т/га; Ц – ціна реалізації 1 т зерна, грн. (незмінна);

B – витрати в розрахунку на 1 га, грн.

Кількісний вплив зміни досліджуваних факторів на відхилення рентабельності виробництва зерна ячменю ярого визначали за традиційною моделлю:

$$P = \Pi/C \times 100\%$$

P – рентабельність виробництва зерна ячменю ярого, %;

Π – прибуток в розрахунку на 1 га, грн.;

C – собівартість 1 т продукції, грн.

РОЗДІЛ 3.

ВПЛИВ РІЗНИХ ВАРІАНТІВ УДОБРЕННЯ НА ФОРМУВАННЯ МІКРОБНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО В АГРОЦЕНОЗІ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

Дослідження в галузі класичної ґрунтової мікробіології показали, що формування відповідного мікробного комплексу залежить від багатьох факторів [10, 79]. Використання ґрунту в розрізі активного землекористування значною мірою порушує процеси природніх потоків речовин та енергії в агроєкосистемі. Ці зміни накопичуються при тривалому сільськогосподарському використанні земель. Кожен елемент агротехнології впливає на фізико-хімічні властивості ґрунту, розподіл елементів та субстратів для живлення мікроорганізмів. Систематичний вплив, що обумовлений застосуванням тієї, чи іншої системи землеробства, призводить до формування відповідних трофічних зв'язків ґрунтової мікробіоти з певною спрямованістю ендеґрунтових мікробних процесів, що відображається на структурі чисельності основних фізіологічних та таксономічних груп, якісному складі, формуванні біорізноманіття з домінуванням певних видів із різною функціональною активністю і відповідними механізмами взаємодії з рослиною.

Вищезазначене свідчить, що вирішення питання лежить переважно у площині детальних, комплексних досліджень ґрунтових мікроорганізмів, аналізі характеру їх взаємодії з рослиною та факторів, що на них впливають. З метою науково обґрунтованого використання принципів формування мікробної складової ґрунту, збереження гомеостазу біорізноманіття, управління ґрунтово-мікробіологічними процесами, що є основою для технологій різного рівня по удосконаленню адаптивних систем землеробства, та створенню стійких високопродуктивних агроєкосистем та управління ґрунтовою родючістю в цілому.

Формування мікробного комплексу ґрунту залежить від багатьох факторів, таких як клімат, агрохімічні властивості ґрунту, вирощувані рослини та їх

взаємодія з мікробіотою. Також одним із важливих факторів, який впливає на мікробний склад ґрунту є клімат. Температура, вологість, освітлення та інші кліматичні умови можуть впливати на розмноження та розповсюдження мікроорганізмів. Рослини також мають значний вплив на формування мікробного комплексу ґрунту і можуть взаємодіяти з мікробами через кореневу систему та виділяти специфічні речовини - екsudати, що сприяють розвитку певних мікроорганізмів. Крім того, людська діяльність, така як землеробство, також може впливати на мікробний склад ґрунту. Наприклад, використання різних засобів захисту рослин може спричиняти зміни в мікробному комплексі ґрунту. Наприклад, застосування хімічних добрив та пестицидів може негативно вплинути на мікробний склад та функціональну активність мікроорганізмів. Загалом, формування мікробного комплексу ґрунту є складним процесом, який залежить від взаємодії багатьох факторів. Дослідження мікробного складу та функціональної активності мікроорганізмів допомагає зрозуміти ці взаємозв'язки та розробляти стратегії збереження та підвищення продуктивності ґрунту та забезпечення стійкого функціонування екосистем.

В Україні виробляють в середньому близько 50-60 млн т зернових та приблизно таку ж кількість соломи, яку використовують для годування тварин та підстилки, для удобрення ґрунту, а можливий її залишок становить 20-40%. Його успішно використовують для виробництва енергії або будівельних матеріалів, для ведення грибництва. Але багаторічні дослідження та економічний аналіз показали, що незважаючи на досвід використання соломи в Україні на добрива і паливо, резерв цього природного ресурсу у сільському господарстві використовується ще недостатньо. а середніми даними аналізів, залежно від умов вирощування, культури, з 1 тонною соломи до ґрунту надходить 5,2 кг азоту, 2,3 кг фосфору, 10,3 кг калію, 3,2 кг кальцію, 1 кг магнію та інших мікроелементів. Солома, за використання її на добриво та інші рослинні рештки (вторинна продукція рослинництва), є одним із вагомих резервів поліпшення родючості ґрунту, однак щорічно понад половину їх кількості спалюють [130]. Вважають, що солома не має ніякої цінності і заважає якісному виконанню

агротехнічних заходів [170, 227]. Використання соломи на добриво — це не миттєвий результат, а процес невидимий, на перший погляд, однак дає свої позитивні результати щонайменше через рік часу. Солома потребує часу для розкладу азоту, тому частина енергії іде на її трансформацію. У ґрунті азоту не так багато для його швидкої трансформації, а сама клітковина важка для розкладання мікроорганізмами. Саме тому це довгий процес, але використовуючи ще і сидерати, можна швидше отримати позитивні результати — до двох місяців. І при цьому відбувається більше гумусонакопичення і вуглець закріплюється в ґрунті і біомасі мікроорганізмів, а не відбувається емісія вуглекислого газу.

3.1. Вивчення особливостей кількісного формування різних фізіологічних груп мікроорганізмів у чорноземі типовому за різних варіантів удобрення

Чисельність фізіологічних та таксономічних груп мікробіоти є невід’ємною характеристикою при комплексному аналізі мікробного ценозу ґрунту, встановленню принципів формування трофічних зв’язків та спрямованості ґрунтово-мікробних процесів [13, 180].

За результатами досліджень встановлено значні зміни у формуванні структури та чисельності основних фізіологічних і таксономічних груп мікроорганізмів в онтогенезі ячменю ярого під впливом різних варіантів удобрення ґрунту [279].

З метою дослідження кількісної структури мікробного комплексу чорнозему типового в ризосфері ячменю ярого проведено порівняльний аналіз впливу варіантів удобрення на чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп у фазі цвітіння та воскової стиглості ячменю ярого [143, 285].

Так, по відношенню до азоту та його форм у фазу цвітіння ячменю ярого (рис. 3.1) чисельність амоніфікувальних бактерій коливалась від 7,9 до 20,9 млн КУО/г ґрунту. Найбільша чисельність амоніфікувальних бактерій була на

варіанті удобрення побічною продукцією за максимального внесення мінеральних добрив і склала 20,9 млн КУО/г ґрунту, що у 2,9 рази більше за контроль. При внесенні тільки мінеральних добрив чисельність була майже у 2 рази більшою за контроль. При внесенні удобрення побічної продукції та меншої норми мінеральних добрив - $N_{45}P_{42}K_{55}$ чисельність амоніфікаторів була дещо меншою і складала 17,5 млн/г ґрунту. Чисельність мікроорганізмів амоніфікаторів становила 14,4 млн КУО/г ґрунту на варіанті з удобренням тільки поверхневими рештками, та 13,0 млн КУО/г ґрунту при удобренні тільки мінеральним добривом.

Чисельність мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, також була найвищою на варіанті з побічною продукцією (3,0 т/га) на фоні норми мінерального добрива - $N_{60}P_{50}K_{65}$ і становила 24,1 млн КУО/г ґрунту. За меншої норми мінеральних добрив значення було трохи меншим – 18,1. При удобренні тільки мінеральним добривом чисельність складала 17,9; і побічною продукцією – 17,5 млн КУО/г ґрунту. Та при варіанті контролю чисельність була найменшою і складала 14,1 млн КУО/г ґрунту (рис. 3.1).

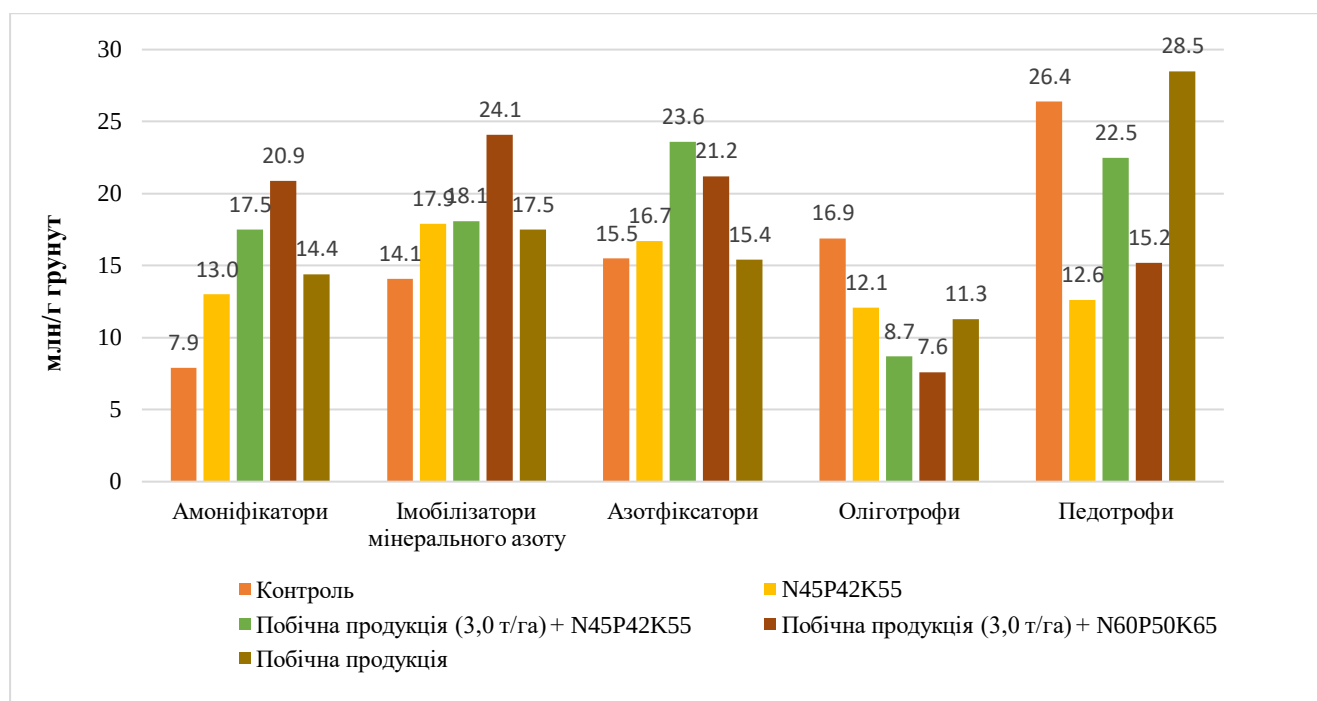


Рис. 3.1. Чисельність мікроорганізмів основних фізіологічних груп чорнозему типового у фазі цвітіння ячменю ярого за різних варіантів удобрення (2017-2019 рр., Панфилівська дослідна станція)

Чисельність азотфіксаторів (олігонітрофілів) була досить високою за використання рослинних решток (3,0 т/га) і максимального внесення мінеральних добрив $N_{60}P_{50}K_{65}$, і складала 21,2 млн/г ґрунту. Але найбільша чисельність азотфіксаторів була саме за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ що більше за контрольний варіант на 34% і складала 23,6 млн/г. За використання лише побічної продукції чисельність була майже однакова з варіантом контролю, і складала відповідно 15,4 та 15,5 млн/г ґрунту. Та за удобрення тільки мінеральним добривом у нормі $N_{45}P_{42}K_{55}$ – кількість азотфіксаторів складала 16,7 млн/г ґрунту.

Оліготрофи – мікроорганізми, функції яких зводяться до розкладу залишкових органічних сполук, що накопичуються у ґрунті при діяльності зоогенної і автохтонної мікрофлори [24]. Отже, їх чисельність в ґрунті показує на низьку забезпеченість органічними азотистими речовинами. Чисельність оліготрофів була дещо меншою в порівнянні з іншими фізіологічними групами. Найвищою була при контролі і складала 16,9 млн/г ґрунту, а при внесенні самого $N_{45}P_{42}K_{55}$ – 12,1 млн/г. Це, на нашу думку, пов'язане з більшим виносом поживних речовин з ґрунту за вищенаведених варіантів. Найнижчою чисельність була при удобренні рослинними рештками та обома концентраціями внесення мінеральних добрив – 8,7 та 7,6 млн. КУО/г ґрунту відповідно до меншої та більшої норми. Та при удобренні побічною продукцією значення становило 11,3 млн/г ґрунту.

Педотрофні мікроорганізми – важлива група ґрунтових мікроорганізмів, які відіграють важливу роль у розкладанні рослинних залишків, фіксації азоту, стабілізації фітосанітарного стану ґрунту та накопиченні активних речовин. Чисельність педотрофних мікроорганізмів найвищою була при внесенні побічної продукції, і складала 28,5 млн/г ґрунту, а при контролі – 26,4 млн/г. Найменшими значення були за внесення тільки мінерального добрива – 12,6 млн/г ґрунту. При удобренні рослинними рештками (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ чисельність становила 22,5 млн/г ґрунту; а при побічній продукції (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ – 15,2 млн. КУО/г ґрунту.

Целюлозоруйнуючі мікроорганізми є основним джерелом вуглецю та інших органічних речовин, які активно трансформуються ґрунтовими мікроорганізмами. Тому все більш стає поширене внесення рослинних решток попередника як біологічного удобрення та енергетичного матеріалу, який бере участь у процесах ґрунтоутворення [305, 321]. У наших дослідженнях чисельність була найвищою за використання побічної продукції на фоні мінеральних добрив і становила 842,1-867,8 тис/г ґрунту відповідно при нормі внесення $N_{45}P_{42}K_{55}$ та $N_{60}P_{50}K_{65}$. У 1,9 рази менші показники отримано за використання побічної продукції – 454 тис/г ґрунту. Найменший показник був на контролі – 182,5 тис/г ґрунту (рис. 3.2). Та при внесенні тільки мінерального добрива концентрація складала 367,9 тис/г ґрунту Целюлозоруйнуючі мікроорганізми грають важливу роль у процесі деградації та переробки органічних речовин, зокрема целюлози, на більш прості складові. Їхня активність сприяє вивільненню поживних речовин та енергії, яка може бути використана іншими мікроорганізмами, включаючи рослини. Низька чисельність целюлозоруйнуючих мікроорганізмів може вказувати на застосування пестицидів або інших хімічних, які негативно впливають на чисельність та функціональну активність целюлозоруйнуючих мікроорганізмів у ґрунті.

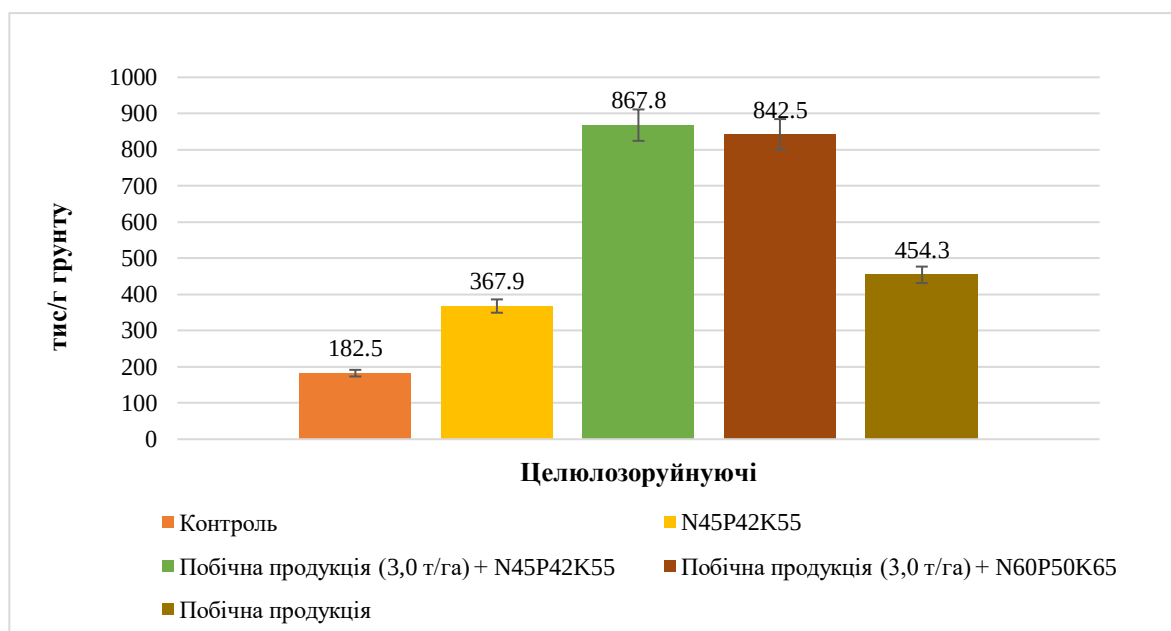


Рис. 3.2. Чисельність целюлозоруйнуючих мікроорганізмів чорнозему типового у фазі цвітіння ячменю ярого (2017-2019 рр.)

Чисельність спороутворюючих мікроорганізмів була не дуже високою майже за всіх досліджуваних варіантів, окрім варіанту удобрення рослинними рештками та мінеральними добривами у кількості $N_{60}P_{50}K_{65}$, і становила 51956 тис/г ґрунту; та варіанті з самою побічною продукцією – 23594 тис/г ґрунту (рис. 3.3). Найменшими показники були за контролю (7145 тис/г) та варіанті з внесенням лише мінерального добрива – 9146 тис/г ґрунту. При внесенні побічної продукції (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ кількість спороутворюючих мікроорганізмів становила 21038 тис/г ґрунту.

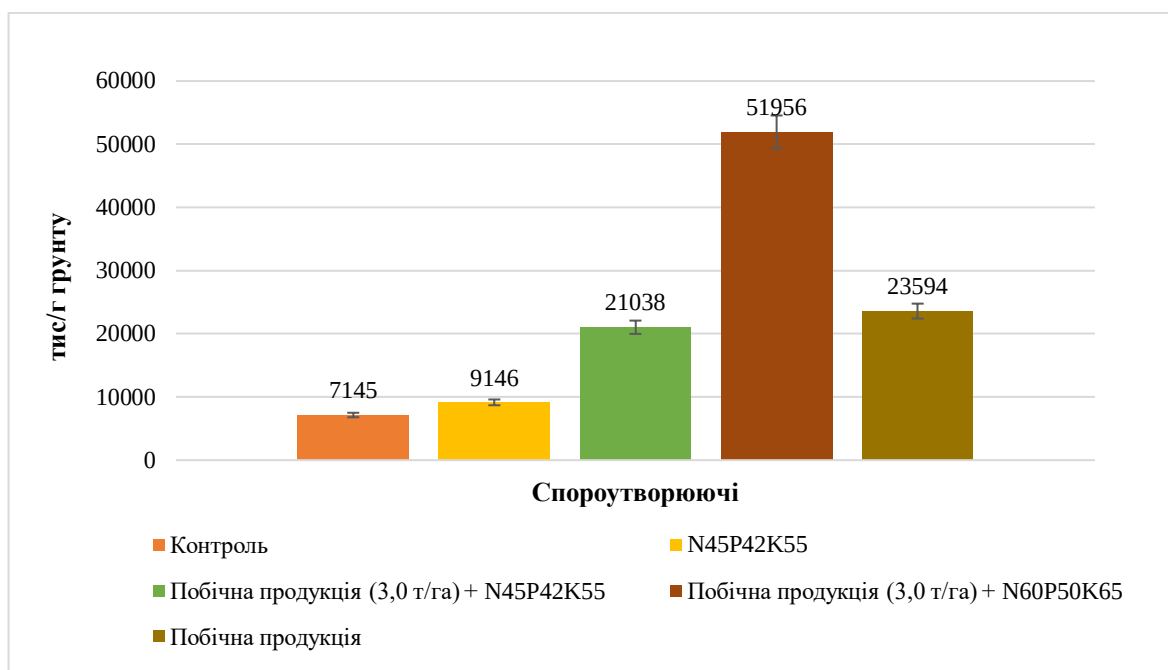


Рис. 3.3. Чисельність спороутворюючих бактерій у чорноземі типового у фазі цвітіння ячменю ярого (2017-2019 рр.)

Низька чисельність спороутворюючих мікроорганізмів може мати негативний вплив на здоров'я рослин та їх продуктивність, оскільки ці мікроорганізми забезпечують багато важливих функцій у ґрунті, таких як біоремедіація, перетворення поживних речовин та забезпечення захисту від патогенів. За таких умов відбувається прискорення інтенсивності мінералізаційних процесів органічної речовини ґрунту, активне використання мікроорганізмами мінеральних форм азоту і порушення трофічних зв'язків [42, 229].

В наших дослідженнях в основному найвищі показники були отримані у варіанті з побічною продукцією та $N_{60}P_{50}K_{65}$. Ми можемо спостерігати найбільшу чисельність мікроорганізмів іммобілізаторів мінерального азоту майже по всіх варіантах досліду у порівнянні з оліготрофами та амоніфікаторами.

З досліджених даних ми можемо зробити висновок, що першою стадією є вивільнення мінерального азоту саме в цій фазі онтогенезу рослин з подальшою його іммобілізацією амоніфікаторами.

Збільшення чисельності та співвідношення іммобілізаторів мінерального азоту та мікроорганізмів амоніфікаторів вказує на прискорення процесів трансформації органічної речовини, коли мінеральний азот включається в процеси метаболізму мікроорганізмів, особливо за удобрення рослинними рештками та мінеральним добривом. При цьому створюються умови конкуренції рослин та мікроорганізмів за мінеральний азот [205].

У фазу воскової стиглості ячменю ярого показники різних груп мікроорганізмів були меншими у 2,2-11,3 разів порівняно із фазою цвітіння. Але спостерігали відносне збільшення чисельності амоніфікаторів при удобренні побічною продукцією на фоні меншої норми мінеральних добрив, що активізується на останніх стадіях трансформації органічної речовини ґрунту та визначає спрямованість процесів гуміфікації. Це вказує на зниження доступних легкозасвоюваних поживних речовин та активну мінералізацію складних азот- та вуглецевмісних органічних сполук ґрунту, в тому числі й гумусових [284, 297]. Кількість амоніфікаторів при контрольному варіанті становила 0,8 млн/г ґрунту; при удобренні тільки мінеральним добривом – 1,5 млн/г та побічною продукцією – 1,4 млн/г ґрунту. При внесенні рослинних решток з мінеральним добривом у концентрації $N_{60}P_{50}K_{65}$ – 1,8 млн/г; та при удобренні рослинними рештками (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ був найвищий показник – 7,9 млн/г ґрунту.

Педотрофних мікроорганізмів найвища чисельність була на варіанті з побічною продукцією - 5,6 млн/г ґрунту, а за контролю – 3,7 млн/г. За використання побічної продукції з $N_{45}P_{42}K_{55}$ були найменші показники і

складали 0,8 млн/г. При удобренні рослинними рештками з вищою нормою мінерального добрива та тільки мінеральним добривом $N_{45}P_{42}K_{55}$ значення були майже однакові – 2,4 та 2,8 млн/г відповідно.

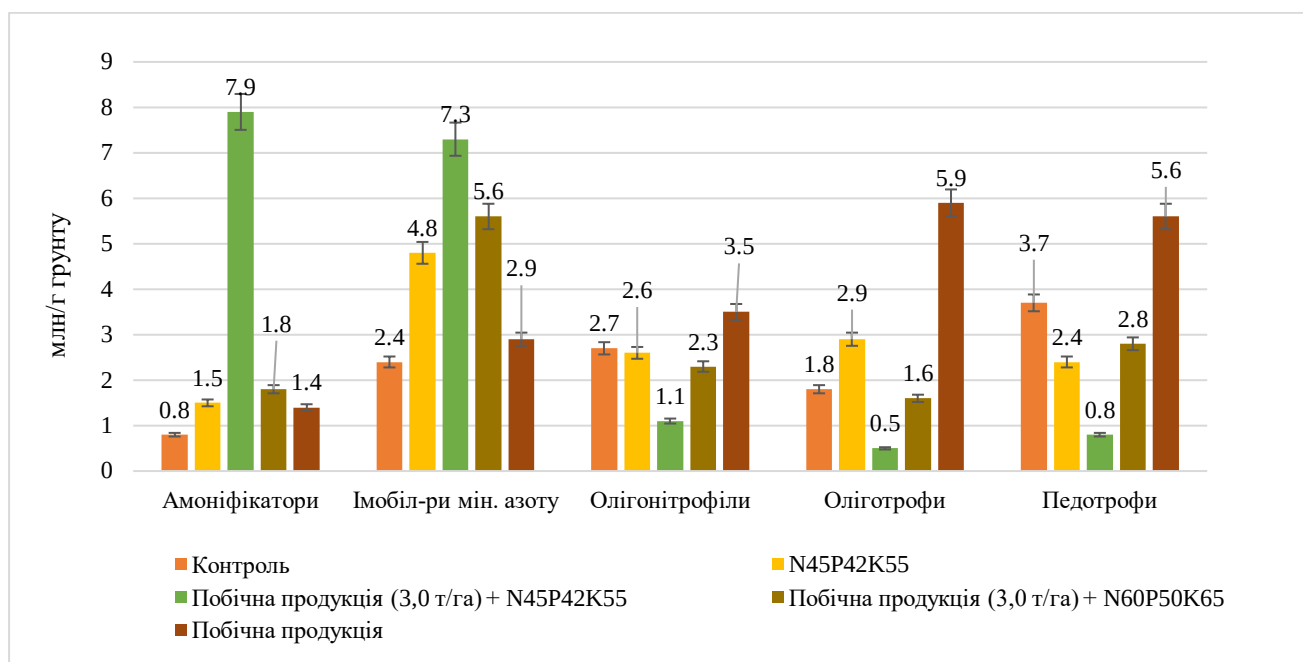


Рис. 3.4. Чисельність мікроорганізмів основних фізіологічних груп чорнозему типового у фазі воскової стиглості ячменю ярого (2017-2019 рр.)

Як наслідок, кількість олігонітрофілів, що здатні розвиватись при низькому рівні зв'язаного азоту в ґрунті, також була значно меншою у порівнянні з імобілізаторами мінерального азоту, і їх чисельність складала за контролю – 2,7; та за мінерального удобрення - 2,6 млн/г. За удобрення рослинними рештками попередника та меншою концентрацією добрива показник був найвищим – 3,8 млн/г ґрунту. І за удобренням самою побічною продукцією значення також було досить високим і складало 3,5 млн/г ґрунту (рис.3.4).

Мікроорганізмів імобілізаторів азоту найбільша чисельність була на варіанті з побічною продукцією та $N_{45}P_{42}K_{55}$ і становила 7,3 млн/г. На контролі - показники були значно меншими – у 8 разів порівняно з фазою цвітіння і становили 2,4 млн/г ґрунту. За чисельністю мікроорганізмів, які використовують мінеральні форми азоту, при використанні удобрення рослинними рештками та $N_{60}P_{50}K_{65}$ значення становило 5,6 млн/г ґрунту. Якщо порівнювати з фазою

цвітіння, то всі показники чисельності стали меншими в середньому майже у 6 разів.

Чисельність мікроорганізмів амоніфікаторів також зменшилась у порівнянні із фазою цвітіння. На фоні використання тільки мінеральних добрив чисельність складала 1,5 млн/г ґрунту, а при контролі значення було найменшим серед усіх варіантів – 0,8 млн/г. За використання побічної продукції на фоні мінеральних добрив показники становили 7,9-1,8 млн/г ґрунту, відповідно при використанні меншої та більшої норми добрива. Та при використанні самої побічної продукції чисельність становила 1,4 млн/г ґрунту.

Чисельність целюлозоруйнівних мікроорганізмів, що активно функціонують у мікробіоценозі на початкових етапах трансформації органічної речовини, також суттєво зменшилась у період активної вегетації ячменю ярого та відрізнялась по досліджуваним варіантам удобрення. За використання побічної продукції + $N_{60}P_{50}K_{65}$ та самої побічної продукції чисельність була досить високою, і становила 276-265 тис. КУО/г; та 150,0 – при контролі. За використання мінерального добрива $N_{45}P_{42}K_{55}$ показник був майже на рівні контролю і становив – 169 тис/г ґрунту. Чисельність на варіанті використання рослинних решток попередника + $N_{45}P_{42}K_{55}$ становила 214 тис. КУО/г (рис. 3.5).

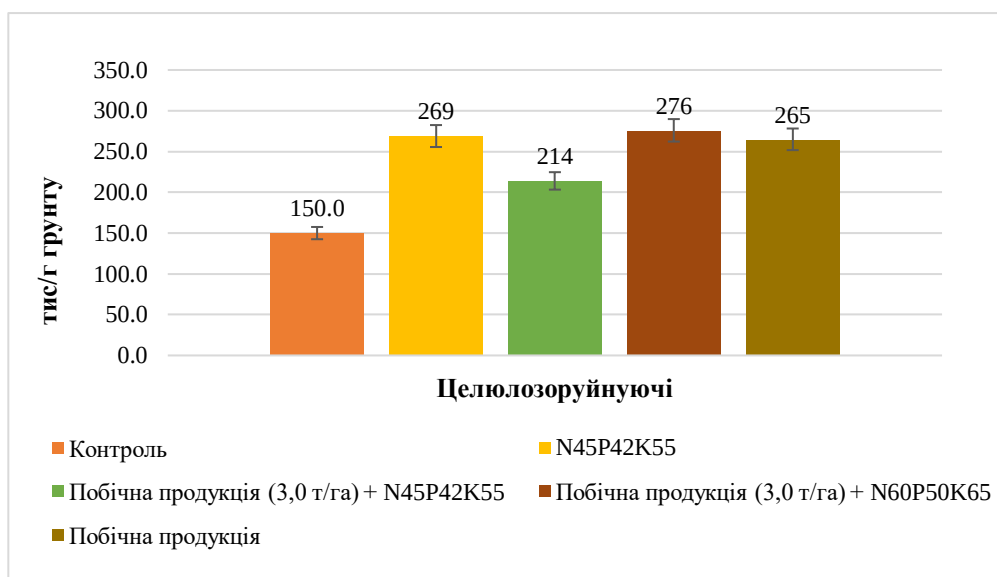


Рис. 3.5. Чисельність целюлозоруйнюючих мікроорганізмів чорнозему типового у фазі воскової стиглості ячменю ярого (2017-2019 рр.)

Чисельність спороутворюючих бактерій також зменшилась у порівнянні з фазою цвітіння. При використанні мінерального добрива значення становила 2541,7 тис/г ґрунту. За використання побічної продукції + $N_{45}P_{42}K_{55}$ а також побічної продукції + $N_{60}P_{50}K_{65}$ значення становили 4160,5 та 3280,8 тис/г ґрунту відповідно, що свідчить про активну участь вищезазначених груп мікроорганізмів у процесах трансформації органічних решток (рис. 3.6). За внесення достатньої кількості рослинних решток у вигляді побічної продукції показник спороутворюючих мікроорганізмів був найбільшим і становив 5324,1 тис/г ґрунту.

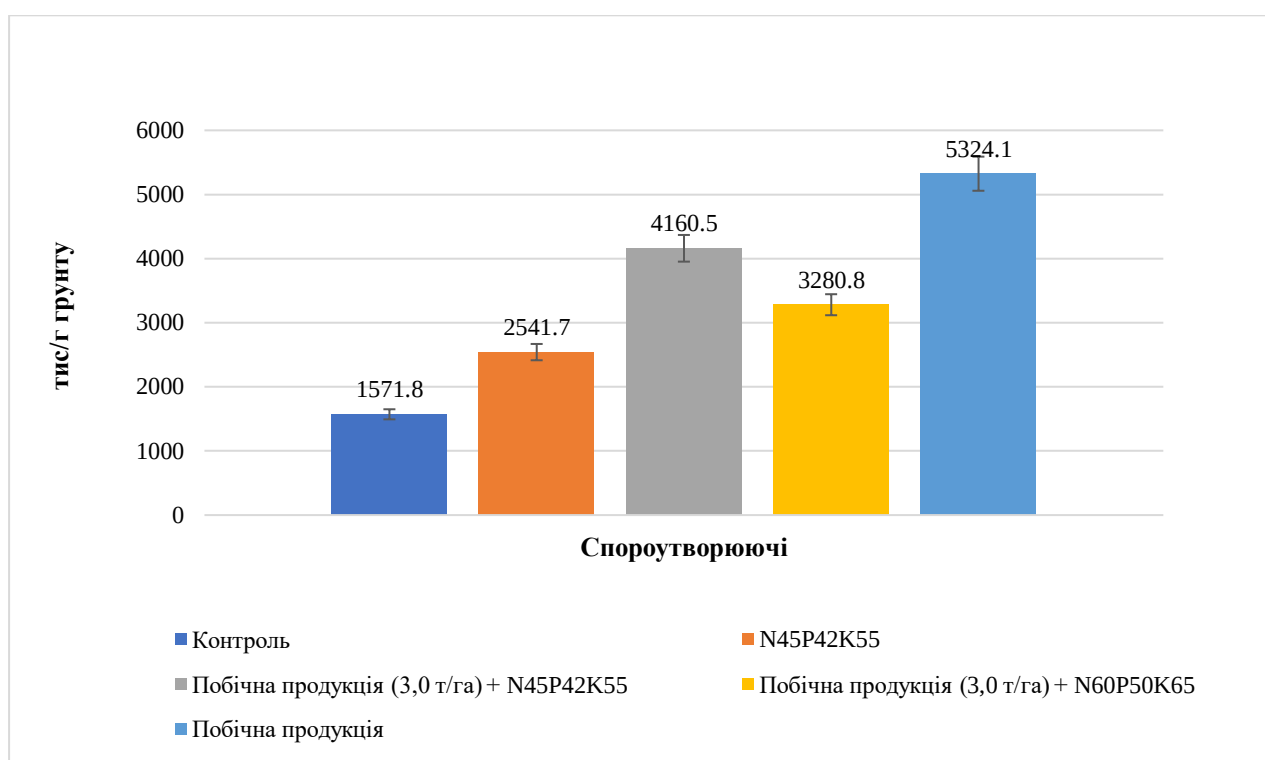


Рис. 3.6. Чисельність спороутворюючих мікроорганізмів чорнозему типового у фазі воскової стиглості ячменю ярого (2017-2019 рр.)

Порівняно з фазою цвітіння, у кінці вегетації спостерігалось зниження й перерозподіл за варіантами чисельності всіх груп мікроорганізмів. Негативними факторами були високі температури повітря й недостатня зволоженість у даний період.

Такий трофічний ланцюг і відповідно функціональна спрямованість з формуванням чисельності мікробного біому, на відміну від цілинних ґрунтів з постійним запасом та поповненням легкозасвоюваних органічних речовин, і

зумовлює зниження вмісту гумусу та відповідно родючості ґрунту за надмірного мінерального удобрення ґрунту [286].

У кінці вегетації ячменю ярого (фаза воскової стиглості) спостерігали приблизно однакову чисельність мікробного ценозу за рахунок перерозподілу мікроорганізмів основних фізіологічних груп за варіантами досліду.

Таким чином, за результатами аналізу чисельності мікроорганізмів основних фізіологічних груп чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого, встановлено, що використання різних систем удобрення має значний вплив на формування кількісної структури мікробного комплексу в основні фази росту та розвитку ячменю ярого [244, 298].

Виявлено, що застосування рослинних решток попередника та $N_{45}P_{42}K_{55}$ сприяє формуванню відповідних трофічних зв'язків в структурі мікробного комплексу та збільшенню чисельності мікроорганізмів за рахунок того, що у ґрунті як раз достатня і збалансована кількість як мінеральних елементів живлення, так і органічних рослинних решток. [301].

За мінеральної системи удобрення збільшується чисельність аеробів на фоні інтенсивних процесів мінералізації. Тобто трофізм мікроорганізмів в цьому випадку спрямований на більш простий шлях метаболізму для отримання енергії шляхом розкладу речовин. Ці процеси простіші, ніж складний біосинтез і притаманний також анаеробним мікроорганізмам. З часом, коли ґрунт осідає, структурний розподіл мікроорганізмів знов відновлюється, але вплив удобрення ґрунту має саме такий ефект.

За даних умов відбувається оптимізація структури чисельності мікроорганізмів чорнозему типового, що обумовлюють основні мікробіологічні процеси в ґрунті, сприяючи накопиченню легкозасвоюваних поживних речовин та живленню рослин

3.2. Формування якісного складу мікробного комплексу ґрунту в ризосфері ячменю ярого

На фоні значної різниці чисельності основних фізіологічних груп мікроорганізмів, для встановлення функціональної різноспрямованості мікробних процесів, важливе значення має якісний склад та структура розподілу домінуючих форм ґрунтової мікробіоти у варіантах дослідів [30, 156].

Важливе значення для формування різноманіття бактеріального комплексу ґрунту має аборигенний мікробіом культури. Для дослідження структури якісного складу бактеріального комплексу чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого за різних систем удобрення ґрунту попередньо було проведено характеристику якісної структури мікробного ценозу [243].

У фазу цвітіння ячменю ярого загалом було описано 67 морфотипів [191]. За даними показниками виділяли наступні групи видів мікроорганізмів: домінанти ($> 10\%$), субдомінанти ($5 - 10\%$), часто трапляються ($1 - 5\%$), випадкові ($< 1\%$). Серед них домінуючих – 15, субдомінуючих – 13, що часто трапляються – 34 і випадкових – 5 одиниць морфотипів. Значний вплив на структуру розподілу різних груп виявлених морфотипів мали варіанти удобрення ґрунту [41].

На основі опису морфолого-культуральних типів бактерій встановлено, що кількість виявлених морфотипів у фазі цвітіння ячменю ярого становила від 9 до 19 залежно від варіантів дослідів.

За удобрення побічною продукцією та $N_{45}P_{42}K_{55}$ їх кількість була найбільша і складала 19 морфотипів, а за удобрення тільки мінеральним добривом чисельність була найменшою і складала 9 морфотипів.

При цьому в структурі бактеріального комплексу за удобрення побічною продукцією + $N_{45}P_{42}K_{55}$ домінуючі та субдомінуючі морфотипи становили 32 %, а види, що часто трапляються та випадкові – 68 %. За контролю основу становили морфотипи, що часто трапляються – 56%, та субдомінанти – по 24 %, а домінантів було 11 %. Це вказує на збільшення кількості легкодоступних органічних сполук, що сприяють формуванню бактеріального різноманіття за

удобрення рослинними рештками попередника та середньою нормою мінерального добрива (рис. 3.7). За таких умов формується найширше різноманіття мікроорганізмів, тому що не порушується їх структура розподілу за профілем [219].

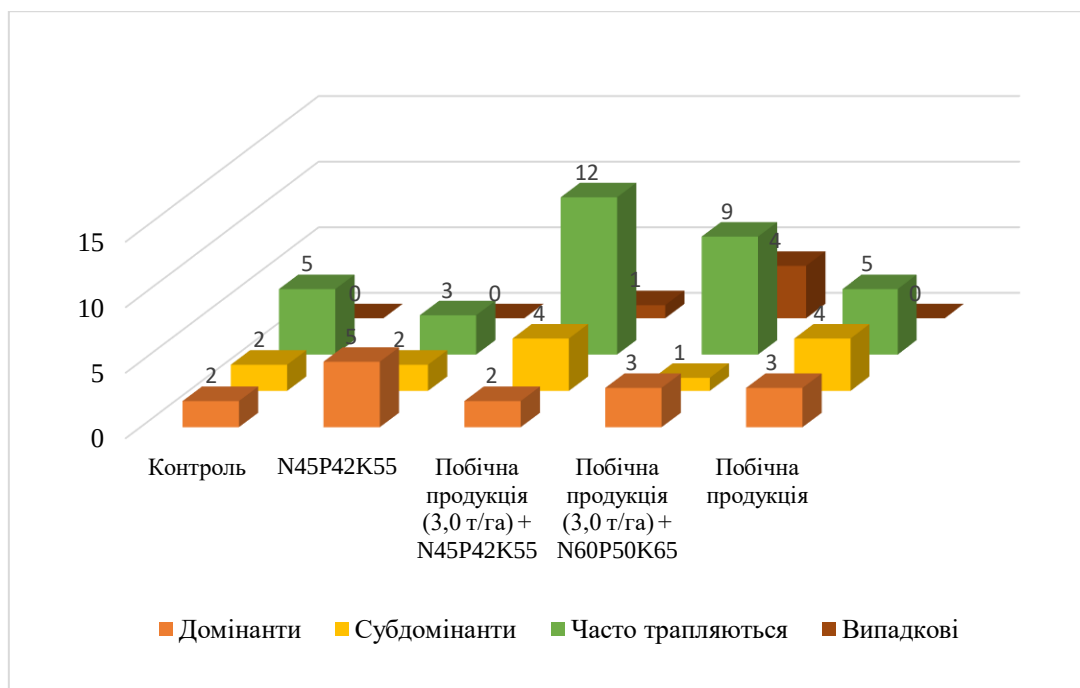


Рис. 3.7. Кількість морфотипів бактерій чорнозему типового у посівах ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту (фаза цвітіння, 2017-2019 рр.)

За удобрення побічною продукцією + $N_{60}P_{55}K_{65}$ бактеріальне різноманіття було трошки меншим, кількість виявлених морфотипів склала 17 одиниць. У структурі комплексу переважали також види, що часто трапляються (53%), та чисельність форм, котрі домінують - 17%.

За удобренням ґрунту тільки побічною продукцією кількість виявлених морфотипів бактерій становила 12. При цьому частка домінуючих видів склала 50 %. Кількість морфотипів, що часто трапляються становила 30 %, та субдомінантів було 20 %. Такий розподіл свідчить про недостатню різноспрямованість мікробних процесів та відповідно зростання не можна говорити про зростання різноманіття ґрунту за даних умов.

Встановлено, що застосування середніх норм мінеральних добрив в поєднанні з удобренням побічною продукцією позитивно впливає на формування якісної структури мікробного комплексу чорнозему типового, що відображається як за кількістю виявлених морфотипів бактерій та мікроміцетів, так і за структурою їх розподілу.

У фазі воскової стиглості ячменю ярого результати дослідів морфолого-культуральних типів бактерій можемо побачити на рисунку 3.8.

У кінці вегетації спостерігалось незначне збільшення чисельності виявлених морфотипів. Кількість виявлених морфотипів – 84 одиниці. Домінуючих серед них було 20 шт., субдомінуючих – 20 шт., тих, що часто трапляються, – 17 шт, а випадкових – 27.

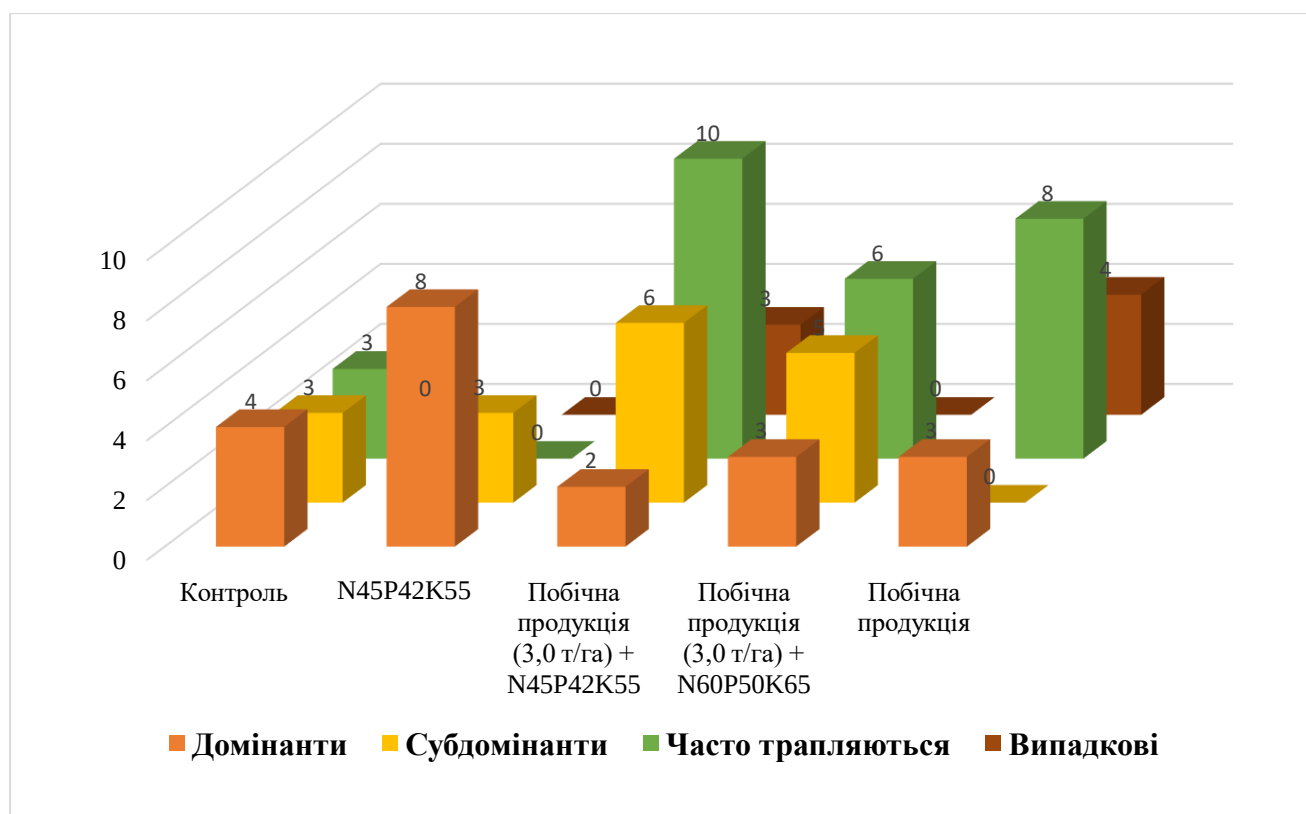


Рис. 3.8. Кількість морфотипів бактерій чорнозему типового у посівах ячменю ярого за різних варіантів удобрення (фаза воскової стиглості, 2017 – 2019 рр.)

Збільшення кількості морфотипів мікроорганізмів у кінці вегетації рослин вже ж таки може свідчити вже про більшу різноспрямованість процесів біоценозу ризосфери ячменю ярого.

За удобренням побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ ґрунту кількість морфотипів була найбільшою і складала 21 шт, з них 2 були домінантами, 6 субдомінантами, 10 морфотипи, що часто трапляються та 3 випадкових [117]. За удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ кількість морфотипів була меншою і складала 14 шт. Серед яких було 3 домінанти, субдомінантів – 5, та 6 – котрі часто трапляються. Випадкових форм не зустрічалось зовсім.

При удобренні лише мінеральним добривом $N_{45}P_{42}K_{55}$ загальна кількість морфотипів була меншою, і складала – 6 штук. Домінантних морфотипів було 8, субдомінантних – 3. Тих, що часто трапляються та випадкових взагалі не виявлено.

Удобрення побічною продукцією дало дещо вищі показники - кількість морфотипів була 15 шт. З них домінантних морфотипів було 3 шт, субдомінантів не виявлено. Тих, що часто трапляються – 8, та випадкових – 4.

При контролі загальна кількість морфотипів була 10шт. Домінантних мікроорганізмів було виявлено – 4, субдомінантів – 3 та тих, що часто трапляються – також 3. Випадкових форм також не було виявлено.

Таким чином, основні мікробіологічні процеси трансформації органічної речовини забезпечуються вузькою групою мікроорганізмів.

Отже, на формування якісної структури мікробного комплексу чорнозему типового в посівах ячменю ярого, значний вплив має застосування різних методів удобрення ґрунту. В умовах тривалого використання певної системи удобрення ґрунту спостерігається перебудова та перерозподіл домінуючих форм мікроорганізмів з послідуочим формуванням різних мікробних комплексів, що відрізняються за структурою та функціональною спрямованістю.

Встановлено, що застосування удобрення рослинними рештками попередника та середньою нормою мінеральних добрив позитивно впливає на формування якісної структури мікробного комплексу чорнозему типового, що відображається як за кількістю виявлених морфотипів бактерій (відповідно 19 та 21 морфотипів у різні фази вегетації), так і за структурою їх розподілу.

Порівняльний аналіз структури якісного складу мікробіому чорнозему типового було проведено в онтогенезі ячменю ярого (фази цвітіння та воскової стиглості) за різних варіантів удобрення ґрунту. У фазу цвітіння ячменю ярого загалом було описано 67 морфотипів (рис. 3.9), серед яких: 15 домінантів, 13 субдомінантів та 34 види, що часто трапляються. З них 19 морфотипів були унікальними. Найменшу кількість морфотипів ми спостерігали за контролю – всього 8. За удобрення $N_{45}P_{42}K_{55}$ морфотипів було не на багато більше – 9. А за органо-мінеральної системи удобрення було 18 морфотипів при внесенні побічної продукції (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, та при внесенні більшої концентрації мінерального добрива було виявлено 16 морфотипів. І за самої побічної продукції було виявлено 12 різних морфотипів. Морфотипи з 13 по 18 були притаманні тільки для органо-мінеральної системи удобрення, а морфотип №19 був унікальним для варіанту удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$.

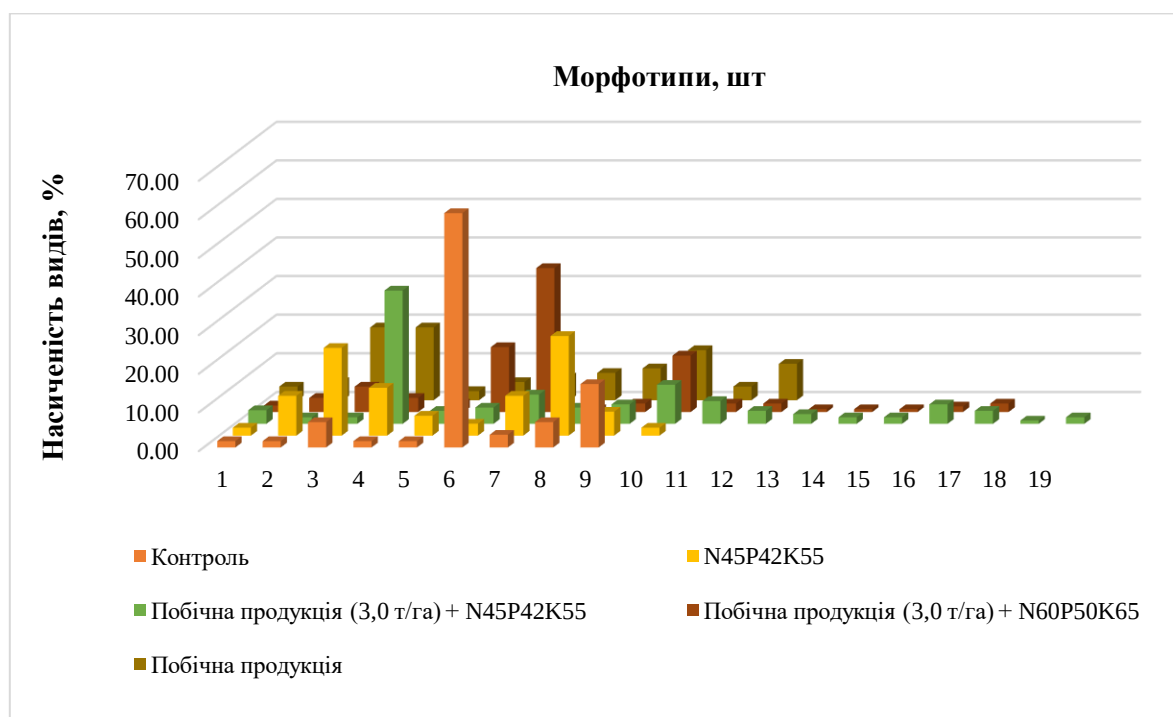


Рис. 3.9. Структура якісного складу бактерій чорнозему типового за різних варіантів удобрення (фаза цвітіння ячменю ярого)

У процесі онтогенезу рослин та їх активного метаболізму у ґрунті накопичується значна кількість корневих ексудатів органічної природи і

створюються умови для розширення біорізноманіття й функціональної активності мікробіоти. У фазу воскової стиглості ячменю ярого загалом було описано 84 морфотипів, 429 одиниць мікроорганізмів. Серед них домінуючих було 20, субдомінуючих – 20, що часто трапляються – 17 та випадкових – 27.

У кінці вегетації відбувалось накопичення органічної речовини ґрунту за рахунок надземної та підземної біомаси рослин. Цьому сприяла спрямованість мікробних процесів та спостерігалось збільшення чисельності виявлених морфотипів (рис. 3.10). Морфотипи з 16 по 21 були притаманними тільки для удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, так само як і у фазі цвітіння, широке різноманіття було саме за рахунок цього варіанту удобрення.

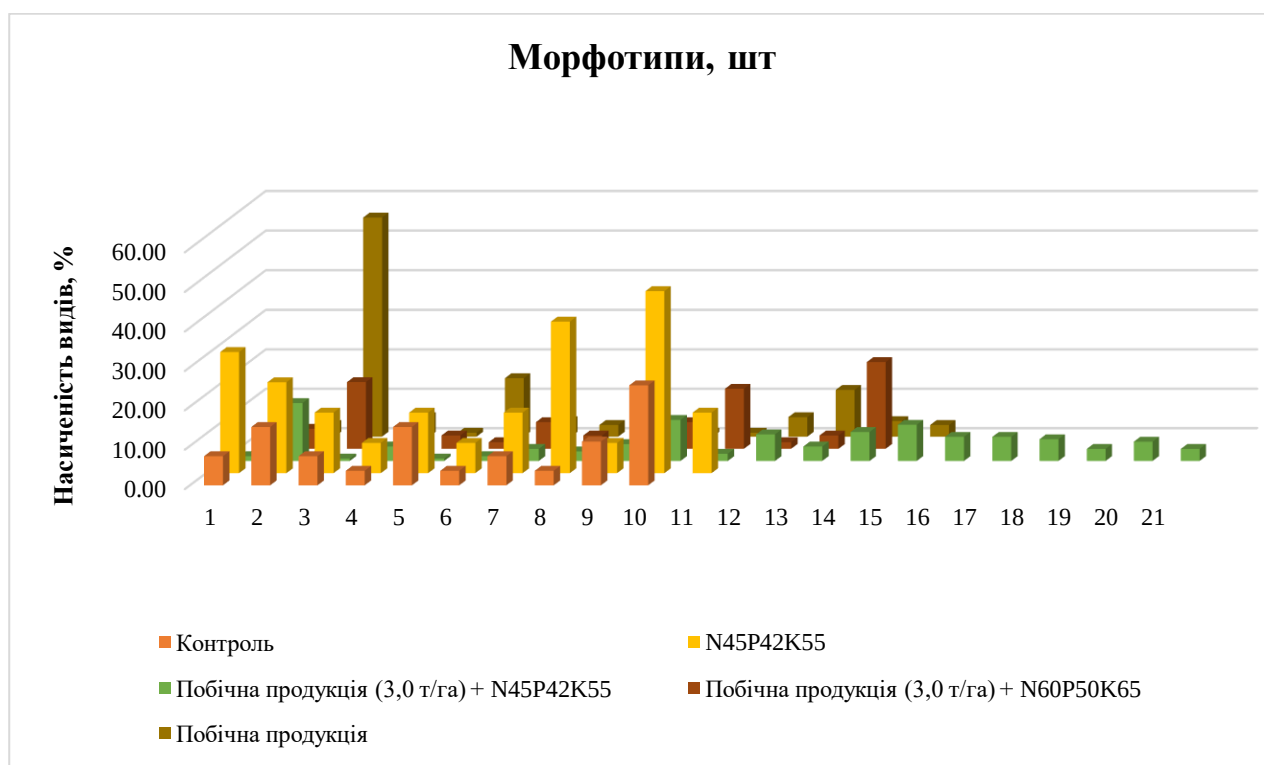


Рис. 3.10. Якісний склад бактерій чорнозему типового за різних варіантів удобрення (фаза воскової стиглості ячменю ярого).

Значний вплив на структуру розподілу різних груп виявлених морфотипів бактерій в основні фази росту ячменю ярого мали системи удобрення ґрунту. Так, у фазу цвітіння ячменю ярого за оранки та контролю виявлено лише домінуючі та субдомінуючі морфотипи (рис. 3.11).

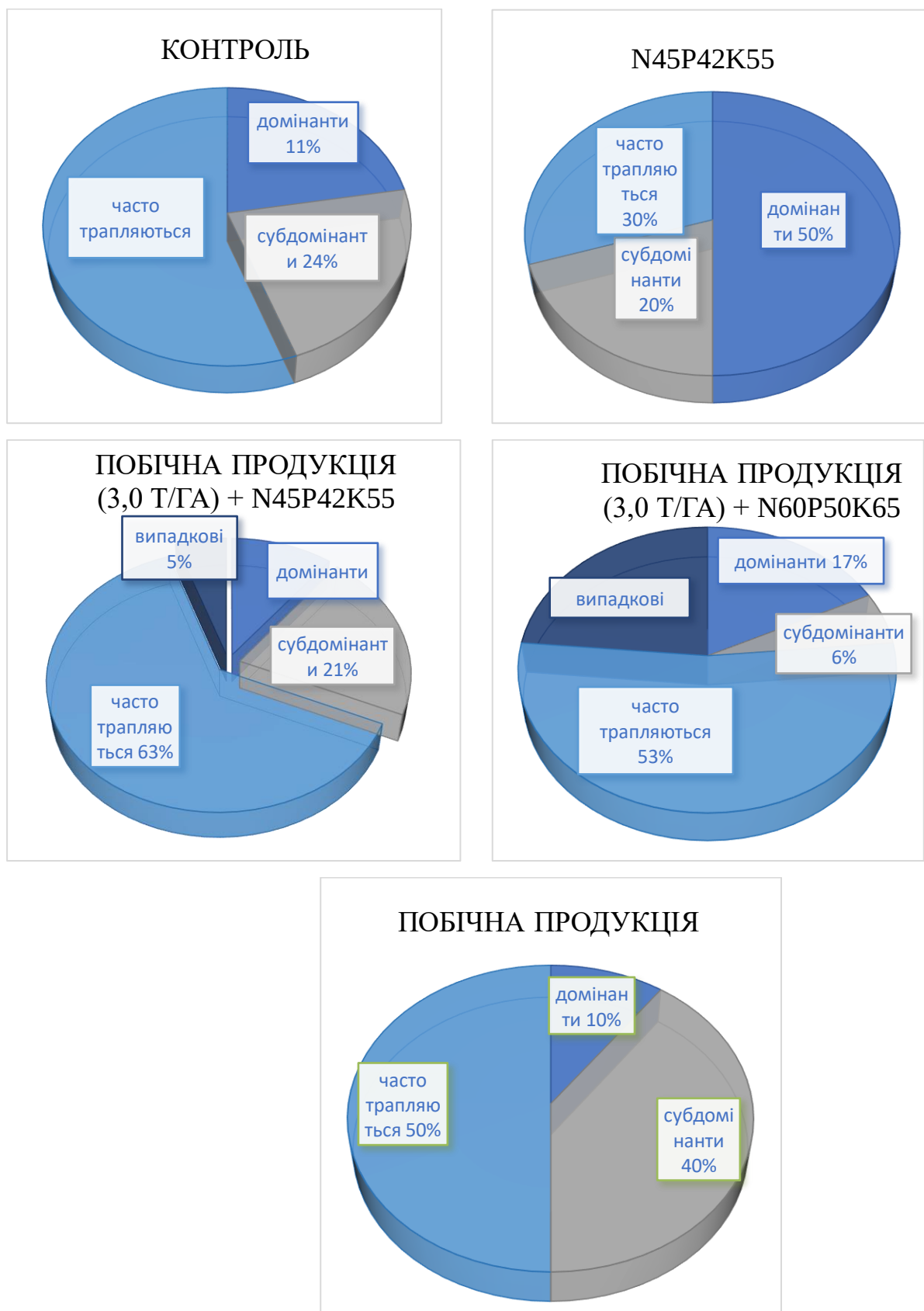
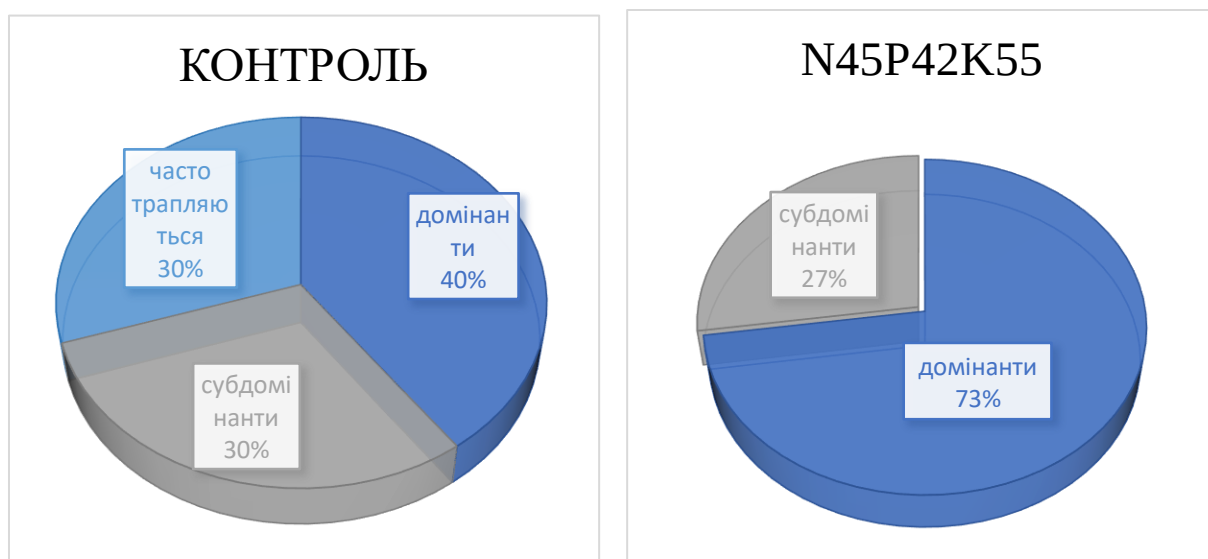


Рис. 3.11. Структура виявлених морфотипів бактерій в чорноземі типовому за різних варіантів удобрення ґрунту (фаза цвітіння ячменю ярого)

За удобренням рослинними рештками попередника + $N_{45}P_{42}K_{55}$ різноманіття описаних морфотипів зросло за рахунок видів, що часто трапляються, їх частка склала 63%. А за удобрення побічною продукцією з більшою часткою мінеральних добрив даних морфотипів було 53%, що також вказує на досить високе різноманіття мікробного ценозу у даному варіанті. Частка морфотипів, що часто трапляються була найменшою за удобренням тільки мінеральним добривом і складала 30%. А за удобрення тільки побічною продукцією частка домінантних та субдомінантних морфотипів становила 50 %, та решту складали морфотипи, що часто трапляються

У фазу воскової стиглості ячменю ярого різноманіття мікробіоти чорнозему типового розширилось за рахунок видів, що часто трапляються та випадкових форм за удобренням побічною продукцією та мінеральними добривами (рис. 3.12).



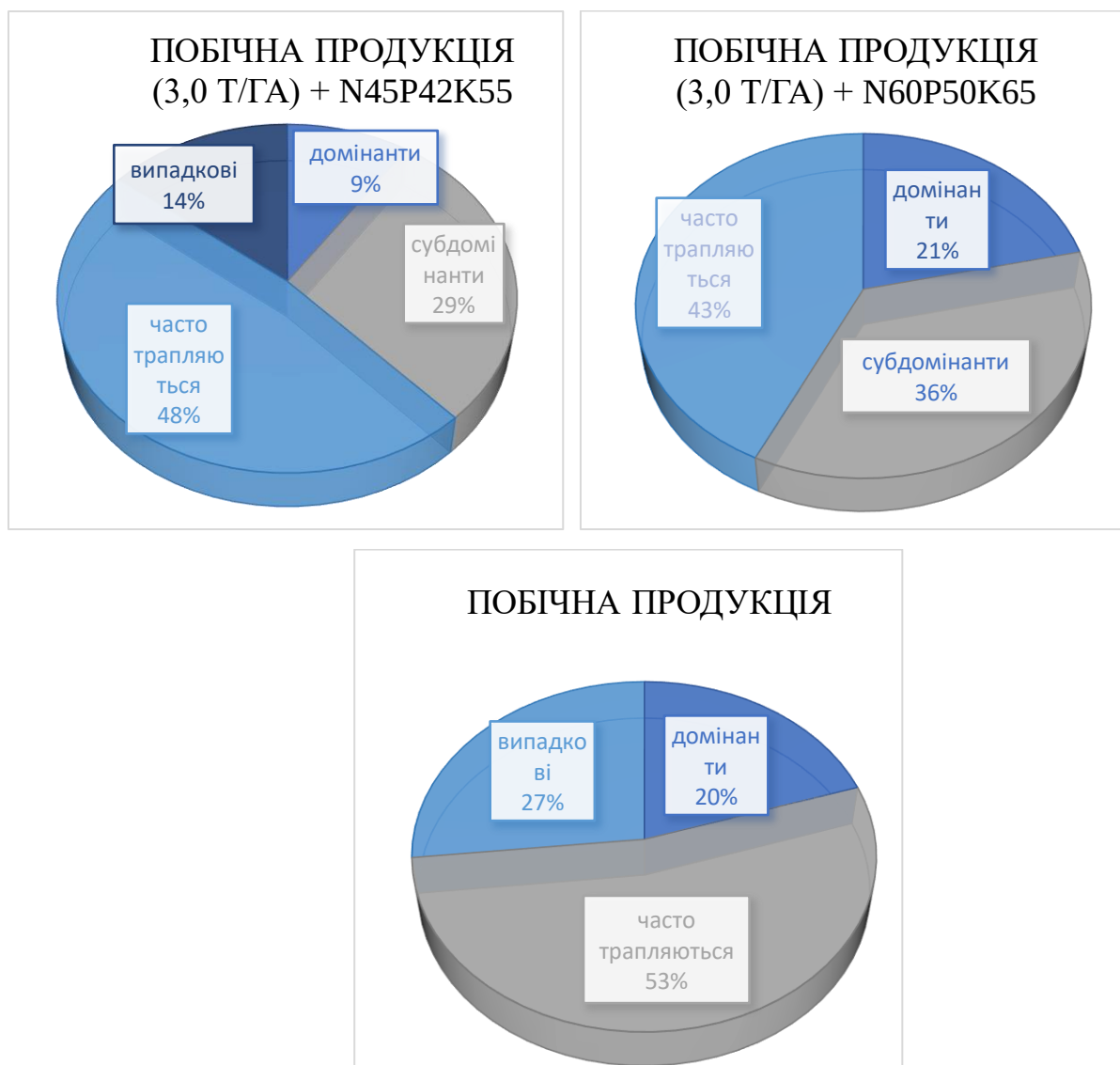


Рис. 3.12. Структура виявлених морфотипів бактерій в чорноземі типовому за різних варіантів удобрення ґрунту (фаза воскової стиглості ячменю ярого)

За удобрення побічною продукцією + N₄₅P₄₂K₅₅ структура бактеріального комплексу включала 2 домінуючих та 6 субдомінуючих морфотипів. Відбувалось зменшення кількості видів, що часто трапляються – з 48 % до 63 %. Також спостерігали активізацію в структурі мікробіоценозу випадкових видів, частка представленості яких становила 14 % в порівнянні з 5 % у фазі цвітіння. При варіанті внесення лише мінерального добрива спостерігали майже таку ж саму картину, як і у фазі цвітіння – біоценоз був досить бідним і представляв тільки домінантні та субдомінантні морфотипи. При чому домінантів було 73 %, а субдомінантів – 27 %.

При цьому встановлено, що топологія розподілу домінуючих форм залежно від систем удобрення ґрунту суттєво відрізнялася у різні фази росту та розвитку ячменю ярого. Так, у фазу цвітіння ячменю ярого всього було описано та виділено 8 унікальних домінуючих морфотипів (рис. 3.13). А у фазу воскової стиглості 12 домінуючих унікальних морфотипів було описано.

Також можемо спостерігати, що у фазу цвітіння розподіл морфотипів був дуже схожий у межах варіантів удобрення. Так домінантів було від 9 % до 11 % за удобрення рослинними рештками та мінеральними добривами, за виключенням варіанту удобрення лише мінеральним добривом та контролю.

Домінуючі морфотипи № 1 – 3, та 5-6 зустрічались за удобрення тільки мінеральним добривом. Насиченість морфотипу № 4 при контролі досягала майже 61 %, та морфотип № 7 був досліджений тільки при контролі і сягнув насиченості 16 %. За удобренням побічною продукцією та середньою нормою мінеральних добрив зустрічаються морфотипи під номерами 3 та 8. При цьому морфотипи № 4, 5 та № 8 були домінуючими за удобрення побічною продукцією та високою нормою мінеральних добрив. Морфотипи № 2, 3 та 8 є специфічними для удобрення ґрунту лише побічною продукцією.

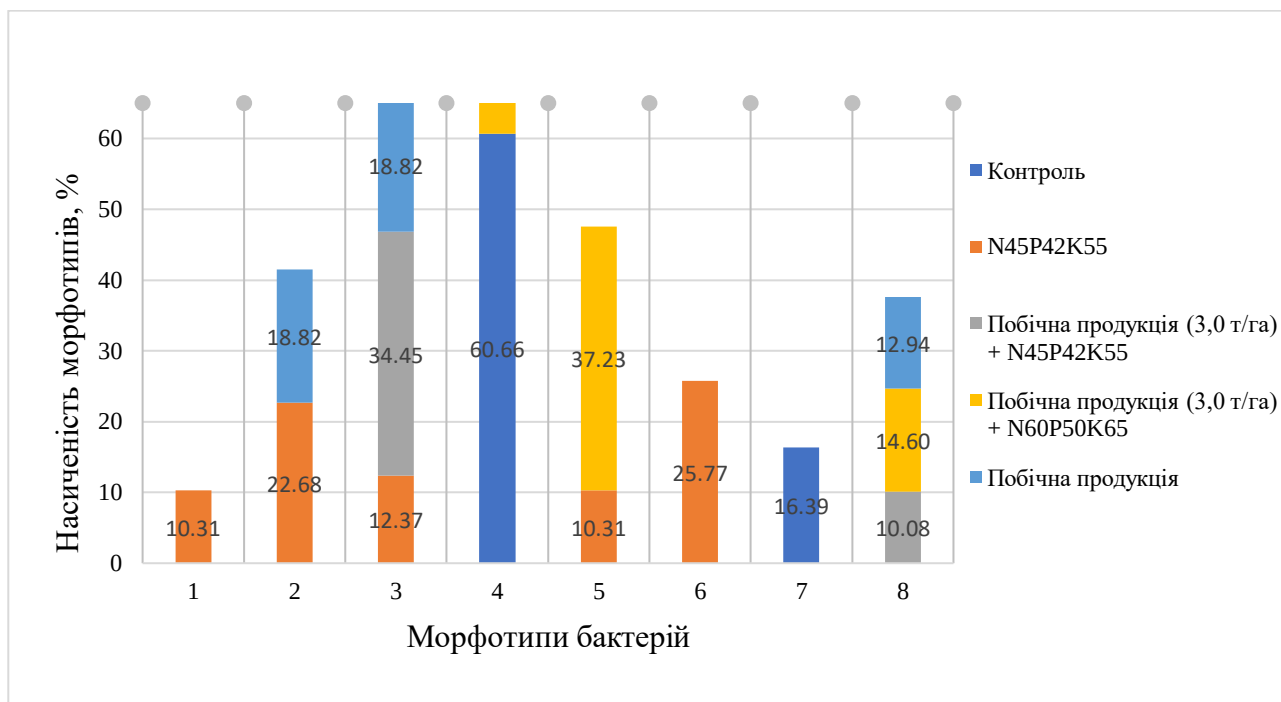


Рис. 3.13. Розподіл домінуючих морфотипів бактерій чорнозему типового за різних варіантів удобрення ґрунту (фаза цвітіння ячменю ярого)

У фазу воскової стиглості ячменю ярого було виявлено 12 домінуючих морфотипів бактерій. Серед них морфотипи з 1 по 7 були специфічними для удобрення $N_{45}P_{42}K_{55}$ (окрім морфотипу №2), ступінь насиченості яких склав 15 – 78 %. Морфотипи № 10 та 12 були специфічним тільки удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$, і показник насиченості сягнув від 15 до 22 %. Морфотипи № 2, 5, 8 та 9 були специфічним для варіанту контроль. За удобренням рослинними рештками (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ сформувалась домінуюча мікробіота з представниками морфотипів №2 та №9. Та за удобрення побічною продукцією морфотип №11 був специфічним лише для цього варіанту, та його насиченість досягла 11% (рис. 3.14.).

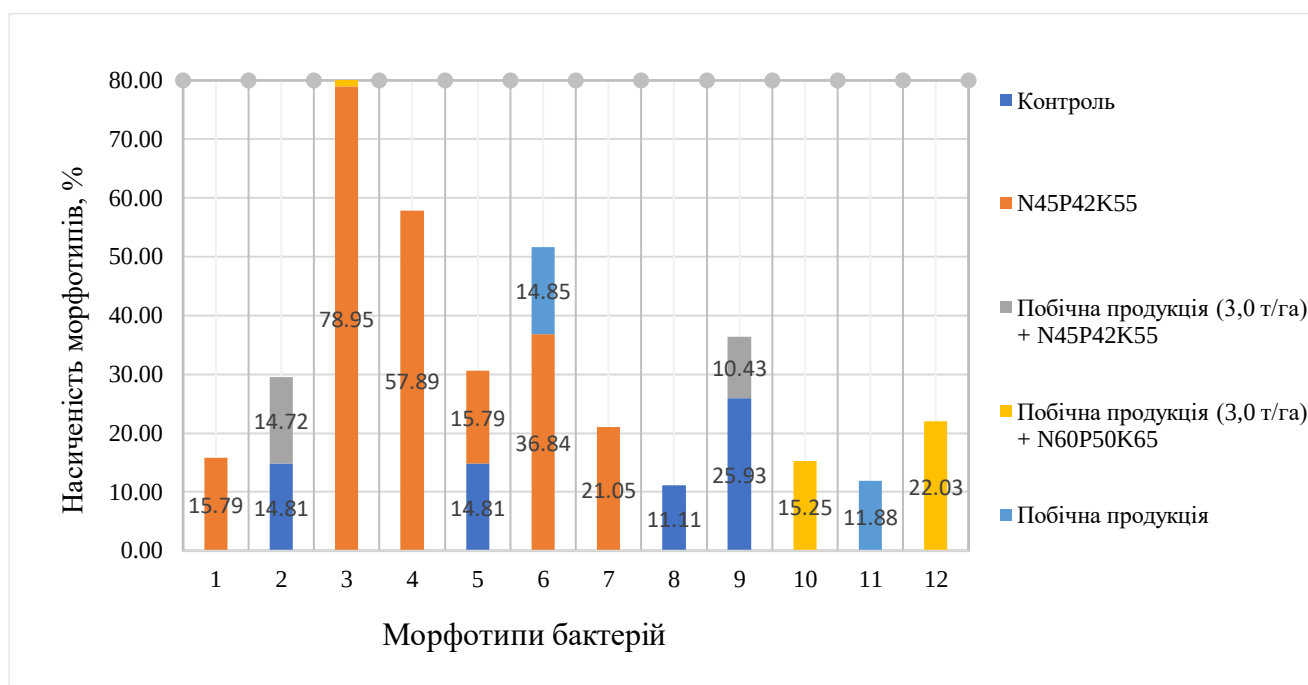


Рис. 3.14. Розподіл домінуючих морфотипів бактерій чорнозему типового за різних варіантів удобрення ґрунту (фаза воскової стиглості ячменю ярого)

Таким чином, було вивчено особливості формування якісного складу та структури розподілу домінуючих форм бактерій чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого. Збільшення різноманіття виявлених домінуючих морфотипів від 8 у фазу цвітіння та до 12 у фазу воскової стиглості обумовлено накопиченням у ґрунті значної кількості корневих ексудатів у період активної

вегетації рослин та органічних речовин за рахунок надземної та підземної біомаси рослин.

Встановлено, що формування різноманіття мікробного комплексу, збільшення видового складу мікроорганізмів з незначною кількістю домінуючих форм та більш рівномірним їх розподілом з високим ступенем різнонаправленості мікробних процесів обумовлено удобренням рослинними рештками попередника та середньою нормою мінеральних добрив, що не так сильно порушує структуру корового біому ґрунту та тримає баланс у ґрунтовому обміні речовин.

Функціональні властивості домінуючих представників мікробного комплексу мають важливе значення по взаємовідношенню з рослинами ячменю ярого і потребують подальших мікробіологічних досліджень.

3.3. Визначення спрямованості мікробних процесів чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого

Основним способом збільшення продуктивності землеробства є підвищення родючості ґрунтів. До одного з найважливіших факторів, що визначають рівень ґрунтової родючості, належить органічна речовина ґрунту і, головним чином, гумус [43]. Однак в умовах інтенсивного ведення землеробства з використанням високих норм мінеральних добрив за дефіциту свіжої органічної речовини в ґрунті значно посилюються процеси мінералізації органічної речовини.

Для розуміння векторів деструкції свіжої органічної речовини і синтезу гумусу ми враховували спрямованість мікробних процесів чорнозему типового, що супроводжують ріст і розвиток рослин ячменю. Визначали спрямованість окремих мікробіологічних процесів у ґрунті за допомогою коефіцієнтів мінералізації, педотрофності, оліготрофності та мікробної трансформації органічної речовини [16].

Коефіцієнти мінералізації — іммобілізацію сполук азоту розраховували за співвідношенням чисельності амілолітичних мікроорганізмів (каталізують реакції гідролізу різноманітних оліго- та полісахаридів за допомогою ферментів амілаз) до протеолітичних (гідролізують розщеплення білків на пептиди і амінокислоти під дією ферментів протеаз) (КАА/МПА). Чисельності амоніфікуючих, амілолітичних та педотрофних бактерій напряду залежить від активності застосування мінеральних добрив [118].

Мінералізація (амоніфікація) це процес, протягом якого редуценти, такі як бактерії і гриби перетворюють органічний азот відмерлих рослин в неорганічні форми. Асиміляція (іммобілізація) і мінералізація (амоніфікація) є протилежними процесами.

Коефіцієнт оліготрофності - відношення чисельності мікроорганізмів, що здатні засвоювати елементи живлення з дуже розріджених розчинів, до загальної чисельності евтрофних мікроорганізмів [289]. Чисельність оліготрофів визначається біологічними особливостями даної групи мікроорганізмів [75]. Так, відомо, що вони інтенсивно розвиваються на збіднених ґрунтах, що обумовлено їх трофічною специфічністю та відсутністю конкуренції, і спроможні існувати в умовах нестачі джерел енергії та живлення. А отже, оліготрофні мікроорганізми виступають своєрідними індикаторами нестачі легкодоступних елементів живлення, адже вони задовольняють свої трофічні потреби мікро кількостями поживних речовин.

Коефіцієнт педотрофності - відношення кількості мікроорганізмів на ґрунтовому агарі до кількості мікроорганізмів, що вирости на м'ясопептонному агарі. Чисельності педотрофних мікроорганізмів має пряму залежність від вмісту у ґрунті органічної речовини, яка для них є субстратним джерелом живлення та енергії. При проведенні порівняльної оцінки функціональної спрямованості мікробних процесів встановлено, що загальна біогенність (сумарну кількість мікроорганізмів) ґрунту зростає по мірі накопичення органічної речовини до кінця вегетації ячменю ярого (рис. 3.15).

Коефіцієнт мікробної трансформації – показує рівень головного процесу забезпечення ґрунтової родючості та перетворення органічних речовин у гумус. Так як органічна речовина трансформується в гумус не завжди, а тільки при певних фізико-хімічних умовах, коли мікробіота перебудовується у відповідний генно-метаболічний ланцюг, саме тому цей показник дуже важливий для розуміння процесів ґрунтоутворення та його родючості. Розраховували цей коефіцієнт як відношення кількості мікроорганізмів в 1 г абсолютно сухого ґрунту до коефіцієнта мінералізації.

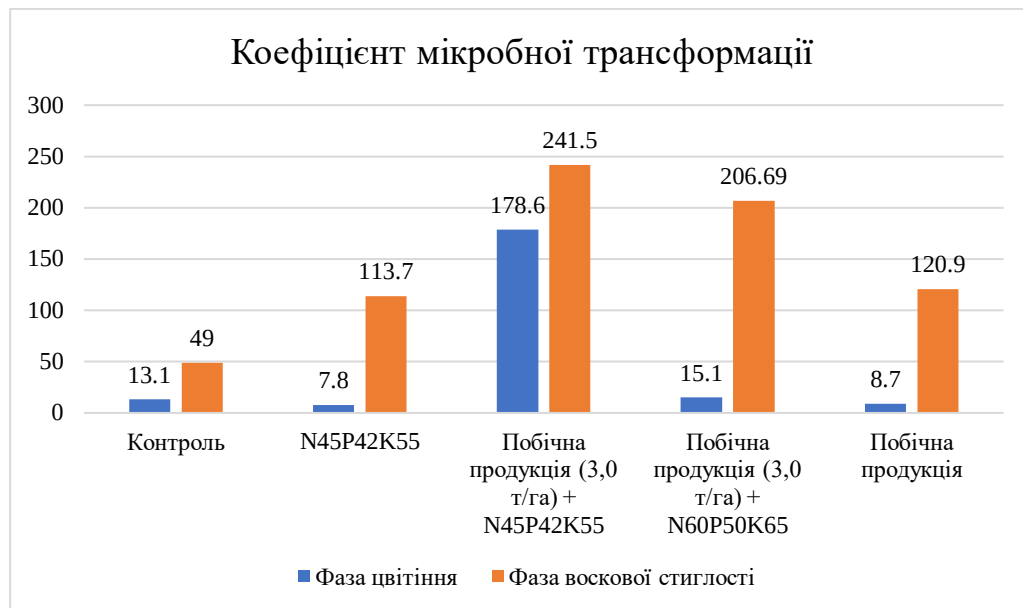


Рис. 3.15. Динаміка коефіцієнта мікробної трансформації органічної речовини в агроценозі ячменю ярого за різних методів удобрення ґрунту

Так, у фазу цвітіння ячменю ярого коефіцієнт мікробної трансформації органічної речовини становив 7,8 – 178,6 та значно не відрізнявся за варіантами досліду, за винятком варіанту удобренням побічною продукцією (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅ та сягнув значення 178,6.

Найменшим показником біогенності характеризується варіант удобренням тільки N₄₅P₄₂K₅₅ (7,8). Таке зниження сумарної кількості мікроорганізмів у даному варіанті досліду пояснюється меншим надходженням органічних рослинних решток у ґрунт.

У фазу воскової стиглості закономірно відбувалось збільшення показника трансформації органічної речовини, зокрема за удобрення побічною продукцією

(3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ показник був найвищим (241,5). А за удобренням рослинними рештками та вищою нормою мінеральних добрив – 206,69. Інші варіанти були в межах 40,9 – 120,9.

У кінці вегетації відбувається накопичення в ґрунті рослинних решток, кореневого опаду та створюються умови для активної їх трансформації сапротрофними мікроорганізмами. При цьому коефіцієнт мікробної трансформації органічної речовини значно зростає.

Статистична обробка даних показала, що його різниця по варіантах досліджу була значуща, при цьому $HP95\% = 36,10$. За даних умов при удобренні рослинними рештками у поєднанні з невеликою дозою мінеральних добрив покращується трофічний режим ґрунту та відбувається збільшення легкозасвоюваних сполук, про що свідчить зниження оліготрофного та педотрофного мікробіому.

У фазу цвітіння ячменю ярого при активізації мікробіоти спостерігали підвищення показника мінералізації, що свідчить про збільшення використання мікроорганізмами мінеральних форм азоту в своєму метаболізмі [225]. За таких умов інтенсивність процесів мінералізації та використання мікроорганізмами мінеральних форм азоту перевищує процеси амоніфікації, що призводить до посилення конкуренції за доступний азот між ними та рослинами. Тобто процеси деструкції органічної речовини переважали над її синтезом. Лише у варіанті контролю значення показника було найнижчим (0,6) і вказувало на перевагу процесів амоніфікації над мінералізацією. За інших варіантів досліджу коефіцієнт мінералізації коливався у межах 1,12 – 1,22 (рис. 3.16).

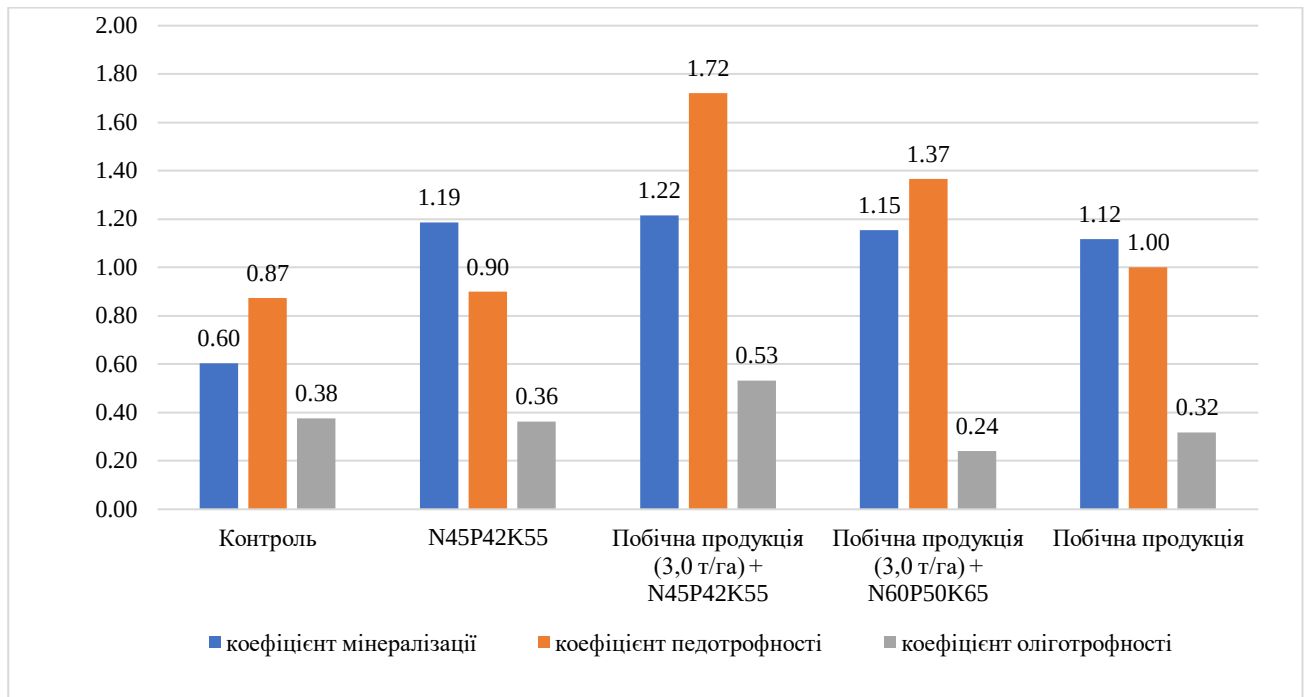


Рис. 3.16. Коефіцієнти спрямованості мікробних процесів чорнозему типового за різних систем удобрення у фазу цвітіння ячменю ярого

Значення коефіцієнта педотрофності при цьому було найвищим за удобрення рослинними рештками (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅, і становив 1,72. Підвищення показника педотрофності свідчить про збільшення інтенсивності розкладу органічної речовини ґрунту, та високий рівень спорідненості неспецифічної органічної частини ґрунту до його первинної складової – гумусу. Можна стверджувати, що в кінці вегетації біоценоз наближується до корового ценозу досліджуваної ґрунтово-кліматичної зони та мав більшу стійкість до негативних впливів з боку антропогенних факторів. За удобрення побічною продукцією та високою нормою мінеральних добрив коефіцієнт педотрофності становив 1,37; а побічною продукцією – 1,00. При контролі та удобренні лише мінеральним добривом показники були від’ємні і становили відповідно 0,87 та 0,90.

Коефіцієнти оліготрофності, хоча й були невисокими по всіх варіантах досліду, від 0,24 до 0,53. Найбільшим значення коефіцієнта було за удобренням рослинними рештками (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅, а найменшим – за удобренням рослинними рештками (3,0 т/га) + N₆₀P₅₀K₆₅.

У фазу воскової стиглості значення коефіцієнтів спрямованості мікробних процесів мали статистично значиму різницю, що підтверджує вплив різних варіантів удобрення на активність мікробного комплексу чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого. При цьому за удобренням побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ процеси амоніфікації органічної матерії переважали над процесами іммобілізації мінеральних форм азоту. Коефіцієнт мінералізації при цьому не перевищував 1 (рис. 3.17).

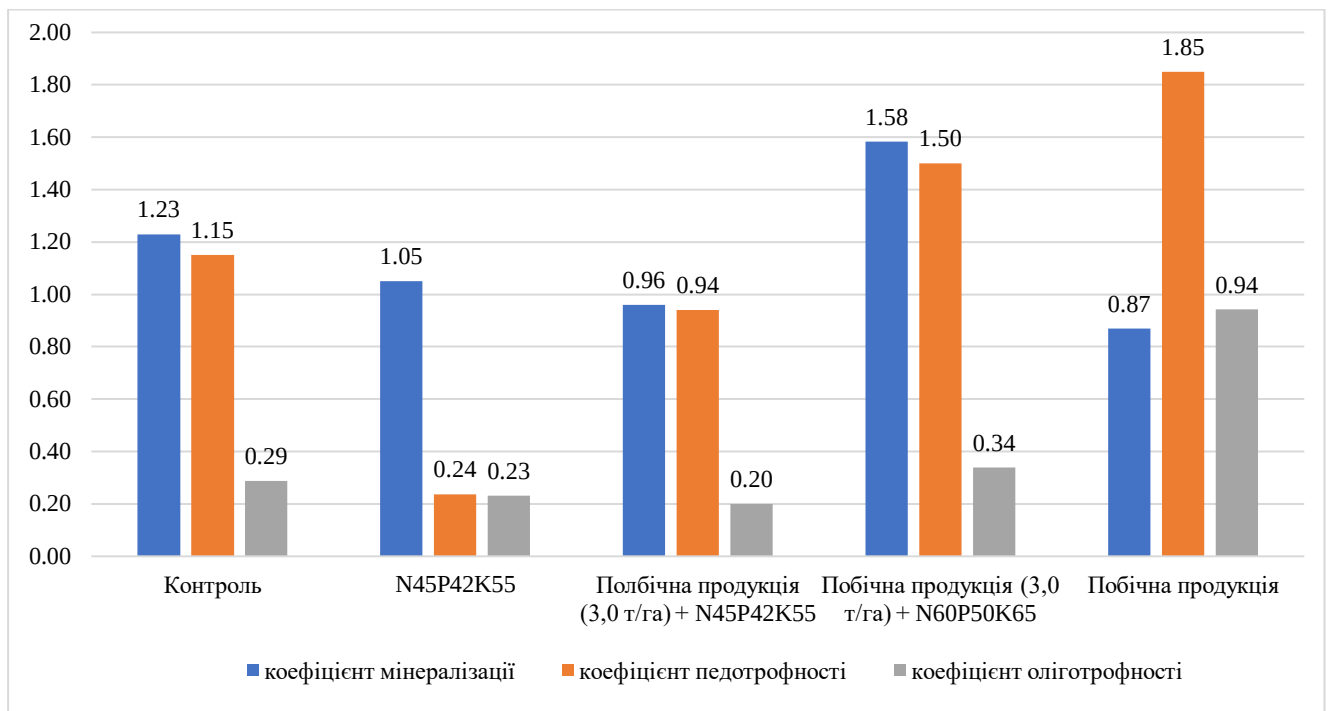


Рис. 3.17. Коефіцієнти спрямованості мікробних процесів чорнозему типового за різних методів удобрення ґрунту у фазу воскової стиглості ячменю ярого

За даних умов покращується трофічний режим ґрунту, відбувається накопичення органічної речовини та збільшення кількості легкозасвоюваних поживних речовин, про що свідчить зниження коефіцієнтів педотрофності та оліготрофності. Так, коефіцієнт педотрофності за контролю та удобрення ґрунту $N_{45}P_{42}K_{55}$ становив 1,15 та 0,24 відповідно. А за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ коефіцієнт педотрофності становив 0,94. При нормі добрив $N_{60}P_{50}K_{65}$ – коефіцієнт становив 1,50. Найвищий показник коефіцієнту був за удобрення лише самою побічною продукцією – 1,85.

Коефіцієнт оліготрофності знаходився в межах 0,23 – 0,94. За контролю коефіцієнт був найменшим і становив 0,29. При удобренні побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ – 0,20. Та найвищим коефіцієнт педотрофності був за удобрення самою побічною продукцією та сягнув значення 0,94.

Таким чином, спрямованість мікробних процесів ґрунту, що супроводжують ріст і розвиток ячменю ярого безпосередньо залежать від фаз вегетації [258]. Встановлено, що застосування варіантів удобрення ґрунту рослинними рештками попередника та мінеральними добривами дозволяє оптимізувати мікробні процеси чорнозему типового та трофічні зв'язки, що сприяють формуванню гомеостазу структури мікробного комплексу та закономірній сукцесії з відповідною функціональною активністю мікроорганізмів у певні її фази.

3.4. Визначення екологічних індексів спрямованості мікробних процесів на основі біорізноманіття мікробного комплексу чорнозему типового

Для порівняльної оцінки екологічних параметрів мікробіоти чорнозему типового, що формується в процесі росту і розвитку ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту, було розраховано індекси біорізноманіття Шеннона та домінування Сімпсона у фазі цвітіння та воскової стиглості [82]. Порівняльна оцінка екологічних параметрів показала обернено пропорційний зв'язок між показниками біорізноманіття Шеннона та домінування Сімпсона, за виключенням декількох варіантів [36].

У фазу цвітіння ячменю ярого різноманіття бактерій було на низькому рівні, при цьому значення індексу Шеннона не перевищувало 0,99 при удобренні рослинними рештками (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, за винятком варіанту удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$, де він становив 1,01 (табл. 3.1). При контролі різноманіття було на найнижчому рівні, та індекс Шеннона становив 0,58. Встановлено, що за удобрення тільки $N_{45}P_{42}K_{55}$ відбувається формування

однорідного мікробного комплексу чорнозему типового з високим ступенем домінування певних морфотипів бактерій, про що свідчить значення коефіцієнту Сімпсона – 0,41. Їх функціональні властивості по відношенню до рослин, процесів ґрунтоутворення та текстура в профілі ґрунту потребують вивчення в подальшому. Слід зазначити, що за удобренням побічною продукцією у фазу цвітіння ячменю ярого спостерігався більш рівномірний розподіл якісного складу прокаріот зі зниженням ступеня домінування окремих видів, про що свідчить зниження значення індексу Сімпсона до 0,20 та 0,14 (фаза цвітіння та воскової стиглості відповідно).

У фазу воскової стиглості ячменю ярого рівень різноманіття зростає, порівняно з фазою цвітіння, що підтверджується якісним аналізом структури мікробного комплексу. Це свідчить про збільшення в ґрунті поживних легкозасвоюваних речовин, які стимулюють розвиток мікроорганізмів [198].

Найнижчими значення різноманіття Шеннона залишались за контролю та удобренням $N_{45}P_{42}K_{55}$ – 0,82 та 0,84 відповідно.

Таблиця 3.1

Порівняльна оцінка екологічних індексів у фазі цвітіння та воскової стиглості ячменю ярого

Системи удобрення ґрунту	Фаза цвітіння		Фаза воскової стиглості	
	Індекси			
	Шеннона	Сімпсона	Шеннона	Сімпсона
Контроль	0,58	0,16	0,84	0,26
N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	0,87	0,41	0,84	1,19
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	0,99	0,12	1,21	0,07
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₆₀ P ₅₀ K ₆₅	1,01	0,15	1,05	0,12
Побічна продукція	0,90	0,20	0,91	0,14

За комбінованого удобрення рослинними решками та мінеральними добривами ґрунту у фазу воскової стиглості біорізноманіття бактерій чорнозему типового було найвищим, при цьому значення індексу Шеннона становило 1,21 при використанні рослинних решток (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$; та при використанні рослинних решток попередника (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ - 1,05.

Значення індексів Сімпсона у фазу воскової стиглості ячменю ярого свідчать, що рівень домінування певних морфотипів у бактеріальному ценозі зменшується, що сприяє формуванню більш різноманітного мікробного комплексу [204]. Найнижчим значення індексу Сімпсона було зафіксовано за удобренням побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$.

Найвищим воно було за удобрення ґрунту лише мінеральним добривом $N_{45}P_{42}K_{55}$, значення індексу Шеннона при цьому становило 0,84. За контролю рівень різноманіття бактерій залишався найнижчий, порівняно з варіантами комбінованого удобрення. Індокси Шеннона при цьому становили 0,82 при контролі та 0,84 при удобренні $N_{45}P_{42}K_{55}$.

Це призводить до формування мікробного комплексу з чітко вираженим високим ступенем домінування окремих видів бактерій та зниження різнонаправленості мікробних процесів за даних умов [295].

При використанні побічної продукції в якості удобрення показники індексів Шеннона та Сімпсона були досить рівномірними і у фазі цвітіння, і у фазі воскової стиглості ячменю ярого. Індекс Шеннона сягнув значення 0,90 та 0,91 у фазі цвітіння та воскової стиглості відповідно. А індекс домінування Сімпсона становив 0,20 та 0,14 також відповідно до фази цвітіння та воскової стиглості.

Таким чином, за результатами порівняльного аналізу екологічних індексів встановлено, що зростання біорізноманіття бактерій чорнозему типового відбувається по мірі накопичення легкозасвоюваних поживних речовин в онтогенезі рослин ячменю ярого [67]. Застосування комбінованої системи удобрення ґрунту рослинними рештками та мінеральним добривом сприяє формуванню різноманіття бактеріального комплексу чорнозему типового в

агроценозі ячменю ярого, про що свідчать значення індексу Шеннона (0,99 – 1,21 – фаза цвітіння; та 1,05 – 1,01 – фаза воскової стиглості відповідно до меншої та більшої норми внесення мінерального добрива) та більш рівномірному розподілу бактерій по насиченості морфотипів, про що свідчить зниження індексу домінування Сімпсона (0,12 – 0,15 – фаза цвітіння; та 0,07 – 0,12 – фаза воскової стиглості) [136]. Застосування удобрення у вигляді лише мінерального добрива призводить до зниження бактеріального біорізноманіття ґрунту (індекси Шеннона: 0,87 – цвітіння, 0,84 – воскова стиглість) та формування однорідного мікробного комплексу з високим ступенем домінування певних морфотипів бактерій на початку (0,41); та особливо в період активної вегетації рослин ячменю ярого (1,19).

3.5. Висновки до розділу

За результатами аналізу чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп чорнозему типового в агроценозі ячменю встановлено, що застосування системи із внесенням удобрення у вигляді побічної продукції (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ сприяє формуванню відповідних трофічних зв'язків в структурі мікробного комплексу та збільшенню чисельності амоніфікувальних мікроорганізмів до 17,5 – 7,9 млн/г ґрунту; азотфіксаторів до 16,7 – 3,8, іммобілізаторів мінерального азоту до 18,1 – 7,3 млн/г ґрунту, спороутворюючих до 21038 – 4160,5 тис/г ґрунту, целюлозоруйнівних до 867,8 – 214 тис. КУО/г ґрунту у фазу цвітіння ячменю ярого. Та зменшенню чисельності мікроорганізміволіготрофів до 8,7 – 0,5 та педотрофів до 22,5 – 0,8 млн КУО/г ґрунту у фазу воскової стиглості ячменю ярого. За даних умов відбувається оптимізація поживного режиму ґрунту, підвищення його біологічної активності, що сприяє накопиченню легкозасвоюваних поживних речовин та живленню рослин.

За результатами аналізу структури якісного складу досліджено розподіл домінуючих форм бактерій чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого та

встановлено, що збільшення різноманіття виявлених морфотипів до 67 у фазу цвітіння та до 84 у фазу воскової стиглості обумовлено накопиченням у ґрунті значної кількості корневих ексудатів у період активної вегетації рослин та органічних речовин за рахунок надземної та підземної біомаси рослин. Виявлено, що формування різноманіття мікробного комплексу, збільшення видового складу мікроорганізмів з незначною кількістю домінуючих форм до 11% у фазу цвітіння, до 9 % у фазу стиглості та більш рівномірним їх розподілом з високим ступенем різнонаправленості мікробних процесів обумовлено розкладом рослинних решток ($3,0 \text{ т/га}$) + $\text{N}_{45}\text{P}_{42}\text{K}_{55}$ до більш легкозасвоюваних сполук.

При проведенні порівняльної оцінки функціональної спрямованості мікробних процесів показано, що загальна біогенність ґрунту зростає по мірі накопичення органічної речовини до кінця вегетації ячменю ярого. Застосування комбінованого органо-мінерального удобрення дозволяє оптимізувати мікробні процеси, що супроводжують ріст і розвиток ячменю ярого у період його вегетації. За даних умов покращується трофічний режим ґрунту, відбувається накопичення органічної речовини та збільшення кількості легкозасвоюваних поживних речовин, що сприяє зниженню оліготрофності та педотрофності ґрунту у 1,5 – 2 рази.

Результати порівняльного аналізу екологічних індексів показали, що застосування саме удобрення побічною продукцією з меншою нормою мінерального добрива сприяє формуванню різноманіття бактеріального комплексу чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого, про що свідчать значення індексу Шеннона (0,99 – 1,21 – відповідно фаза цвітіння та фаза воскової стиглості) та більш рівномірному розподілу бактерій по насиченості морфотипів, про що свідчить зниження індексу домінування Сімпсона (0,12 – фаза цвітіння, 0,07 – фаза воскової стиглості). Застосування удобрення тільки мінеральним добривом призводить до зниження бактеріального біорізноманіття ґрунту та формування однорідного мікробного комплексу з високим ступенем

домінування певних морфотипів бактерій на початку та в період активної вегетації рослин ячменю ярого.

РОЗДІЛ 4

ОЦІНКА МЕТАГЕНОМУ ПРОКАРІОТНОГО КОМПЛЕКСУ ЧОРНОЗЕМУ ЗА АГРАРНОГО ВИКОРИСТАННЯ

4.1. Оцінка сучасної метагеноміки у збереженні родючості ґрунту

Поява молекулярно-біологічних методів дослідження та метагеноміки, що базуються на виділенні тотальної ДНК із ґрунту та подальшому аналізі геному, стала новим етапом у розвитку ґрунтової мікробіології. Ці методи надали прямий доступ до колосального генетичного розмаїття «некультивованої більшості» мікроорганізмів у ґрунті [100]. Виявилося, що традиційні уявлення про таксономічний склад та екологію мікробного населення ґрунтів вимагають деякого перегляду та переосмислення.

Ґрунт є найбагатшим середовищем з погляду мікробного різноманіття. Один грам ґрунту може містити мільярди чи десятки мільярдів клітин прокаріотів і кілька кілометрів грибного міцелію. Довгий час вивчення мікробного складу ґрунтів обмежувалося методом культивування на живильних середовищах. Однак ще в середині 1980-х років стало зрозуміло, що ті мікробні колонії, що культивуються на чашках Петрі, становлять лише незначну частку (0.1–5%) від загального пулу мікроорганізмів у ґрунті [53].

Двома головними методами вивчення ґрунтової ДНК мікроорганізмів на даний час є метагенетичний та метагеномний підходи. Метагеномний підхід ґрунтується на аналізі метагенома – сукупного геному будь-якої спільноти організмів. Метагенетичний аналіз розглядає сукупність окремих цільових генів [119, 220].

Метагеномні дослідження ґрунтів все ще мало поширені. Це пов'язано, перш за все, з недостатньою глибиною секвенування (кількість разів секвенування кожного нуклеотида; що визначає точність позиції нуклеотиду в послідовності), яку можуть дати сучасні секвенатори, а також з дуже високою вартістю такого аналізу [15]. Крім того, великою проблемою є обробка та інтерпретація результатів. Ґрунтовий метагеном, що отримуємо на виході, являє

собою ієрархічну структуру, в якій ідентифіковані гени організмів, що живуть у ґрунті, збираються у функціональні субсистеми за принципом єдності виконуваної функції. До складу метагенома входять функціональні субсистеми генів, відповідальні за метаболізм білків, жирів та вуглеводів, вірулентність, дихання, відгук на стрес тощо [185]. На нижчому ієрархічному рівні можливий аналіз частки генів, відповідальних за процеси метаболізму вуглецю і азоту, синтез чи розкладання певних сполук. Таким чином, метагеном ґрунту є його функціональним профілем, складеним із генетичної інформації.

Метагеномні дослідження дуже ефективні для пошуку нових метаболітів (насамперед антибіотиків), ферментів і біоактивних молекул. Також на основі аналізу генів у геномі можна прогнозувати та підбирати умови виділення в чисту культуру некультивованих мікроорганізмів [235]. Нарешті, висока чисельність у ґрунті бактерій, що продукують антибіотики, робить ґрунт найважливішим резервуаром генів, відповідальних за стійкість до них [140]. Даний напрям безпосередньо пов'язаний зі здоров'ям людини, тому ґрунтова метагеноміка може бути використана для вирішення багатьох завдань при клінічних дослідженнях.

Також мікробний біом та метагеном біоценозу ґрунту зумовлює основну функціональну роль у кругообігу речовин та енергії і є ключовими складовими елементами трансформації органічних решток, таких як мінералізація та іммобілізація біогенних елементів. Процеси синтезу і накопичення органічної речовини в агроценозах в першу чергу залежать від структури, різноманіття та активності мікробіоти, при цьому вона має прямий взаємозв'язок з умовами самого ґрунтового середовища. Тому дослідження біому ґрунтових мікроорганізмів є науковою основою для розробки заходів, що спрямовані на розширене відтворення родючості чорноземів [248].

Застосування молекулярно-біологічних методів розширило можливості комплексних досліджень, дало змогу встановити, що мікробним системам належить первинна роль у формуванні біому та метагеному, і, відповідно, продуктивності ґрунту [237]. Але активне землекористування призводить до

суттєвого порушення біологічних систем ґрунту. Один із шляхів вирішення цієї проблеми – детальне та комплексне дослідження біологічних ресурсів і структури мікробного різноманіття, яке формується за аграрного використання ґрунтових ресурсів. В процесі всієї історії землекористування суттєво змінювалась структура мікробного біому на рівні домінуючих (корових) трофічно значущих видових комплексів [193]. Тому внаслідок цих змін відбувалось збіднення спектру біогенних елементів і виснаження ґрунтових ресурсів. Таким чином, застосування агротехнічних заходів обумовлює структурно-функціональні зміни метагеному прокаріот та спрямованість, в першу чергу, трофічних вуглецевих мікробних потоків у ґрунті [280]. Органо-мінеральна система удобрення чорнозему типового з невеликими нормами внесення добрив, сприяє функціональній активності мікробіоти в рослинно-мікробній системі ризосфери, в якій метаболічно перетворюються фотосинтезовані вуглецевмісні сполуки корневих ексудатів, і саме з ними пов'язані процеси ґрунтоутворення та баланс біогенних елементів у ґрунті [265]. Підвищена кількість вуглецевмісних органічних речовин як добрив обумовлює високий рівень мікробного біорізноманіття, а також активізацію складних мікробних процесів трансформації вуглецевмісних сполук, що сприяє покращенню екологічного стану та створює умови для гомеостатичного формування агроєкосистем в цілому [266]. Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях природних агроценозів, а саме кількісна оцінка прокаріотного комплексу, дасть змогу сформувати базу даних біологічного фонду чорноземів України цілинних та освоєних земель, що є частиною постійного мікробіологічного моніторингу [96]. Оцінка біомаси прокаріотів один із методів, що дозволить науково пояснити застосування систем обробітку і удобрення, і дасть змогу управляти ґрунтовими процесами. Дослідження генетичної різноманітності прокаріотних генотипів дозволить створити банк даних генетичних ресурсів біоти чорноземів, що дасть змогу науково обґрунтовано використовувати саме ті агрозаходи, які найменше

порушуватимуть гомеостаз ґрунтів, безпомилково здійснювати їх економічну і екологічну оцінку та ін [202].

Мета нашої роботи – дослідити молекулярно-біологічними методами структуру мікробного комплексу та біорізноманіття чорнозему типового, зміни домінуючих угруповань мікробіоти під впливом різних варіантів удобрення, оцінити біомасу за кількістю тотальної ДНК ґрунтових організмів [26].

4.2. Вплив систем удобрення на формування метагеному ґрунтових прокаріот

Надмірні норми мінеральних добрив, підсилюючи процеси мінералізації органічних речовин, які обумовлюють мікроорганізми і їх життєдіяльність, є передумовою втрат гумусу в ґрунті [175]. Тому важливо сучасними методами оцінити якісний і кількісний склад прокаріотів чорноземних ґрунтів та їх зміни під впливом удобрення. Кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у чорноземах типових залежала від варіантів удобрення (рис. 4.1).

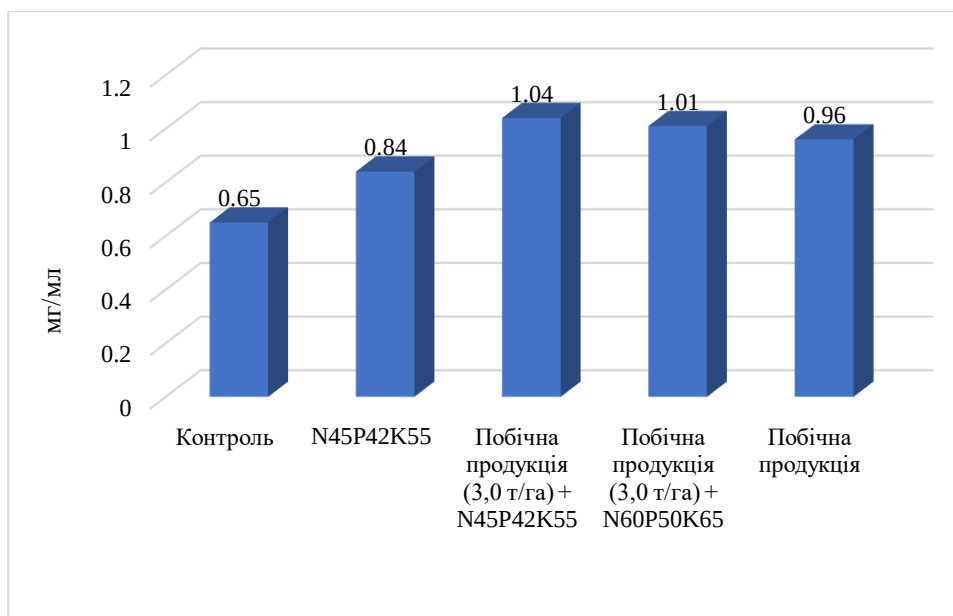


Рис. 4.1. Кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у чорноземі типовому за різних варіантів удобрення ґрунту (середні дані, Панфілівська дослідна станція)

Порівнюючи кількість загальної ДНК ґрунтових мікроорганізмів у контрольних варіантах, виявили, що найвище значення спостерігалось за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$, найменше – у дослідному варіанті з контролем. Більша кількість ДНК ґрунтових мікроорганізмів є передумовою збереження рівноваги екосистеми під впливом зовнішніх факторів [134, 234].

Органо-мінеральна система удобрення ґрунту та внесення рослинних решток попередника і мінеральних добрив приводили до змін кількості ДНК мікроорганізмів порівняно з контролем. Так, найвищі значення фіксувались за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$. Трошки менші значення були при дослідженні варіанту удобрення рослинними рештками з вищою нормою мінеральних добрив.

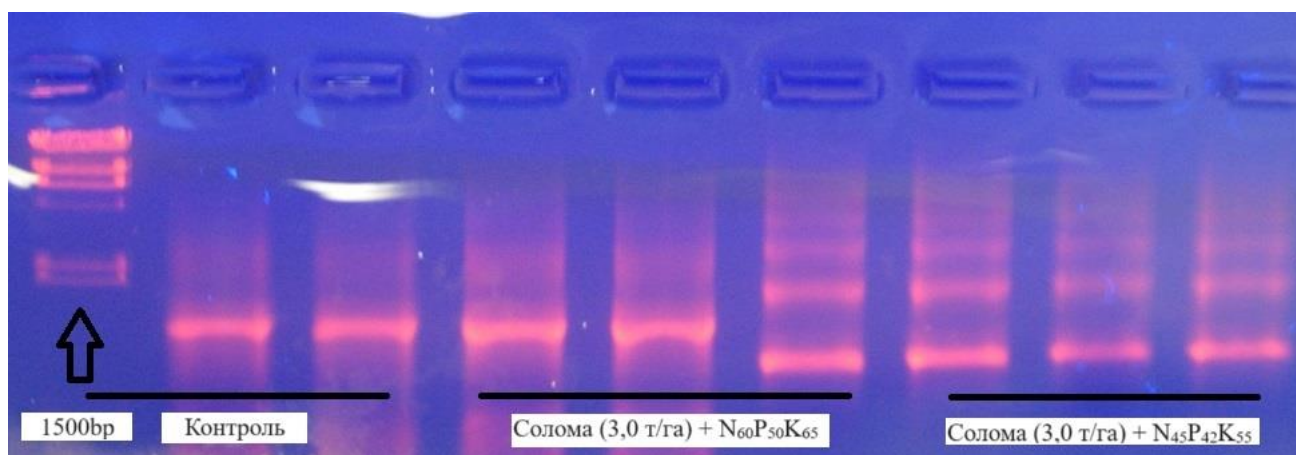
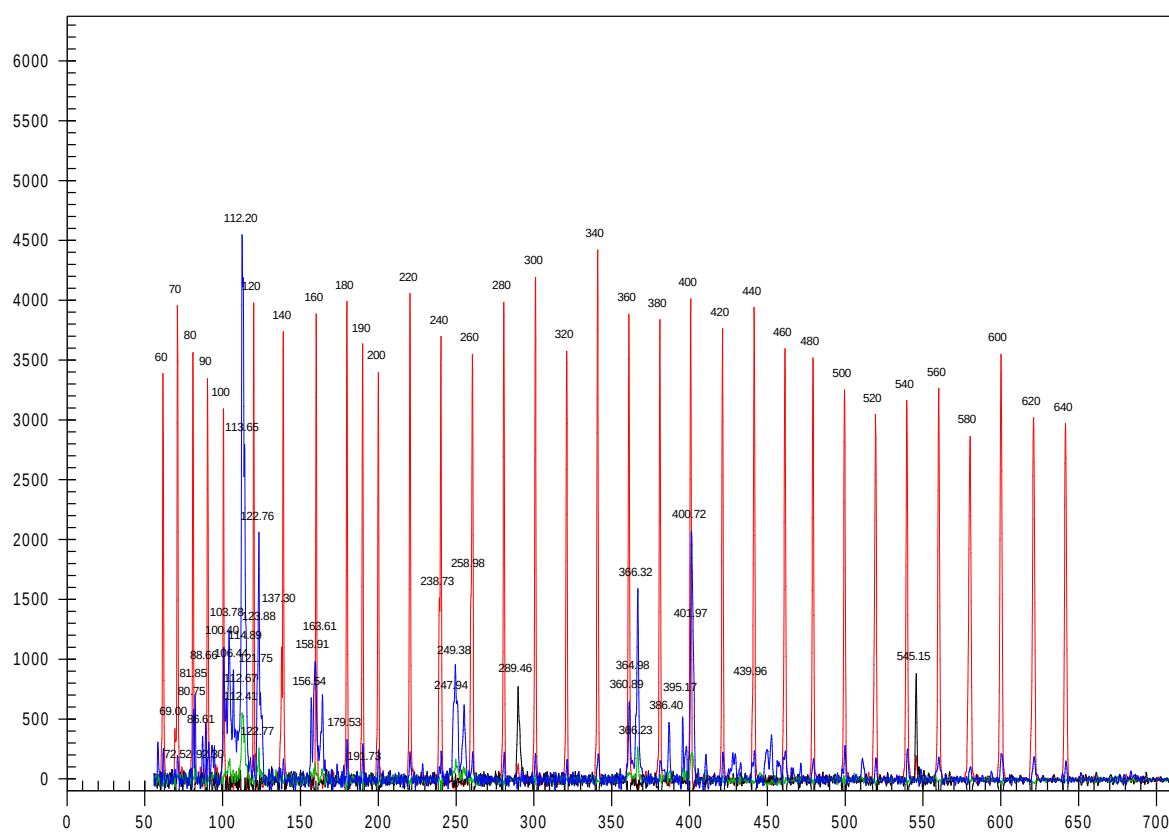


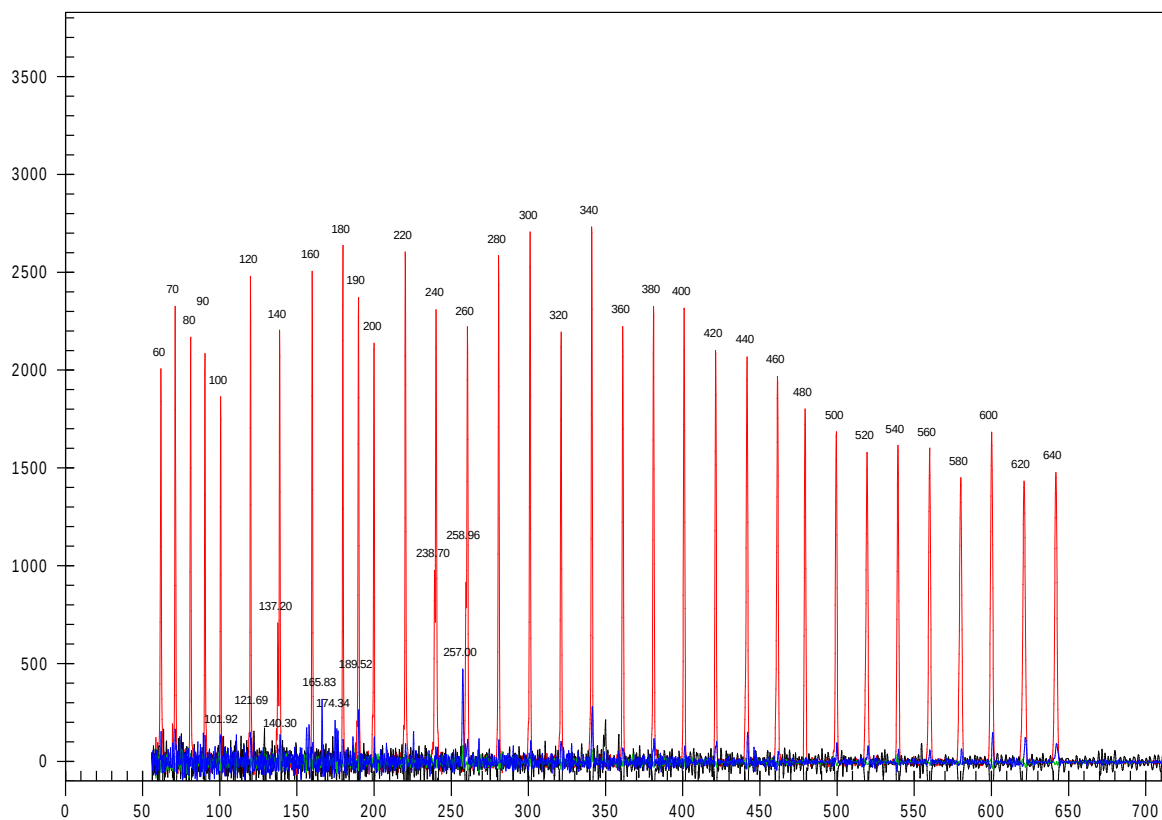
Рис. 4.2. Результат електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК в агарозному гелі

Тобто, збалансоване удобрення органо-мінеральним добривом створювало кращі умови для розвитку мікроорганізмів порівняно з іншими варіантами. Аналіз профілів tRFLP прокаріотного комплексу під впливом різних варіантів удобрення ґрунту (рис. 4.2), надає можливість оцінити біорізноманіття ґрунтового мікробного комплексу [54].

Побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$



Побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$



Контроль

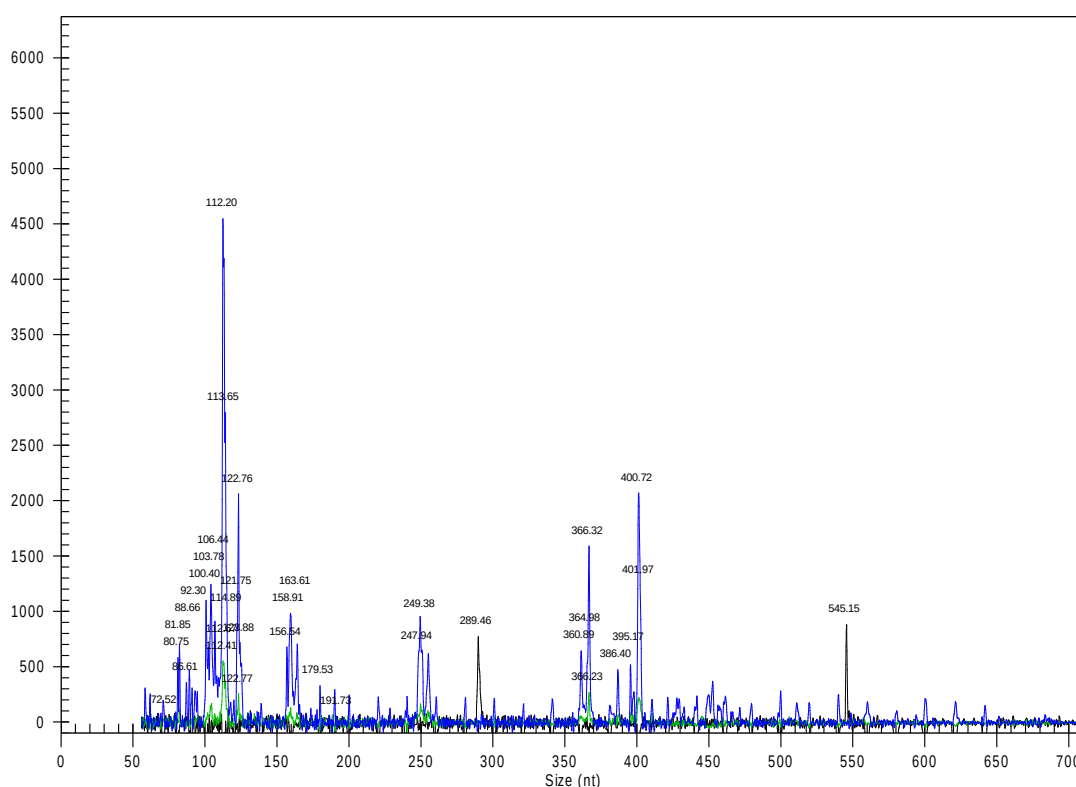


Рис. 4.3. Вплив варіантів удобрення на генетичну різноманітність прокаріот у чорноземі типовому (профіль tRFLP). На осі абсцис вказаний розмір рестрикційних фрагментів, bp (пар нуклеотидів), на осі ординат – інтенсивність флуоресценції

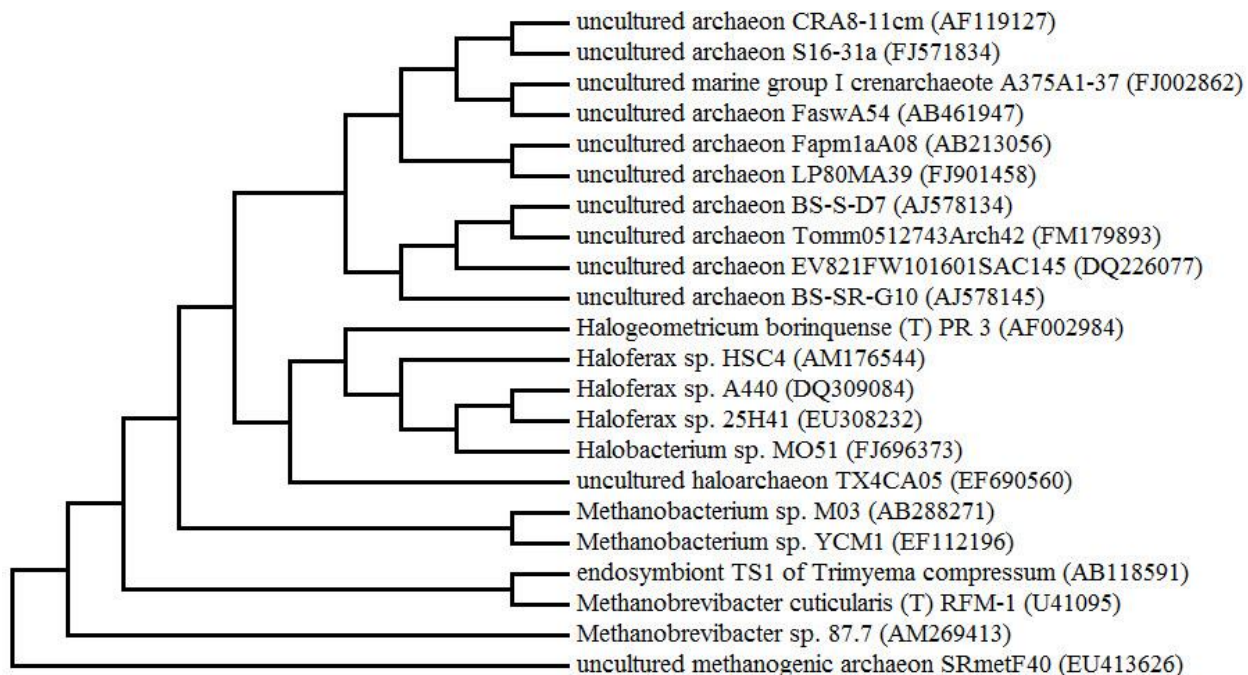
Так, у варіанті удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ формується найбільша кількість термінальних фрагментів (33 фрагм.) зі значним ступенем детекції (ступінь домінування), за удобрення рослинними рештками (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ – дещо нижчий, але також досить високий (30 фрагм.). І найнижча кількість фрагментів (14) у варіанті контроль. На фонах різного удобрення ґрунту виявилась різна детекція термінальних фрагментів (різноманіття таксономічних одиниць та відповідно видового багатства) [116]. Слід зазначити, що склад мікроорганізмів за удобрення рослинними рештками попередника та різних норм мінерального добрива був близьким один до одного, що свідчить про схожість за впливом цих заходів на мікробіоту.

Філогенетичний аналіз дендрограм (рис. 4.3) свідчить про ширшу і складнішу побудову філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів.

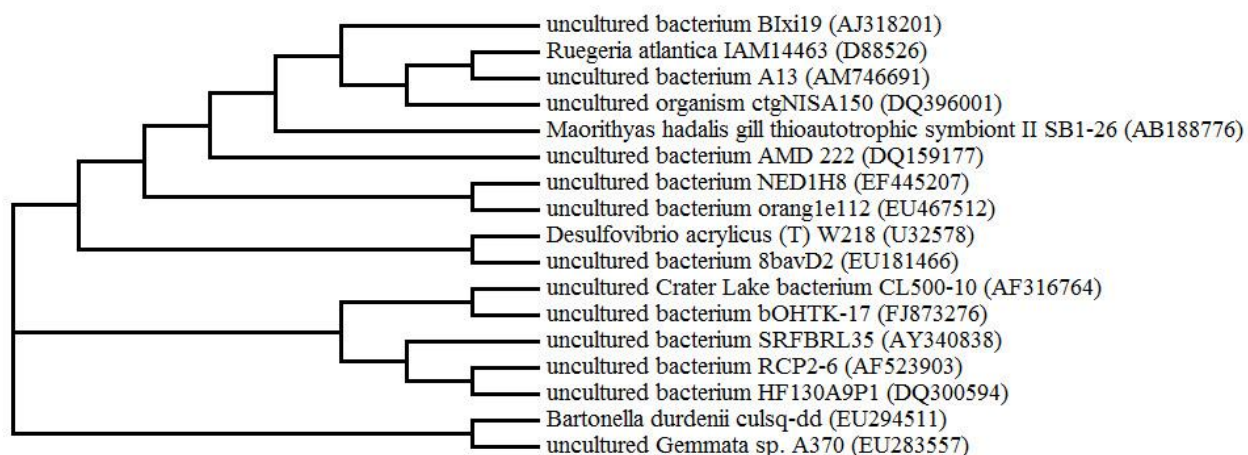
Тобто, при контролі біорізноманіття прокаріотного комплексу у 2 рази менше ніж на фоні удобрень. Домінування морфотипів за інтенсивністю флуоресценції було наступним: найвище – за удобрення побічною продукцією + $N_{45}P_{42}K_{55}$, далі – за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$, та контролю. Отже, система удобрення є потужним інструментом, що впливає на різноманіття прокаріот у чорноземі типовому.

Аналіз прокаріотного комплексу профілів tRFLP, отриманих із зразків чорноземів типових, надає можливість зрозуміти зміни біорізноманіття мікробного комплексу ґрунту у різних варіантах удобрення стаціонарного досліду [260]. Застосування удобрення побічною продукцією + $N_{45}P_{42}K_{55}$ призводило до формування мікробоценозів, які склалися з 2 основних кластерів, 6 підкластерів, 22 видів, відповідали п'яти домінантним генотипам, що належать до представників філотипів *Halogeometricum*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, значну частину з яких становлять некультивовані види ґрунтових бактерій. (рис. 4.3).

Побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$



Побічна продукція (3,0 т/га) + N₆₀P₅₀K₆₅



Контроль

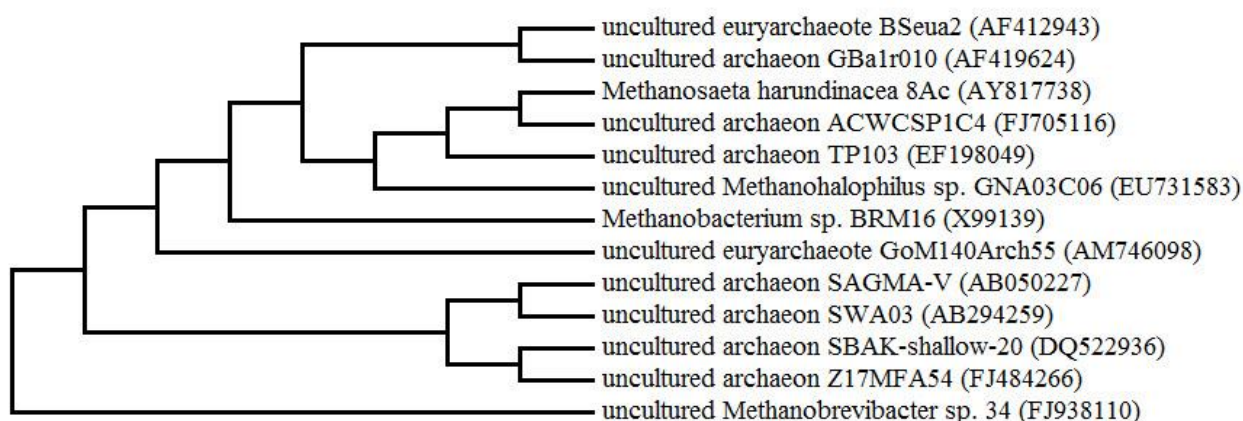


Рис. 4.4. Генетичний поліморфізм прокаріотів у чорноземі типовому за різних варіантів удобрення ґрунту

За удобрення рослинними рештками (3,0 т/га) + N₆₀P₅₀K₆₅ сформувався мікробоценоз, який складався з трьох основних кластерів, 7 підкластерів та 17 видів родів *Desulfovibrio*, *Bartonella*, *Ruegeria* та *Maorithyas*. З них 76% були види, що не культивуються на поживних середовищах. Та при контролі сформувався мікробоценоз, який складався з двох основних кластерів, шести підкластерів та 13 видів, що належать до таких представників філотипів: *Methanosaeta*, *Methanobacterium* та *Methanobrevibacter*.

Отже, в усіх варіантах обробітку ґрунту були присутні представники родів прокаріотів, які беруть участь у трансформації органічних сполук, кругообігу азоту, фосфору, калію, сірки, вуглецю [293].

Оцінка екологічних параметрів прокаріотного ґрунтового комплексу та їх зміни під впливом різних варіантів удобрення та контролю (табл. 4.1) свідчать про наступне: найвищі значення індексів різноманіття були отримані при застосуванні органо-мінеральної системи удобрення, що впливає на гумусонакопичення. Тому найбільш стійкими вважаються системи, які мають високе біорізноманіття [68].

Таблиця 4.1

Вплив варіантів удобрення на екологічні індекси домінування і мікробного біорізноманіття чорнозему типового

Системи удобрення ґрунту	Фаза цвітіння	
	Індекси	
	Шеннона	Сімпсона
Контроль	0,52	0,23
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	1,13	0,12
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₆₀ P ₅₀ K ₆₅	1,02	0,18

4.3. Висновки до розділу

Метагеномний аналіз біорізноманіття ґрунтового мікробіому чорнозему типового стаціонарного досліджу Панфілівської дослідної станції показав, що у варіанті контроль розвивалось у 2–3,8 рази менше видів бактерій порівняно з варіантом застосування органо-мінеральної системи удобрення. При цьому варіанти удобрення із рослинними рештками попередника та мінеральним добривом призводили до розвитку бактерій (до 70%), які не культивуються на селективних середовищах. Але варіант без добрив потребує постійного мікробіологічного моніторингу для припинення процесів втрати ґрунтової родючості. Органо-мінеральна система удобрення ґрунту формувала більші показники біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів (в 3–5,7 рази порівняно з контролем).

Таким чином, варіанти удобрення ґрунту, впливаючи на надходження і розподіл поживних решток і добрив, фізико-хімічні і фізичні показники ґрунту, змінювали показники і будову філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів. Ширша і складніша будова філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів була за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ представлена 2 основними кластерами, 6 підкластерами, що відносяться до представників 22 видів, 54% з яких некультивовані. У варіанті удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{60}P_{50}K_{65}$ – 3 основних кластери, 7 підкластерів та 17 видів, 76 % з яких некультивовані. Найбідніший мікробний комплекс порівняно з вищенаведеними варіантами удобрення сформувався за контролю: 2 основних кластери, 6 підкластерів та 13 видів, 85% некультивованих.

Системи удобрення ґрунту, у значній мірі впливають на філотипове різноманіття ґрунтових мікроорганізмів з найскладнішою його будовою за використання побічної продукції (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ДОМІНАНТНИХ МОРФОТИПІВ РИЗОСФЕРИ ЯЧМНЮ ЯРОГО

5.1. Дослідження ризосферного біому та його значення для сучасного сільського господарства

Мікробний біом і метагеном біоценозу ґрунту визначають основну функціональну роль у кругообігу речовин та енергії та є ключовими компонентами перетворення органічних залишків, як їх мінералізації, так і іммобілізації поживних речовин [92, 80]. Ризосфері рослин характерні складні трофічні ланцюги, водний потенціал та окисно-відновні реакції, що відрізняють цю біологічну систему від біому всього ґрунту. Локалізація в межах кореневої системи, активність та функціональність ризосферної біоти в ній різноманітна [9]. Складні системи прикореневої зони, складаються із популяцій архей, бактерій, грибів, найпростіших та тварин. Співіснують та функціонують разом з рослинами, та життєдіяльність кожного з них має значення та вплив у просторово-часових масштабах, захоплюючи широкий спектр таксонів. Особливості взаємодії та трансформації біогенних елементів проходять за рахунок ресурсів, таких як джерела органічного вуглецю, мінеральні поживні речовини та вода – саме вона за допомогою ризосферної біоти визначає напрямки потоків енергії та формує структуру ценозу, екосистеми та її властивості в цілому [299].

Надмірне використання мінеральних добрив і пестицидів змінило традиційні методи вирощування сільськогосподарських культур, особливо в другій половині 20 століття [222]. Ситуація стала настільки тривожною, що зараз усвідомлюється роль мікроорганізмів у розвитку сталого сільського господарства. З метою збільшення сільськогосподарського виробництва спостерігається тенденція до застосування мікробних агентів в агротехніці біологічних систем.

У більшості країн світу зернові є основною продовольчою культурою сільського господарства. Ячмінь ярий посідає одне з перших місць в Україні за посівними площами. Велике економічне значення має задоволення потреб населення якісною продукцією. Формування ризосфери ячменю ярого є життєво-важливою основою гомеостазу онтогенезу рослин [277]. Ефективна взаємодія мікроорганізмів відбувається на всіх рівнях, починаючи з молекулярного. Функціонально значущі ризосферні мікроорганізми визначають до 70% оптимального розвитку рослин. Біологічні та функціональні особливості мікробних угруповань ризосфери оцінюються за їх ефективною взаємодією в рослинно-мікробних системах [288].

Дослідження біологічних функціональних особливостей рослинно-мікробних взаємодій, груп мікроорганізмів, орієнтації процесів живлення, зокрема, біологічної трансформації вуглецю та азоту в ґрунті значною мірою сприяє ефективній побудові біологічних систем у сільськогосподарських біомах. Крім того, іммобілізуючи виділення органічних форм у вигляді накопиченої біомаси можуть відігравати важливу роль у розвитку стійких методів сільськогосподарського виробництва [45].

Почали ми свої дослідження з вивчення морфологічних та функціональних особливостей домінантних морфотипів, їх фізіологічного стану щодо джерел вуглецю та взаємодії з рослинами для подальшого вивчення як мікроорганізмів, що стимулюють ріст рослин (PGPR) [90]. Саме тому вивчення біому ґрунтових мікроорганізмів (особливо домінантних морфотипів) є науковою основою для розробки заходів, спрямованих на посилене відтворення родючості чорнозему типового.

Провівши три роки польових дослідів в кінцевому результаті були виділені два домінуючих ізоляти бактерій з ризосфери ячменю ярого в районі Лівобережної України.

Вивчення мікроорганізмів неможливо без їх класифікації та приналежності окремих їх колоній до тих чи інших біологічних видів, родів, типів і так далі.

Процес ідентифікації організмів є одним з найбільш важливих і трудомістких етапів проведення біологічних досліджень [138].

Загалом для побудови схеми ідентифікації обирають такі признаки, котрі легко визначити. Тоді як признаки, що використовують для класифікації часто потребують складних методів (наприклад гомологія ДНК) [283]. Ідентифікація багатьох родів та видів не може бути основана всього лише на невеликій кількості тестів, а лише на їх повному наборі. Саме тому ми і використовували набір для швидкого та зручного проведення такого дослідження - KB009 ТМ HiCarbo Kit.

5.2. Визначення морфологічних, функціональних та біохімічних особливостей домінантних морфотипів ризосферних мікроорганізмів

В ході нашої роботи два найбільш перспективні два домінантні морфотипи були відібрані для подальших досліджень, оскільки вони проявили одразу антагоністичну активність при висіву ґрунтової суспензії на поживні середовища. Мікроорганізми досліджували за їх формою, розміром, пігментацією та краєм разом із морфологією колоній/клітин окремих ізолятів [38]. Результати морфологічних досліджень колоній та клітин представлено у табл. 5.1.

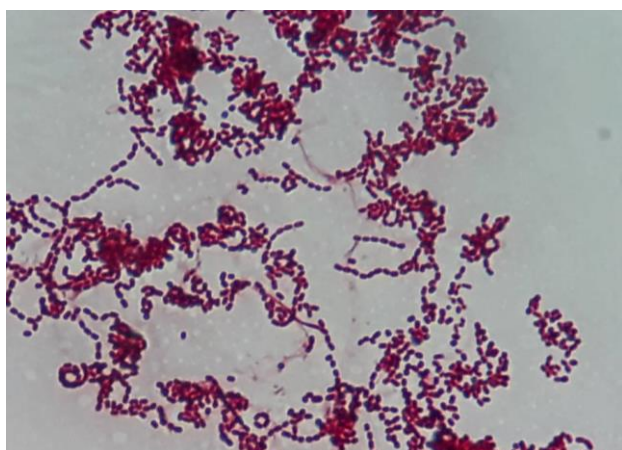
Таблиця 5.1

Порівняння морфології клітин домінантних бактерій зі стандартним штамом

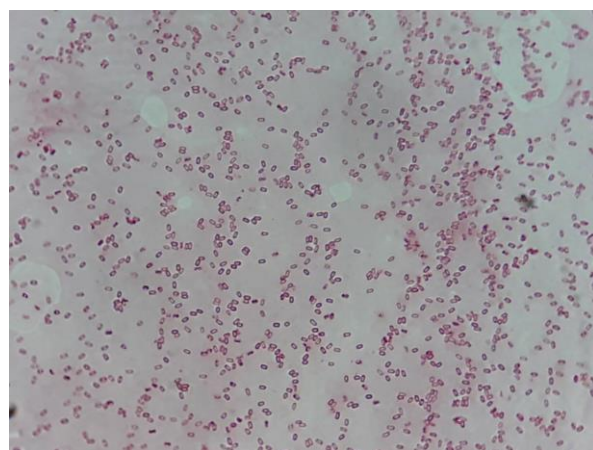
Культуральна морфологія	ГПА-1	ГПА-7
Конфігурація	округла	округла
Край	гладкий	гладкий
Висота	вишукла	плоска
Форма	кругла	кругла

Колір	майже прозора	біла
Клітинна морфологія		
Gram's reaction	—	+
Форма	довгі джгутики	короткі джгутики
Форма колонії	одиначні клітини	спарені клітини

Виділені ізоляти оцінювали за їх морфологічними та біохімічними характеристиками.



а)



б)

Рис. 5.1. а) ГПА-1 грам-негативні бактерії б) ГПА-7 грам-позитивні бактерії

Процес аутентифікації мікроорганізмів є одним з найбільш важливих і трудомістких етапів проведення біологічних досліджень [25, 141]. На даний час, поширеним методом розпізнавання бактерій є ферментативний метод – визначення біохімічних властивостей, пов'язаних зі здатністю бактеріальної культури розщеплювати цукри, білки та інші сполуки [48].

У досліді було використано два домінантних ізоляти, отриманих з ризосфери ячменю ярого. Під час інкубації у організмах відбулися метаболічні

зміни, які можливо було виявити по спонтанній зміні кольору середовища, яку можна було спостерігати вже на другий день після інокуляції [8].

Результати досліджень засновані на вивченні біохімічних процесів вуглецевого живлення та фізіологічного стану бактерій наведено у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2.

Реакції на джерела вуглецевого живлення двох домінантних морфотипів бактерій

№	Тест	ГПА-1	ГПА-7
1	Лактоза	-	-
2	Ксилоза	+ -	+
3	Мальтоза	-	+
4	Фруктоза	-	+
5	Декстроза	+	+
6	Галактоза	+	+
7	Рафіноза	-	+
8	Трегалоза	-	+
9	Мелібіюза	+	-
10	Сахароза	-	+ -
11	L-Арабіноза	+ -	-
12	Маноза	+ -	-
13	Інулін	-	+
14	Глюконат Натрію	-	-
15	Гліцерол	-	+
16	Саліцин	-	-
17	Дульцит	-	-
18	Інозитол	-	-
19	Сорбітол	-	-
20	Манітол	-	+ -
21	Адоніт	-	-

22	Арабітол	-	-
23	Еритрітол	-	-
24	L-метил D-глюкозид	-	-
25	Рамноза	-	-
26	Целобіоза	-	-
27	Мелезітоза	-	-
28	L-метил D-манозид	-	-
29	Ксилітол	-	-
30	ОНГЛ	-	+
31	Ескулін	+	+
32	D-арабіноза	+	-
33	Цитрат	+ -	+ -
34	Малонат	+	-
35	Сорбоза	-	-

За результатами тестів на використання джерел вуглеводів бачимо, що ізолят ГПА-1 утилізує такі цукри як, ксилоза, декстроза, галактоза, мелібіоза, L-арабіноза, манноза, ескулін, D-арабіноза, цитрат та малонат [290].

Ізолят ГПА-7 у свою чергу живиться такими цукрами: ксилоза, мальтоза, фруктоза, декстроза, галактоза, рафіноза, трегалоза, сахароза, інουλін, гліцерол, манітол, ОНГЛ (орто-нітрофеніл- β -галактопираноза), ескулін, цитрат (рис. 5.2).

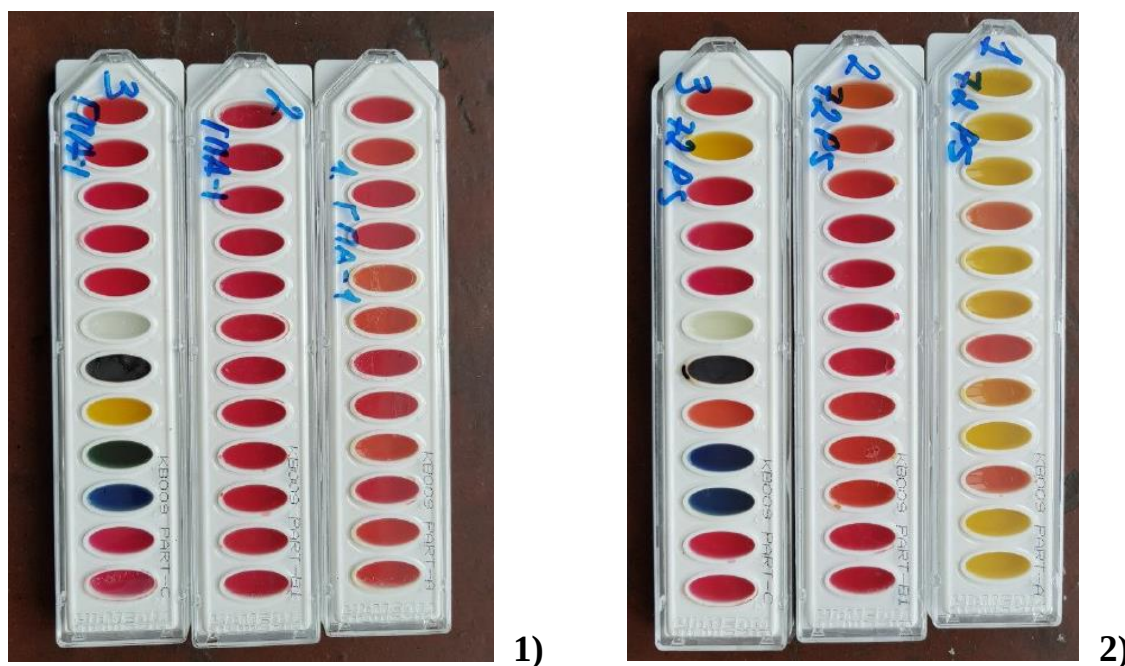


Рис. 5.2. 1) Результати тесту ГПА-1 2) Результати тесту ГПА-7

Експериментальним методом з використанням комплексної тест-системи KB009 було визначено джерела вуглецевого живлення піддослідних мікроорганізмів. Та визначення біохімічних властивостей мікроорганізмів є лише однією з частин комплексу досліджень для ідентифікації мікроорганізмів [207]. Для точного визначення виду ізолятів у подальшому необхідно провести більш глибокі дослідження метаболічних, культуральних, морфологічних та антигенних властивостей мікроорганізмів. Дані про джерела вуглеводного живлення значно полегшують ідентифікацію приналежності мікроорганізмів ризосфери до певного виду, роду та типу.

5.3. Значення молекулярної філогенетики як основи генетичної структури популяції екосистеми

Філогенетика або філогенетична систематика — область біологічної систематики, що займається ідентифікацією і проясненням еволюційних взаємин серед різних видів життя на Землі, як сучасних, так і вимерлих [133]. Еволюційна теорія стверджує, що схожість серед індивідуумів або видів часто вказує на загальне походження або загального пращура. Тому взаємини,

встановлені філогенетичною систематикою, часто описують еволюційну історію видів та історичні взаємини серед гілок організмів або їх частин, наприклад їх генів. Філогенетична таксономія, яка є відгалуженням, але не логічним продовженням, філогенетичної систематики, займається класифікацією груп організмів згідно зі ступенем їхніх еволюційних відносин. Систематика описує зразок взаємин серед таксонів і призначається допомогти нам зрозуміти історію всіх живих організмів. Але історія не є чимось, що ми можемо побачити, вона трапилася одного разу і залишила тільки вказівки щодо фактичних подій. Учені використовують ці вказівки щоб побудувати гіпотези, або моделі, історії життя. У філогенетиці найзручніший шлях візуально представлення еволюційних взаємин серед груп організмів здійснюється через ілюстрації, які називаються філогенетичними деревами [190].

Недавні дослідження показали, що молекулярно-генетичні методи можуть бути використані для вивчення різноманітності мікробіомів ґрунту та їх функціональних властивостей. Зокрема, вивчення різноманітності генів, що кодують функції, які відповідають за переробку органічних речовин та відповідь на забруднення, може дати можливість зрозуміти, як мікробіом ґрунту впливає на взаємодію між ґрунтом та рослинами, а також на процеси, пов'язані з вуглецевим циклом та екологічною стійкістю системи ґрунт-рослина.

Макромолекулярні дані, під якими мається на увазі послідовності генетичного матеріалу (ДНК) і білків, накопичуються все більш швидкими темпами завдяки успіхам молекулярної біології. Для еволюційної біології швидке накопичення даних послідовностей цілих геномів має значну цінність, тому що сама природа ДНК дозволяє використовувати його як «документ» еволюційної історії [45]. Порівняння послідовностей ДНК різних генів між різними організмами можуть сказати вченому багато нового про взаємини організмів, що не можуть інакше бути виявлені засновуючись на морфології, або зовнішній формі організмів і їх внутрішній структурі. Оскільки геноми еволюціонують поступовим накопиченням мутацій, кількість відмінностей послідовності нуклеотидів між парою геномів різних організмів повинна

вказати, як недавно ті два геноми розділили загального пращура [5]. Два геноми, що відхилилися в недавньому минулому, повинні мати менші відмінності, ніж два геноми, чий загальний пращур дуже давній. Тому, порівнюючи різні геноми один з одним, можливо отримати еволюційні взаємини між ними, що і є головне завдання молекулярної філогенетики.

При філогенетичному аналізі, гомологічні (ті, що мають загальне еволюційне походження) генетичні послідовності аналізованих форм життя порівнюють між собою за допомогою різних методів [230].

Оскільки при еволюції послідовностей відбуваються як заміни, так і вставки-делеції нуклеотидів, то першим етапом еволюційного аналізу в загальному випадку є виявлення цих вставок-делецій [304]. Цей етап аналізу, званий вирівнюванням послідовностей, необхідний для того, щоб встановити гомологічні позиції аналізованих послідовностей. Після процедури вирівнювання можна оцінити число і якість відмінностей між ними, розрахувати еволюційні дистанції. Аналізуючи генетичні відмінності між послідовностями за допомогою різних методів, можна реконструювати їхню еволюційну історію, або ж родинні стосунки між ними [124].

Множинне вирівнювання послідовностей

Вирівнювання послідовностей спрямоване на виявлення гомологічних позицій аналізованих послідовностей, встановлення найбільш ймовірного, тобто вимагає найменшого числа еволюційних подій, сценарію еволюції аналізованої групи. Множинним (Multiple sequence alignment (MSA)) називають вирівнювання двох і більше послідовностей [165]. Мета множинного вирівнювання послідовностей полягає в отриманні вичерпних даних про структуру послідовностей, на підставі яких можна буде прийняти рішення про приналежність цих послідовностей до відповідних сімейств генів. У порівнянні з парним вирівнюванням, результат множинного вирівнювання дає більше інформації про еволюційну консервативність. Для того щоб множинне вирівнювання було максимально інформативним, воно повинно містити рівномірну вибірку близько та віддалено схожих послідовностей [292].

5.4. Визначення таксономічного положення домінантних ризосферних бактерій

У нашому дослідженні ми визначили таксономічне положення домінантних мікроорганізмів ризосфери ячменю ярого — представників родів *Bacillus* і *Phyllobacterium* — на основі філогенетичного аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. Сучасні молекулярно-біологічні методи відкривають широку перспективу та нове розуміння щодо філогенетичного і функціонального різноманіття ризосферних мікробних угруповань [2, 60]. Подальший комплексний аналіз дає змогу провести оцінку таксономічної та функціональної структури домінантних морфотипів мікроорганізмів за допомогою вибору ген-специфічних праймерів і секвенування повнорозмірних геномів. Ізольовані домінантні морфотипи мають високий ступінь асоціативності з рослиною, адаптовані до ґрунтово-кліматичних умов лівобережної частини України, здатні зв'язувати азот атмосфери, стимулювати ріст і розвиток рослин, що позитивно впливає на показники продуктивності ячменю. Основним інструментарієм філогенетичних досліджень є порівняння первинних нуклеотидних послідовностей та послідовна візуалізація результатів [209]. Як філогенетичний маркер використовують структуру варіабельних ділянок гена 16S рРНК [2, 142].

У результаті проведених досліджень отримано нуклеотидну послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Phyllobacterium ifriqiense* 1 загальною довжиною 991 нуклеотид та штаму *Bacillus velezensis* 10 — 1126 нуклеотидів. Первинний порівняльний аналіз сиквенсів досліджуваних штамів з послідовностями гена 16S рРНК, задепонованими у базі даних GenBank, виявив 99% подібності штамів до сиквенсів типових представників відповідних видів. Нуклеотидні послідовності штаму *Phyllobacterium ifriqiense* 1 зареєстровано у базі GenBank під № MK947049 і MK947055 (рис. 6.1), та *Bacillus velezensis* 10 — MK947050 і MK947056 (рис. 5.3) відповідно.

CGCGGGAAATTCACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCCCCGCAAGGGGAGTGGC
 AGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCAATTCTTCGGAACAACACATGGAAACGTGTGCTAATACC
 GAATGAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGG
 TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
 CGCGTGAGTGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGA
 AGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGATTTACT
 GGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGC

1)

CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTA
 GTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGA
 CCGCGAGGTCGAACTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAG
 TTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
 GTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGCTAACCAGGAGGCAGGCAACCACGGTAG
 GGTCAGCGACT

2)

Рис. 5.3. Phyllobacterium ifriqiense штам 1 16S ген рибосомної ДНК,
 часткова послідовність 1) MK947049.1 2) MK947055.1

TGAACGGTGGCGGCATGCCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
 ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
 CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
 GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAA
 TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
 GGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA
 GCGGTT

1)

GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
 TCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
 AGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTC
 AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGC
 CAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
 TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAG
 AGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGACTGATTGTC

2)

Рис. 5.4. *Bacillus velezensis* штам 10 16S ген рибосомальної РНК, часткова послідовність 1) МК947050.1 2) МК947056.1

Філогенетичні зв'язки досліджуваних штамів з референтними штамми бактерій родів *Phyllobacterium* і *Bacillus* отримано порівнянням послідовностей гена 16S рРНК [94]. Цифрами вказана частота групування штамів у відповідні кластери (100 реплік вихідного набору послідовностей ДНК, випадково змінених методом bootstrap) (рисунки 5.5. і 5.6.). Відомо, що домінантні ризосферні мікроорганізми мають високий ступінь асоціативності з рослинами, адаптованими до ґрунтово-кліматичних умов [267].

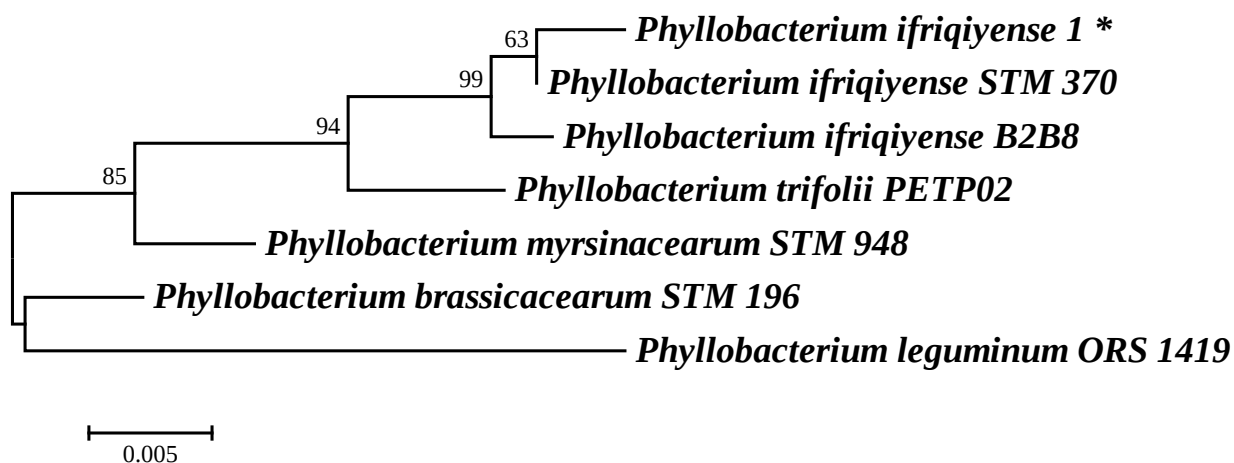


Рис. 5.5. Філогенетичні зв'язки штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 і референтних штамів роду *Phyllobacterium*

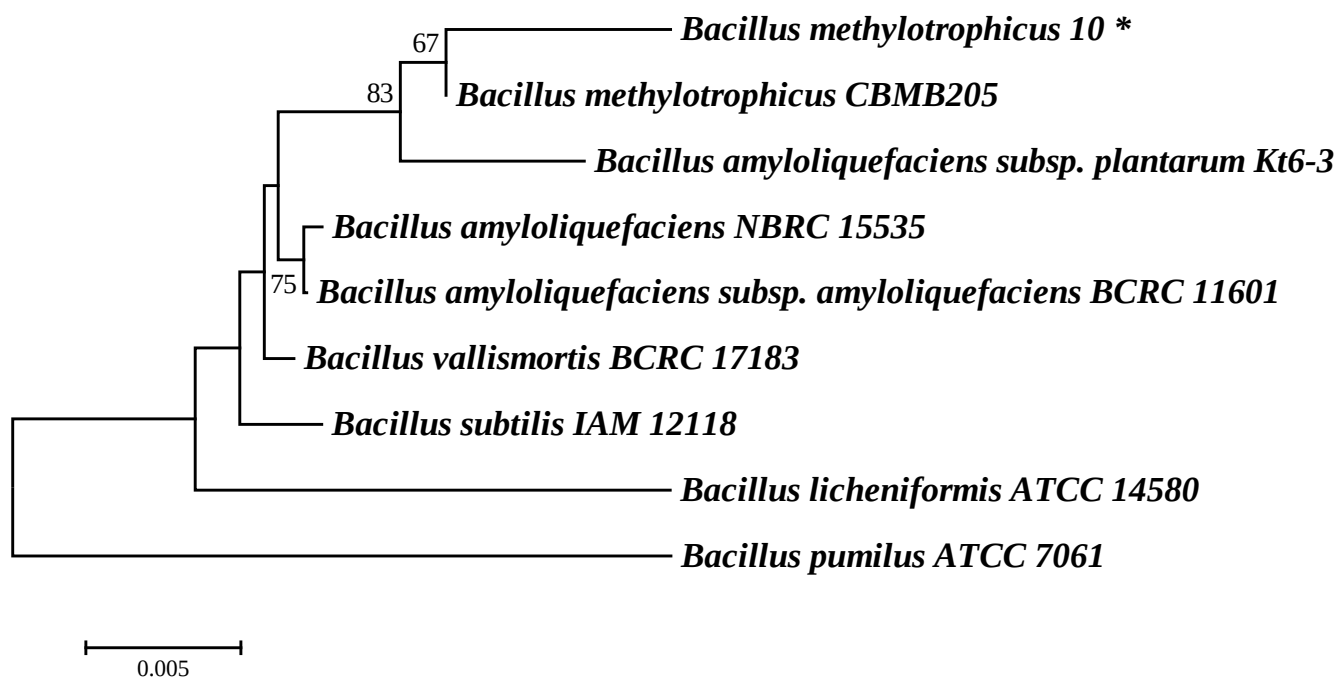


Рис. 5.6. Дендрограма філогенетичних зв'язків штамів роду *Bacillus* за нуклеотидним складом (щодо штаму *Bacillus velezensis* 10)

Вони здатні зв'язувати азот атмосфери, стимулювати ріст і розвиток рослин, що забезпечує підвищення продуктивності зернових культур. Виділений з апікальної частини коренів ячменю штам асоціативних бактерій *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 - це вид бактерій, який був вперше виявлений у 2013 році на листках кущів в пустелі Сахара в Тунісі [240]. Він належить до родини *Phyllobacteriaceae* та має здатність азотфіксації. Бактерії з родини *Phyllobacteriaceae* зазвичай зустрічаються на поверхні листків рослин і можуть бути корисні для рослин у забезпеченні їхньої життєдіяльності [254]. *Phyllobacterium ifriqiyense*, зокрема, може виробляти гібридні ензими, які можуть допомогти рослинам забезпечити собі азот, що є ключовим елементом для їхнього росту [179]. Дослідження також показали, що *Phyllobacterium ifriqiyense* має потенціал як біологічний агент для боротьби зі шкідливими мікроорганізмами та хворобами рослин. Ця бактерія може продукувати антибіотики, які можуть знищувати патогенні мікроорганізми та захищати рослини від інфекцій.

Виділений штам *Bacillus velezensis* 10, має багатий потенціал для застосування в різноманітних галузях, зокрема в сільському господарстві, і був вперше виділений у 2009 році з ґрунтової витяжки в Мексиці [95]. Він є біологічним агентом боротьби зі шкідливими мікроорганізмами та хворобами рослин, такими як бактеріальна плямистість листя, коренева гниль та інші. Крім того, *B. velezensis* також може використовуватися для біоремедіації забруднених ґрунтів та виробництва фармацевтичних препаратів. Ця бактерія виробляє широкий спектр біологічно активних речовин, таких як антибіотики, ензими та інші біохімічні сполуки, які можуть бути корисними в різних промислових процесах.

5.5 Висновки до розділу

Рослинна ризосфера є унікальним ґрунтовим середовищем, особливість якого полягає в постійному надходженні низькомолекулярних сполук у вигляді корневих ексудатів [40, 98]. У ризосфері підтримується велика кількість метаболічно активного мікробіому, біомаса і поліморфізм якого можуть бути вищими на кілька порядків, ніж загалом в орному шарі ґрунту. Взаємодія між рослинами і мікроорганізмами і між ними самими значною мірою не розкрита, а проведені дослідження свідчать про виняткову складність цієї взаємодії і чинників, які на неї впливають. Саме ці чинники роблять цю систему перспективним середовищем для пошуку нових універсальних агентів біопрепаратів (штамів), що ляжуть в основу розробки біотехнологій формування рослинно-мікробних взаємодій у фітоагроценозах зернових культур [176].

На основі нашого дослідження на джерела вуглецевого живлення, фарбування за Грамом, мікроскопії та попередніх вище описаних досліджень, а також класифікації за визначником Берджі, ми дійшли висновку, що ізолят ГПА-1 належить до роду *Phyllobacterium*, а ізолят ГПА-7 належить до роду *Bacillus*.

Незважаючи на те, що зараз стали дуже актуальними сучасні молекулярно-біологічні методи досліджень, вони все одно не дають повної картини життєвого

циклу і особливо метаболізму мікроорганізмів [14, 63]. А з огляду на метаболічну схожість виділених нами штамів зі стандартним штамом можна зробити висновок, що мікроорганізми, ідентифіковані системою утилізації вуглеводів – KB009 ТМ HiCarbo Kit, є цікавими для подальшого вивчення та дослідження [139]. І наша робота має вкрай важливе значення, оскільки раніше мікроорганізми цих родів не використовувалися у складі біодобрих [273].

Стратегічним напрямом сучасного землеробства є розкриття його адаптаційного потенціалу через призму використання інноваційних біологічних засобів відтворення родючості ґрунту та отримання екологічно безпечної продукції рослинництва [241]. Серед таких засобів, що застосовуються в аграрних технологіях вирощування зернових культур, важливу роль відіграють мікробні агенти поліфункціональної дії для забезпечення трофічної структури метаболізму біологічних систем у ризосфері рослин, біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин проти патогенів і фітофагів [221, 300]. Недостатня ефективність наявних мікробних препаратів при вирощуванні ячменю ярого пояснюється тим, що в посівах сучасних сортів застосовують інтенсивні технології (багаторазові підгодівлі азотними добривами, обробку хімічними засобами захисту рослин від фітопатогенів, фітофагів і бур'янів) [125]. Такі умови формують мікробоценоз, що не сприяє інтродукції та адаптації штамів-біоагентів і, відповідно, функціонуванню асоціативної системи бактерій з рослинами. Тому виділені нами перспективні штами ідентифіковано за допомогою філогенетичного аналізу - *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 можна успішно інтродукувати у метагеном аборигенних формувань ґрунту як біоагентів мікробних препаратів, а також вони можуть забезпечити метаболічні функції біологічних систем ризосфери ячменю, бути практично цінними агентами біопротекторної дії, індукції системної стійкості рослин проти патогенів [263, 269].

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДОМІНАНТНИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ

Розвиток науково обґрунтованого методу біологічного захисту рослин в нашій країні почався позаминулого століття. В Україні існує потужна власна вітчизняна наукова школа, заснована першим лауреатом Нобелівської премії в галузі медицини, одним із основоположників порівняльної патології, еволюційної ембріології, імунології і мікробіології — Іллею Іллічем Мечниковим (1845-1916). Засновником ґрунтової мікробіології був всесвітньо відомий учений, академік — Данило Кирилович Заболотний (1866-1929). 1928 року він став першим директором Інституту мікробіології та епідеміології (м. Київ). Нині це Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, який займається вивченням механізмів біологічної активності мікроорганізмів і вірусів як основи для розробки новітніх біотехнологій для створення необхідних продуцентів і важливих для людини речовин і продуктів. З огляду на катастрофічний стан навколишнього середовища в Україні, забруднення ґрунтів, річок та інших водойм, його вчені працюють над розробкою мікробіологічних засобів очищення ґрунтів, стічних вод підприємств і сільських господарств від антропогенного забруднення [32].

Відтоді для захисту рослин від шкідників і хвороб широко застосовують мікробні препарати на основі різних видів мікроорганізмів і метаболітів, які вони синтезують. Особливого поширення біологічний метод боротьби в Україні набув від середини 70-х років минулого століття. Біопрепарати застосовують так само, як і хімічні ЗЗР — фунгіциди, інсектициди і протруйники, для захисту рослин від шкідників і хвороб. І саме застосування такого методу ефективно при постійному поповненні агроценозів біологічними агентами [71].

6.1. Дослідження антагоністичних властивостей домінантних морфотипів PGPR проти фітопатогенних мікроміцетів

Природою закладені всі механізми управління найважливішими біосферними процесами: азотфіксація, антагонізм певних мікроорганізмів до патогенів, синтез мікроорганізмами біологічно активних речовин, спроможних суттєво впливати на фізіологічний стан рослин та їхній імунітет тощо [55]. У кореневій зоні рослин із найбільшою активністю проявляються всі позитивні та негативні сторони міжмікробної та рослинно-мікробної взаємодії. Лабораторними молекулярно-біологічними методами ідентифіковано бактерії, що домінують у ризосфері ячменю ярого – *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1. Та для подальшого більш детального вивчення їх захисних властивостей ми провели наступні дослідження [144]. Ризосферні бактерії можуть проявляти високу антагоністичну активність відносно фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу екзометаболітів різної хімічної природи, а також виступати як потенційні еліситори, за допомогою яких можливо контролювати та знижувати рівень ураження фітопатогенами на стадіях онтогенезу рослин [174]. Дослідження властивостей високоактивних мікроорганізмів як потенційних біоагентів препаратів зокрема захисної дії для застосування в екологічно безпечних агротехнологіях є одним із пріоритетних завдань сучасної агроєкології [251].

Результати досліджень інгібуючої активності штамів бактерій щодо фітопатогенних мікроміцетів представлено в таблиці 6.1. У результаті проведених досліджень встановлено, що бактерії *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 інгібували ріст фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 45,1 % і 77,4 % відповідно, тест-культури *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 63,1 % і 66,6 %, *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 65,2% і 86,7%.

Табл. 6.1

Інгібуюча взаємодія домінантних бактерій ризосфери ячменю ярого

<i>Bacillus velezensis</i> 10 Do 10 день (мм)	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> 1 Do 10 день (мм)	Фітопатогенні мікроміцети (контроль), Dk (мм)		Інгібуюча активність Р (%)	
				<i>Bacillus velezensis</i> 10	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> 1
34±1,6	14 ±0,8	<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. 23.2	62±3,8	45,1	77,4
21±2,4	19±1,3	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 3.45	57±4,5	63,1	66,6
29±1,4	11±1,9	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch. 18.77	83±3,6	65,2	86,7

Примітка: Dk – діаметр колонії гриба в мм у контролі, Do – діаметр колонії гриба в мм у досліді, Р – показник інгібування.

Проведені дослідження антагоністичної активності свідчать (рис. 6.2), що виділені ризосферні бактеріальні агенти *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 пригнічують ріст мікроміцетів, що є свідченням їхньої антифунгальної активності.

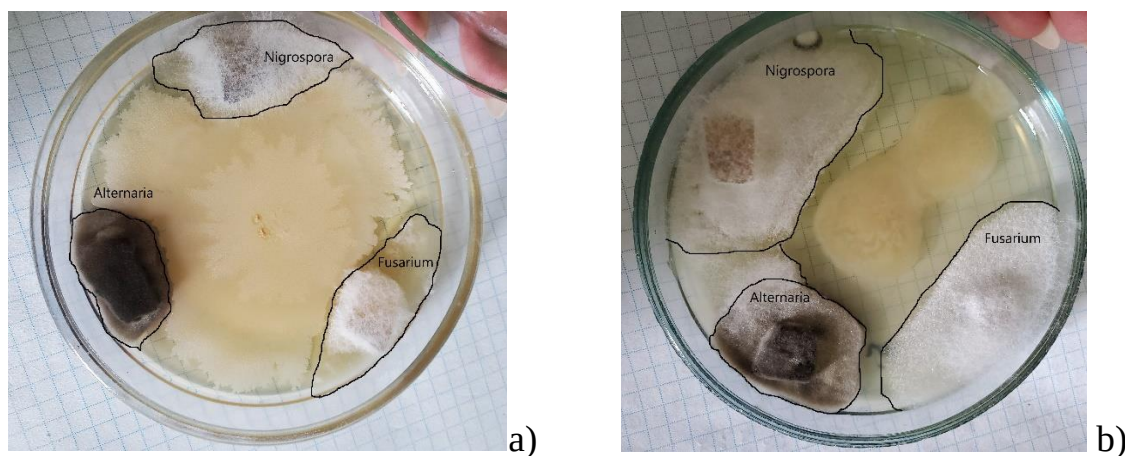


Рис. 6.2. Антагоністична активність домінантних морфотипів ризосфери ячменю ярого (десятий день). Примітка: а) *Bacillus velezensis* 10; б) *Phyllobacterium ifriqiense* 1

Бактерії *Phyllobacterium ifriqiense* 1 більш швидко заселяють субстрат і відповідно використовують поживні ресурси, у той же час мікроміцети втрачають можливість росту та не мають можливості подалі заселяти субстрат, проявляється тенденція до загибелі. Отже, вочевидь, виявлена антагоністична активність пов'язана із конкуренцією. У природних умовах антагонізм такого типу частіше всього спостерігається в ґрунтовому середовищі ризосфери рослин, де між мікроорганізмами відбувається конкуренція за джерела живлення (кореневі екsudати) [252]. Інтенсивність росту й розвитку бактерій, що домінують у ризосфері рослин ячменю ярого, навколо агарових блоків фітопатогенних мікроміцетів на 3 і на 10 добу дослідіу представлено в таблиці 6.2.

Табл. 6.2

Визначення зони затримки росту фітопатогенних мікроміцетів під впливом домінуючих бактерій на 3 і 10 день досліду

Фітопатогенні мікроміцети (контроль, мм) 3 день (мм)		<i>Bacillus velezensis</i> 10		<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> 1	
		3 день (мм)	10 день (мм)	3 день (мм)	10 день (мм)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb. 23.2	62 ± 1,4	3 ± 0,2	1 ± 0,1	9 ± 0,6	2 ± 0,1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 3.45	57 ± 0,9	11 ± 0,6	3 ± 0,2	13 ± 0,	5 ± 0,4
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch. 18.77	83 ± 2,2	5 ± 0,4	2 ± 0,1	11 ± 0,7	7 ± 0,5

За отриманими результатами досліджень бактерії *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 на 3 добу досліду пригнічували ріст та розвиток фітопатогенних мікроміцетів, зокрема, зони затримки росту мікроміцетів були такі: *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 3 і 9 мм відповідно, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 11 і 13 мм та *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 5 і 11 мм відповідно. Та на 10 добу досліду бактерії *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 пригнічували ріст грибів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 1 та 2 мм, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 3 і 5 мм та *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 2 та 7 мм відповідно [148].

6.2. Висновки до розділу

Отже, антагоністична активність досліджуваних морфотипів бактерій, що домінують у ризосфері ячменю ярого, проявлялась уже на третю добу досліду й

підсилювала свій вплив на ріст і розвиток фітопатогенних мікроміцетів упродовж експерименту.

Досліджені ризосферні бактерії *Bacillus velezensis* 10 та *Phyllobacterium ifriqiyense* 1, мають антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів, а також проявляють інгібуючий вплив на ріст і розвиток фітопатогенних мікроміцетів, а отже, і можливість конкурувати з конкретними дослідженими фітопатогенами рослин.

Деякі види спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* давно відомі як потенційні антагоністи фітопатогени бактеріальної природи. Представники роду *Bacillus* здатні до продукування різноманітних антибіотичних речовин. Бактерії роду *Bacillus* вважаються одними з найкращих біотехнологічних об'єктів через їх детальну вивченість, безпечність більшості видів для людини та теплокровних тварин, здатність до спороутворення, що надає їм перевагу при тривалому зберіганні, та невибагливість до умов культивування.

Загалом грампозитивні бактерії *Bacillus velezensis* відомі як мікроорганізми, що виробляють поверхнево-активні речовини. Клітини були аеробними, рухливими, паличкоподібними і утворювали ендоспори. І вони проявили себе як дуже активні ріст-стимулятори з антагоністичними властивостями. Потім вони показали високу антагоністичну активність не тільки проти грибів, але і проти вірусних захворювань рослин.

Phyllobacterium ifriqiyense — грамнегативна бактерія з роду *Phyllobacterium*, яка була виділена з корневих бульб з рослин *Astragalus algerianus* і *Lathyrus numidicus*, що ростуть в дуже посушливій зоні південного Тунісу. На даний час було проведено досить вагомі дослідження у полі ідентифікації та філогенетичного аналізу даного штаму. Але недостатньо інформації щодо інших властивостей цих мікроорганізмів щодо впливу на ріст і розвиток сільськогосподарсько-цінних культур. З нашого дослідження ми можемо впевнено сказати, що *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 досить активно пригнічували ріст і розвиток фітопатогенних грибів та є активними конкурентами за джерела живлення в ризосфері ячменю ярого.

РОЗДІЛ 7

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ ТА ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕРСПЕКТИВНИХ ДОМІНАНТНИХ МОРФОТИПІВ БАКТЕРІЙ РИЗОСФЕРИ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

Застосування біологічних агентів для оптимізації продуктивності сільськогосподарських культур є давньою практикою: існують літературні джерела, що датуються 300 р. до н.е. Розвиток альтернатив для використання хімічних пестицидів і добрив - це сучасний і постійний виклик для досягнення сталого сільського господарства, але перший комерційний біоінокулянт «нітрогін» був запатентований ще у 1896 році.

В Україні є власна історія розвитку технології біопрепаратів для захисту сільськогосподарських рослин, яка була розпочата І.І. Мечниковим у 1879 році у Одеському університеті, де було засновано першу в світі біолабораторію, у якій розробили мікробні біологічні препарати для боротьби з комахами-фітофагами. У даний час в Україні відмічається тенденція до збільшення обсягів біологічних обробок проти шкідників і хвороб на овочевих культурах. Якщо у 2000–2008 роках біозасоби застосовували на площі 2–3 тис. га, то у 2009–2014 роках - 34 тис. га. Асортимент біологічних засобів представлений переважно мікробними біопрепаратами становить вже близько 70%.

Мікробіологічні дослідження, спрямовані на розробку та впровадження біопрепаратів у рослинництво мають більш ніж столітню історію [52]. За цей час вченими з'ясовано, що онтогенез рослин відбувається за їх тісної взаємодії з мікроорганізмами ґрунту, що заселяють ризосферу та утворюють асоціації «мікроорганізми – коренева система рослини». Численні дослідження констатують, що вплив ризосферних і ендofітних мікроорганізмів на рослину обумовлений їх симбіотичними взаємовідносинами і здійснюється безпосередньо через продукцію ними пептидів-антибіотиків, гідролаз хітину і глюкану, які руйнують клітинні стінки патогена, а також через формування у рослин власної системної індукованої стійкості, що супроводжується змінами в балансі захисних білків, фітогормонів і про- антиоксидантного статусу [164].

Бактерії різноманітних родів, таких як *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* та ін. здійснюють безпосередній вплив на ріст рослин шляхом стимулювання виробництва фітогормонів, постачання біологічно фіксованого азоту і збільшення поглинання фосфору через солюбілізацію неорганічних фосфатів [21]. Ці бактерії впливають на зростання рослин також непрямыми механізмами, що включають придушення бактеріальних, грибкових, вірусних та нематодних патогенів [33, 72]. Багато досліджень показали, що застосування бактеріальних препаратів привело до значного збільшення врожайності сільськогосподарських культур, підвищення схожості, сприяло поглинанню поживних речовин з коренів, збільшенню загальної біомаси рослин та насіннєвої маси, індукувало раннє цвітіння [173].

7.1. РРБ як механізми різних біотичних процесів екосистеми ґрунту

Ризобактерії є життєво важливими складовими ґрунтів, вони беруть участь у різних біотичних процесах екосистеми ґрунту, перетворюючи поживні речовини у доступну для рослин форму [51, 69]. Вони стимулюють ріст рослин шляхом мобілізації поживних речовин у ґрунтах, виробляючи численні регулятори росту, захищаючи рослини від фітопатогенів (контролюючи або інгібуючи фітопатогени), поліпшуючи структуру ґрунту та здійснюючи біоремедіацію забруднених ґрунтів шляхом захоплення токсичних важких металів та знищення ксенобіотичних сполук (наприклад, пестицидів) [253].

Мікробні угруповання є найбільш чутливим та динамічним компонентом ґрунту, особливо в умовах антропогенного навантаження. Зважаючи на той факт, що ґрунтові мікроорганізми відіграють виняткову роль у кругообігу речовин, продуктивності фітоценозів і стійкості екосистем загалом, одним із пріоритетних завдань є вивчення функціональних характеристик мікробіомів ґрунту в умовах зернових агроценозів [158]. Екологічні функції ґрунтових мікроорганізмів настільки різноманітні та численні, що входять практично в усі типи біогеноценотичних функцій ґрунтів.

Від видоспецифічності рослин і ризосферних мікроорганізмів залежить рівень генетичного потенціалу сільськогосподарських культур, що зумовлює формування рослинно-мікробних систем, доступність поживних речовин та імовірність розвитку контролюючих, антагоністичних та інших конкурентоздатних біоагентів [184]. Ризосфера рослин є унікальним середовищем, особливість якого полягає в постійному надходженні низькомолекулярних сполук у вигляді корневих ексудатів. У ризосфері підтримується велика кількість метаболітично активної мікробіоти, біомаса і поліморфізм якої може бути вищим на кілька порядків, ніж у загалом у орному шарі ґрунту [57, 213]. Взаємодії між рослинами і мікроорганізмами в значній мірі не розкриті, а сучасні дослідження свідчать про виняткову складність цих взаємодій і чинників, що впливають на них [167]. Отже, комплексні дослідження біологічної системи «рослина-ґрунт-мікробіота» є надзвичайно перспективними, особливо для пошуку нових універсальних агентів біопрепаратів, розробки біотехнологічних аспектів формування рослинно-мікробних взаємодій в зернових агроценозах.

7.2. Дослідження ефективності інокуляції насіння ячменю ярого домінантними морфотипами бактерій ризосфери

Високий врожай дають лише ті сільськогосподарські рослини, які культивуються в належних, сприятливих для них умовах. Різкі зміни температури повітря, його підвищена (або, навпаки, занижка) вологість і забрудненість шкідливими промисловими викидами є чинниками, що негативно впливають на процеси вегетації та плодоношення [61]. За умов дії цих чинників важливо своєчасно розпізнати зміни стану тієї чи іншої рослини, щоб додатково підживити її вологою або добривами чи обробити гербіцидами. Проте оскільки негативні внутрішні зміни не завжди одразу позначаються на зовнішньому вигляді агрокультури, ми використовували спеціальний прилад – «Флоратест», –

який дає змогу точно визначати стан рослини за особливостями перебігу в ній процесу фотосинтезу [250].

Саме тому важливим завданням сучасного сільськогосподарського виробництва є створення нових екологічно безпечних агротехнологій, спрямованих на підвищення продуктивності сільськогосподарських культур. Ячмінь ярий – важлива зернофуражна культура, яка займає істотне місце в частці вирощування на посівних площах України [197]. Метою дослідження було визначення ефективності інокуляції домінантними морфотипами бактерій ризосфери *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 насіння ячменю ярого та фізіологічні параметри росту і розвитку культури в модельних умовах.

Для цього ми визначали титр життєздатних бактерій у суспензії для інокуляції. Результати підрахунку життєздатних клітин у камері Горяєва ми можемо побачити на рисунку 7.1, та показник титру склав $6,0 \times 10^7$ КУО/мл

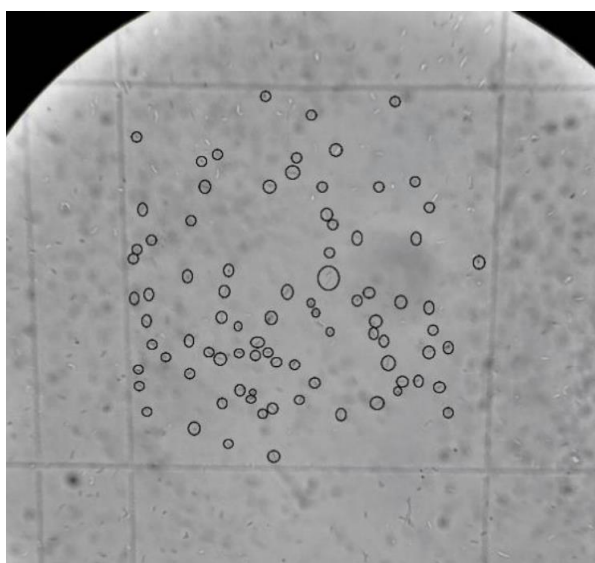


Рис. 7.1. Прямий підрахунок життєздатних клітин бактерій, камера Горяєва (x100)

В лабораторних умовах проводилась експозиція насіння ячменю ярого у бактеріальній суспензії в двох концентраціях (чиста суспензія та розведення 1:1), та облік росту рослин ячменю ярого та фіксація його біометричних показників після бактеризації; визначення фізіологічних параметрів росту і розвитку рослин у модельних умовах (рис. 7.2).

Експозиція насіння ячменю ярого в бактеріальних суспензіях штамів *P. ifriqiense* 1, *B. velezensis* 10 складала 5-7 хвилин у варіанті чистої бактеріальної суспензії, та у розведенні 1:1. Тривалість модельного дослідження складала 10 діб за постійного зволоження фільтрувального паперу у чашках Петрі. Для аналізу брали біологічну повторність – 10 рослин на варіант, повторність у досліді – триразова.

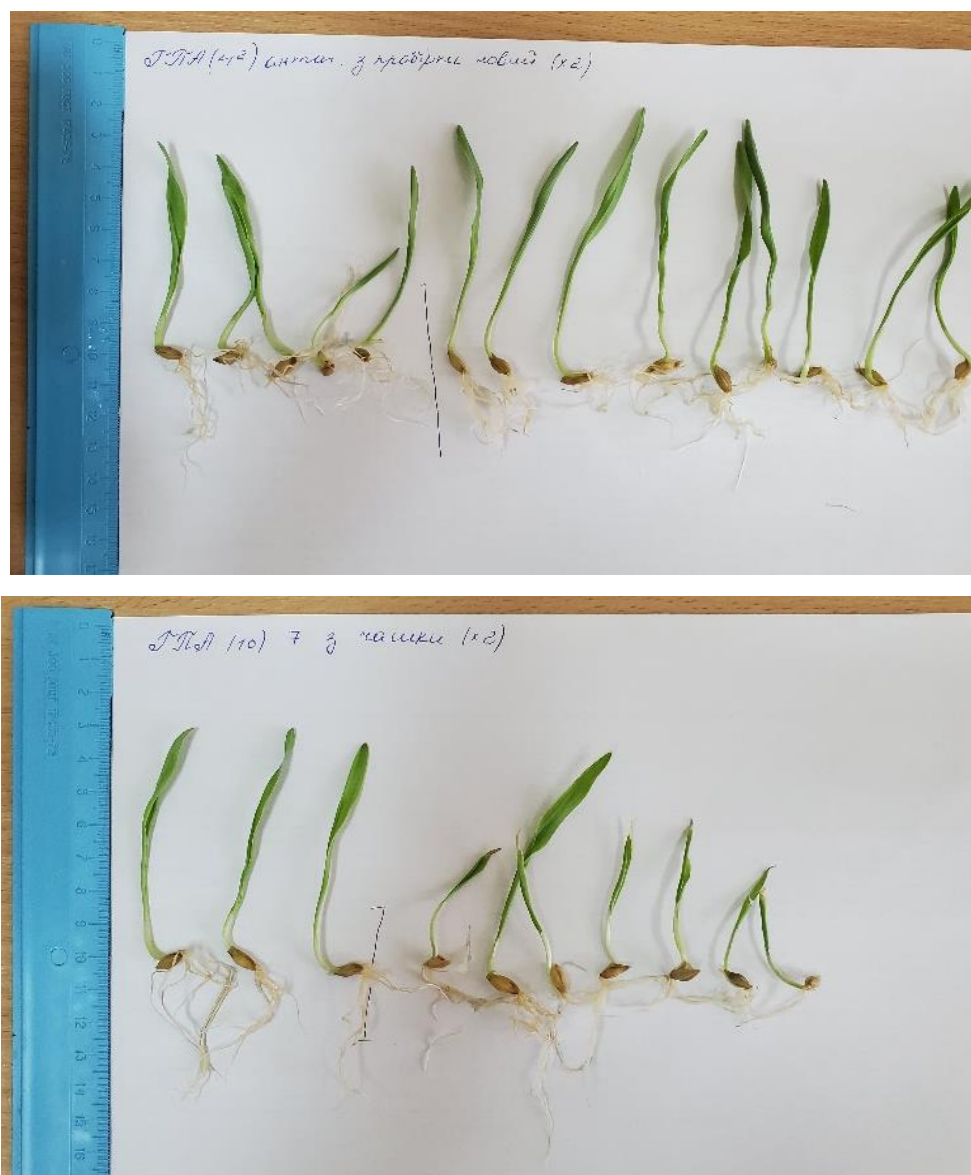


Рис. 7.2. Модельний вегетаційний дослід

Для аналізу перебігу фотосинтетичних процесів у листках застосовують метод індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ). Світлова енергія, що поглинається молекулами хлорофілу, використовується в процесах фотосинтезу,

а її надлишок – розсіюється у вигляді тепла або перевипромінюється як ІФХ [74]. Перетворення енергії зазвичай відбувається з високою ефективністю, що перевищує 90% поглинання квантів, водночас вихід флуоресценції складає, в більшості випадків, лише 1–2 % від загальної суми поглинутого світла. ІФХ – це процес ремісії світла, який є чутливим до змін у фотосинтезі, що стало підґрунтям для широкого його застосування для діагностики функціонального стану рослин [264].

В умовах модельного вегетаційного дослідження встановлено, що штам *P. ifriqiense 1* збільшує довжину коренів на 84,3 % відносно контролю та на 42,2 % у варіанті з використанням штаму *B. velezensis 10*. Довжина проростків збільшилась відповідно на 33,7 % та 16,0 % у варіанті без розведення (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Вплив домінантних ризосферних морфотипів на біометричні показники тест-культури ячменю ярого (модельний вегетаційний дослід, 2020 р.)

Варіант дослідження	Вихідний титр КУО/мл суспензії (без розведення)		Розведення 1:1	
	довжина кореня, см	довжина пагону, см	довжина кореня, см	довжина пагону, см
Контроль	10,2	18,7	—	—
<i>P. ifriqiense 1</i>	18,8	25,0	19,5	27,2
<i>B. velezensis 10</i>	14,5	21,7	16,5	22,7
<i>HIP₀₅</i>	0,3	0,5	0,1	0,6

Аналіз росту рослин ячменю ярого на 10 добу росту представлений в таблиці 7.2. Штам *P. ifriqiense 1* продемонстрував максимальний ефект на ростові показники тест-культури ячменю ярого (включаючи розведення культуральної рідини).

Таблиця 7.2

**Результати аналізу росту ячменю ярого за інокуляції насіння
домінантними морфотипами бактерій**

Контроль (без обробок, вода)	Розведення	<i>Phyllobacterium ifriqiense 1</i> , %	<i>Bacillus velezensis 10</i> , %
	1:0	≥90,0	≥90,0
	1:1	+33,0	+28,0

Примітка: достовірність аналізування встановлено порівнюючи крайні значення повторів з середньоарифметичним значенням.

За морфологічними ознаками корені проростків ячменю, вирощених за замочування у бактеріальних суспензіях дослідних штамів, характеризувалися щільнішим ростом корневих волосків порівняно з контрольними рослинами. Встановлено, що обробка бактеріальними суспензіями *P. ifriqiense 1* та *B. velezensis 10* сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах [126]. Так, показник впливу екзогенних факторів (K_1), що відповідає впливу чинників зовнішнього середовища на рослинний організм у тест-рослин становив 71,0 та 77,0 % (рис. 7.3).

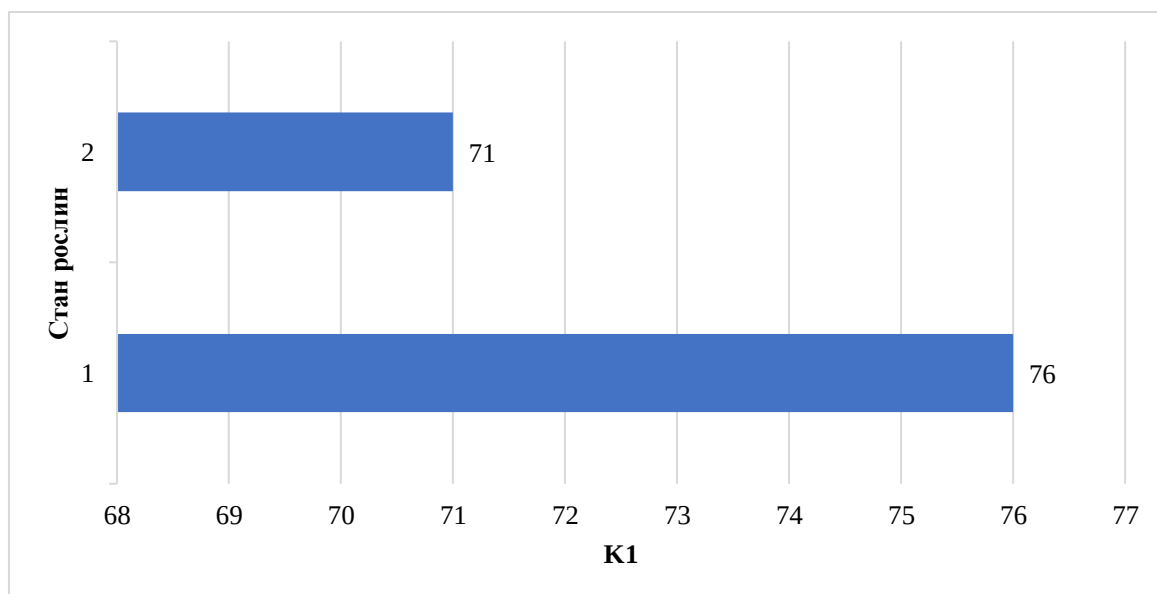


Рис. 7.3. Параметри вимірювання показнику впливу екзогенних факторів (K_1) на рослини ячменю, оброблені штамами 1 - *Bacillus velezensis 10*, 2 - *Phyllobacterium ifriqiense 1*.

Аналіз коефіцієнта індукції флуоресценції (K_2), що корелює із активністю рибулозобісфостфаткарбоксилази/оксигенази (основного ферменту циклу Кальвіна) засвідчив, що коефіцієнт K_2 відповідно становить 61,0% та 72,0% (рис. 7.4).

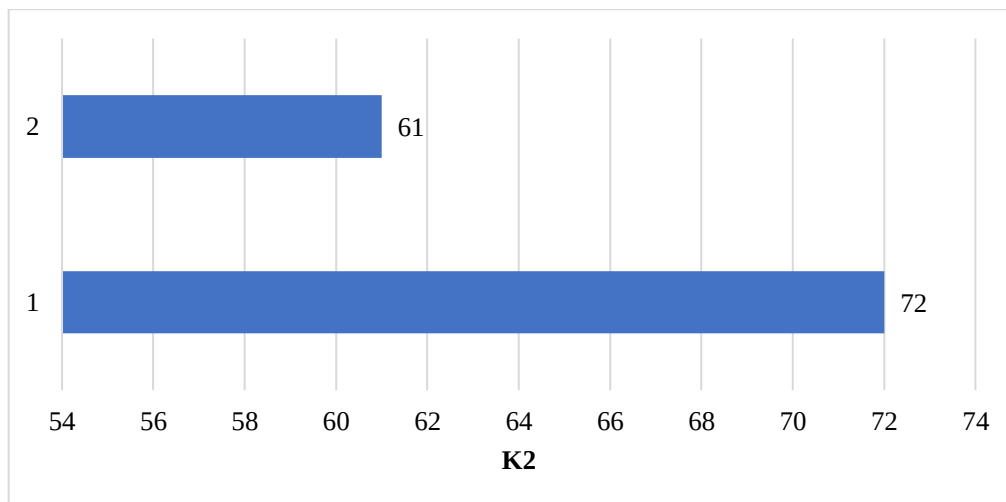


Рис. 7.4. Параметри вимірювання коефіцієнту індукції флуоресценції (K_2) листків, оброблених штамами 1 - *Bacillus velezensis* 10, 2 - *Phyllobacterium ifriqiense* 1.

Показник впливу ендогенних факторів (K_3), що відповідає внутрішньосистемним чинникам, таким як фітогормональна регуляція рослин і забезпеченість поживними речовинами, характеризувався наступними показниками (рис. 7.5): 55,0 та 99,0%.

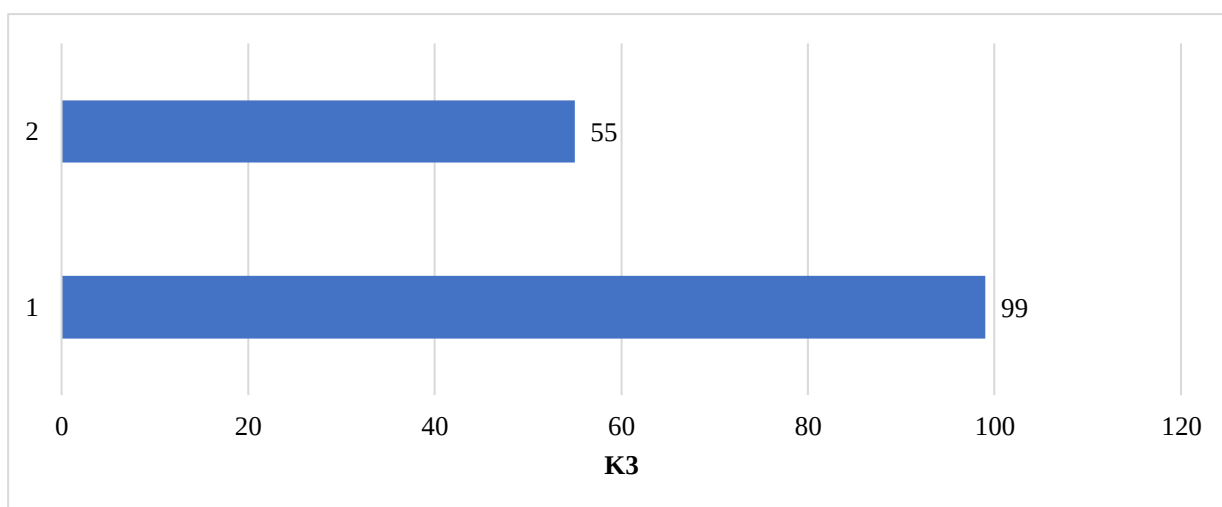


Рис. 7.5. Параметри вимірювання показнику впливу ендогенних факторів (K_3) листків, оброблених штамами 1 - *Bacillus velezensis* 10, 2 - *Phyllobacterium ifriqiense* 1.

Залежно від стану фотосинтетичного апарату інтенсивність флуоресценції хлорофілу може змінюватись у широкому діапазоні, що спостерігається при опромінюванні попередньо адаптованого до темряви листка рослини, при цьому інтенсивність флуоресценції спочатку різко зростає, а потім поступово знижується [168]. Цей ефект був вперше виявлений і досліджений Каутським і тому отримав назву «ефект Каутського», або ефект «індукції флуоресценції хлорофілу». Залежність інтенсивності флуоресценції хлорофілу від часу після початку опромінювання відома як індукційна крива, або крива індукції флуоресценції хлорофілу. Форма цієї кривої досить чутлива до змін, які відбуваються у фотосинтетичному апараті рослин при адаптації його до різних умов навколишнього середовища, що стало основою широкого використання ефекту Каутського в дослідженні фотосинтезу рослин і оцінки їх стану під впливом стресових факторів [211].

На рис. 7.6. наведена типова крива Каутського, при обробі ячменю ярого суспензією штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1.

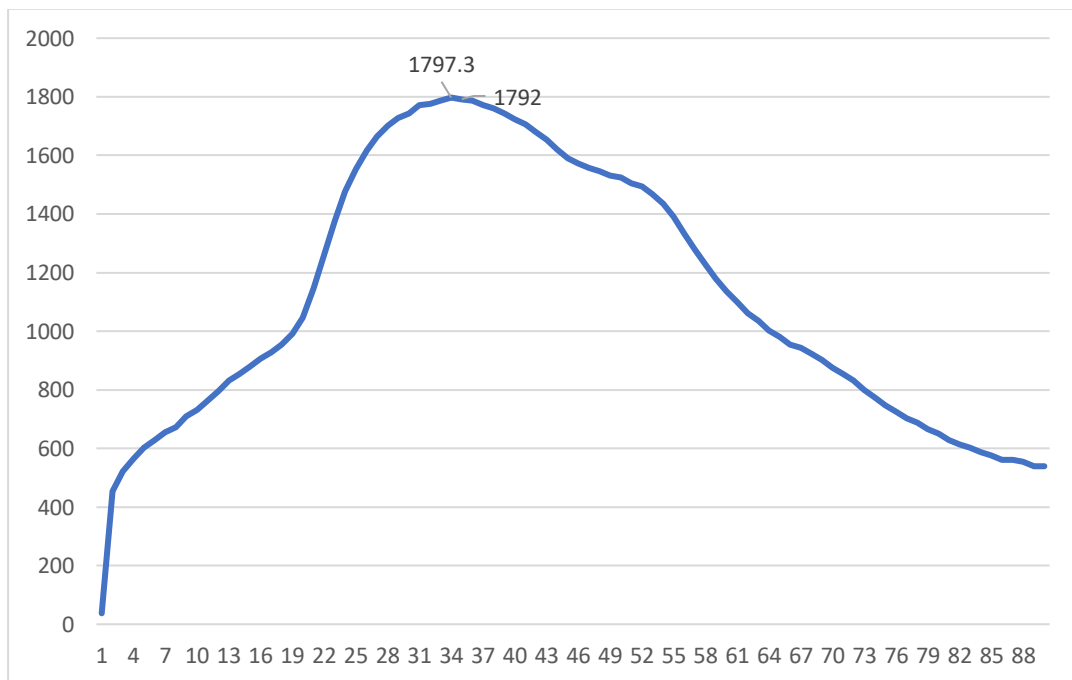


Рис. 7.6. Типова крива ІФХ, при обробі ячменю ярого суспензією штаму *Phyllobacterium ifriqiyense* 1.

Та на рис. 7.7. наведена типова крива ІФХ, при обробі ячменю ярого суспензією штаму *Bacillus velezensis* 10.

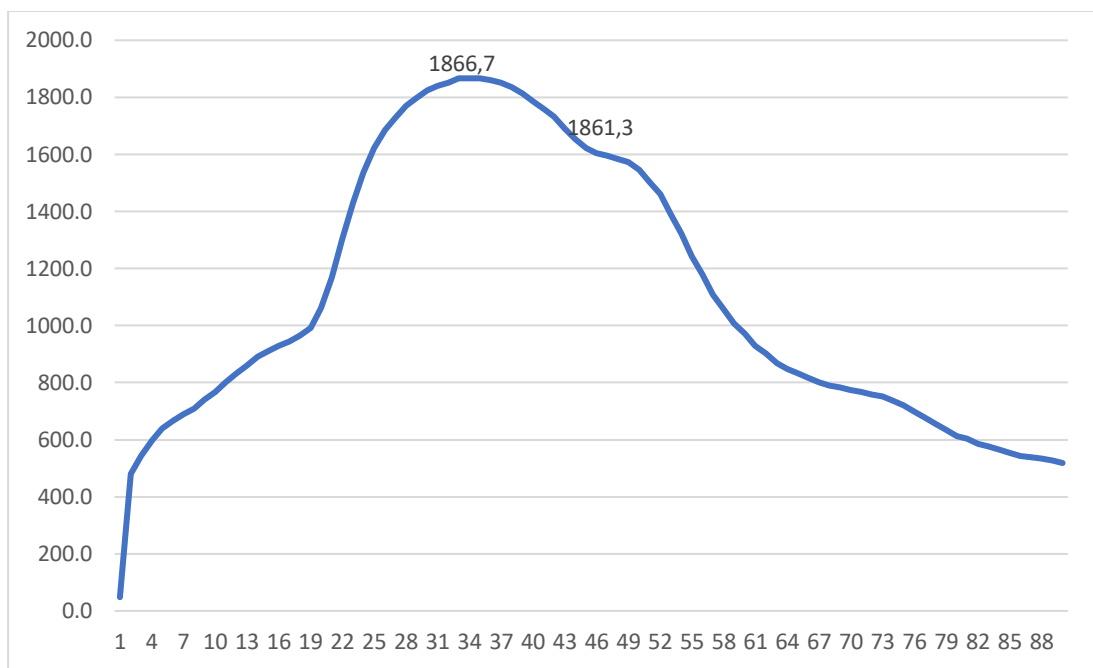


Рис 7.7. Крива ІФХ при обробці ячменю суспензією штаму *Bacillus velezensis* 10.

Показники кривої індукції флуоресценції хлорофілу було опрацьовано і найбільшій увазі приділено функції $(F_{max}-F_{st})/F_{st}$, яка показує індекс життєздатності Rfd (адаптивності) рослин, де F_{max} – максимальна флуоресценція, F_{st} – стаціонарна флуоресценція. І відповідно індекс життєздатності рослин при обробці бактеріальною суспензією *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 становив 0,6%; та при обробці *Bacillus velezensis* 10 - 0,7% [150].

7.3. Економічне обґрунтування вирощування ячменю ярого за різних систем обробітку ґрунту

За даними Державної служби статистики України, виробництво ячменю ярого в Україні зросло у 2021 році на 8,5% порівняно з попереднім роком і склало 4,9 млн тонн. Ячмінь являє собою важливу культуру для аграрної галузі України, і займає третє місце серед зернових культур за площею посівів.

Згідно з даними ФАО, в 2021 році виробництво ячменю ярого у світі становило близько 136 мільйонів тон, що є на 10% менше порівняно з 2020

роком. Найбільшими виробниками ячменю ярий є країни ЄС, зокрема Франція, Німеччина та Великобританія, а також Україна.

Ефективність виробництва, як економічна категорія, відображає дію об'єктивних економічних законів, що проявляються в подальшому зростанні результативності виробництва [172]. Економічна ефективність показує кінцевий корисний ефект від застосування засобів виробництва і живої праці, а також сукупних її вкладень на одиницю корисного ефекту.

Проблема підвищення економічної ефективності агропромислового виробництва – визначальний фактор економічного і соціального розвитку суспільства на сучасному етапі розвитку економіки України.

В умовах ринкових відносин виробники аграрної продукції змушені шукати та впроваджувати перспективні напрями розвитку нових виробничих процесів на основі енергетично заощаджуючих та екологічно безпечних технологій вирощування сільськогосподарських культур.

Економічна ефективність виробництва означає одержання максимальної кількості продукції з 1 га земельної площі. Також в ефективності сільського господарства відображається якість продукції, а також здатність її задовольняти певні потреби споживача.

Основним показником економічної ефективності сільськогосподарського виробництва виступає сума прибутку від реалізації продукції. На прибуток підприємства істотний вплив мають ціни реалізації продукції, а також обсяг товарної продукції. У свою чергу, ціни на конкретний вид продукції формуються впливом попиту та пропозиції.

Витрати на виробництво продукції рослинництва складаються з наступних основних складових: оплата праці, насіння і посадковий матеріал, органічні і мінеральні добрива, біостимулятори росту, засоби захисту рослин, паливно-мастильні матеріали, амортизація основних засобів, страхові платежі та інші. Собівартість, за своєю економічною природою, відображає поточні витрати на виробництво і реалізацію продукту, а тому зниження її має велике значення для підвищення ефективності суспільного виробництва [23].

При визначенні економічної ефективності комплексних агрозаходів по вирощуванню ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту необхідно виходити з того, що рівень рентабельності їхнього застосування знаходиться в прямій залежності від отриманого врожаю сільськогосподарських культур.

За методичну основу розрахунків економічної ефективності вирощування ячменю ярого за різних варіантів удобрення прийнято офіційні та загальноновживані методики, які ґрунтуються на традиційному підході порівняння результату від певного агрозаходу із витратами на його проведення. Результат деталізовано такими основними показниками економічної ефективності: основні виробничі витрати на 1 га, собівартість одиниці продукції, прибуток із розрахунку на 1 га площі посіву, рентабельність виробництва [67]. Розрахунок повної собівартості продукції проведено за методикою і нормативами Національного наукового центру «Інститут аграрної економіки НААН» з урахуванням особливостей технологій, застосованих при вирощуванні ячменю ярого у досліджуваних варіантах у розрахунку на 1 га. Собівартість вираховували за фактичними цінами та платежами, які складались впродовж кожного року. За ціну реалізації брали ціну 1 ц зерна, яка фактично складалась на ринку після збирання урожаю у 2019 році.

Таким чином, виробничі витрати по вирощуванню ячменю ярого склали від 7193 до 11637 грн/га залежно від варіантів удобрення ґрунту (табл. 8.3). Найвищими вони були за варіантів з використанням мінерального добрива, оскільки технологія вирощування за даного варіанту є найбільш витратною, а найнижчими – за контролю та удобрення побічною продукцією, оскільки не використовувались добрива, що значно зменшило витратну частину.

Таблиця 8.3

Основні виробничі витрати на вирощування ячменю ярого за різних систем
удобрення ґрунту, грн./га

Статті	Варіанти				
	Контроль	N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₆₀ P ₅₀ K ₆₅	Побічна продукція
Оплата праці	1080	1240	1240	1240	1080
Витрати пального	2343,03	2343,03	2407,45	2407,45	2407,45
Насіння	1650,0	1650,0	1650,0	1650,0	1650,0
Вартість добрива	0	4220	4220	4220	0
Засоби захисту рослин	820	820	820	820	820
Інші	1300	1300	1300	1300	1300
Виробничі витрати всього, грн/га	7193	11637	11637	11637	7430

Із структури розподілу витрат на вирощування ячменю ярого значну долю займають витрати пального та на мінеральні добрива.

Дані з розрахунку економічної ефективності агрозаходів при вирощуванні ячменю ярого за різних варіантів удобрення ґрунту наведено у таблиці 8.4. Проведені розрахунки свідчать, що вартість валової продукції була найвищою за використання рослинних решток (3,0 т/га) + N₄₅P₄₂K₅₅, що становила 44625 грн/га. А умовно чистий прибуток за цього варіанту був найбільшим та становив 32988 грн/га. Собівартість 1 т зерна склала 1261,46 грн. за побічної продукції (найнижчий показник), та 2027,35 грн. за удобрення лише мінеральним добривом (найвищий показник). Рівень рентабельності був у межах 220,3 та 415,3 %. Найвищий рівень рентабельності отримано на контролі та за

використання варіанту з побічною продукцією 320,6 – 415,3 % відповідно. Висока ціна на мінеральні добрива знижує даний показник до 220,3 – 258,6%.

За контролю та удобрення лише мінеральним добривом урожайність ячменю ярого була низькою та не відповідала адекватному біокліматичному потенціалу агроландшафту, оскільки доступні ресурси органіки об'єктивно не могли забезпечити винесення елементів мінерального живлення урожаєм, і становили відповідно 4,65 та 5,74 т/га. Найвищі показники урожайності були за органо-мінеральної системи удобрення, і становили відповідно 6,42 та 6,81 т/га при меншій та більшій нормі внесення мінерального добрива.

Таблиця 8.4

Економічна ефективність вирощування ячменю ярого за різних систем удобрення ґрунту

Система удобрєння, на 1 га сівозмінної площі	Урожайність, т/га	Виробничі витрати, грн/га	Вартість валової продукції, грн/га	Умовно чистий прибуток, грн/га	Собівартість, 1 т, грн	Рівень рентабельності, %
Контроль – без добрив	4,65	7193	30225	23062	1546,88	320,6
N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	5,74	11637	37310	25637	2027,35	220,3
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	6,81	11637	44625	32988	1708,81	283,5
Побічна продукція (3,0 т/га) + N ₆₀ P ₅₀ K ₆₅	6,42	11637	41730	30093	1812,6	258,6
Побічна продукція (3,0 т/га)	5,89	7430	38285	30855	1261,46	415,3

7.4. Висновки до розділу

Доведено, що ключовими умовами для здорового росту і розвитку рослин вже на перших етапах вегетації є участь біологічної складової в ризосфері (високоефективні штами природного типу), а також формування трофічних зв'язків з рослиною. В цьому аспекті використання домінантних мікроорганізмів ризосфери зернових культур сприяє оптимальним умовам вегетації рослин. Мікроорганізми є принципово важливими компонентами середовища (грунту), в якому вони відіграють ключову роль у функціонуванні екосистем за допомогою контролю реакції поживних циклів.

Морфологічні показники проявили дуже високий рівень позитивного впливу на обробку насіння бактеріальною суспензією, особливо при розведенні 1:1. Спостерігалось збільшення довжини коренів тест-рослин ячменю ярого на 84,3 % щодо контролю, та збільшення пагонів на 33,7% при інокуляції *P. ifriqiyense* 1. Інокуляція бактеріальними суспензіями *P. ifriqiyense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах. Так, показник впливу екзогенних чинників (K1) у діапазоні 71,0 та 77,0 %; та показник впливу ендогенних чинників (K3) відповідно — 55,0 та 99,0 %. Отже, ризосферні мікроорганізми є важливими компонентами середовища вже на перших етапах онтогенезу зернових культур, тому використання домінантних бактерій-інокулянтів має науково-практичне значення під час оптимізації технологій агровиробництва. Доведено, що ключовими умовами для здорового росту і розвитку рослин вже на перших етапах вегетації є участь біологічної складової в ризосфері (високоефективні штами природного типу), а також формування трофічних зв'язків з рослиною. У цьому аспекті використання домінантних мікроорганізмів *P. ifriqiyense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 сприяє оптимальним умовам вегетації рослин. Мікроорганізми є принципово важливими компонентами середовища (грунту), в якому вони відіграють ключову роль у функціонуванні екосистем за допомогою контролю реакції поживних циклів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені результати дослідження мікробіоти ризосфери ячменю ярого, детально вивчено загальний пул мікроорганізмів, який формується в умовах агрофітоценозу та має неопосередкований вплив на ріст і розвиток рослин. Вивчено вплив різних варіантів удобрення ґрунту на чорноземах типових малогумусних Лівобережного Лісостепу на формування мікробіоти, її якісний та кількісний склад. Виділено та ідентифіковано два домінантні морфотипи - *Phyllobacterium ifriqiyense* 1 та *Bacillus velezensis* 10, детально досліджені їх властивості. Отже на підставі проведених досліджень можна зробити такі висновки:

1) За результатами аналізу чисельності мікроорганізмів різних фізіологічних груп чорнозему типового в агроценозі ячменю встановлено, що застосування удобрення побічною продукцією + $N_{45}P_{42}K_{55}$ сприяє формуванню відповідних трофічних зв'язків в структурі мікробного комплексу та збільшенню чисельності амоніфікувальних мікроорганізмів до 7,9 – 17,5; азотфіксаторів до 3,8 – 23,6, іммобілізаторів мінерального азоту до 7,3 - 18,1, спороутворюючих до 4160,5 – 51956 тис./г ґрунту, целюлозоруйнівних до 214 – 867,8 тис. КУО/г ґрунту у фазу цвітіння ячменю ярого. Та зменшенню чисельності мікроорганізмів оліготрофів до 0,5 – 8,7 та педотрофів до 0,8 – 22,5 млн КУО/г ґрунту у фазу воскової стиглості ячменю ярого.

2) За результатами аналізу структури якісного складу досліджено розподіл домінуючих форм бактерій чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого та встановлено, що збільшення різноманіття виявлених морфотипів до 67 у фазу цвітіння та до 84 у фазу воскової стиглості обумовлено накопиченням у ґрунті значної кількості корневих ексудатів у період активної вегетації рослин та органічних речовин за рахунок надземної та підземної біомаси рослин. Виявлено, що формування різноманіття мікробного комплексу, збільшення видового складу мікроорганізмів з незначною кількістю домінуючих форм до 11 % у фазу цвітіння, до 9 % у фазу воскової стиглості та більш рівномірним їх розподілом з високим ступенем різнонаправленості мікробних процесів обумовлено розкладом добрива побічна продукція (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ до більш легкозасвоюваних сполук.

3) Результати порівняльного аналізу екологічних індексів показали, що застосування органо-мінеральної системи удобрення з середньою меншою мінерального добрива сприяє формуванню різноманіття бактеріального комплексу чорнозему типового в агроценозі ячменю ярого, про що свідчать значення індексу Шеннона (1,21), та більш рівномірному розподілу бактерій по насиченості морфотипів, та зниження індексу домінування Сімпсона (0,07). Застосування тільки мінерального добрива призводить до зниження бактеріального біорізноманіття ґрунту та формування мікробного комплексу з високим ступенем домінування певних морфотипів бактерій на початку та в період активної вегетації рослин ячменю ярого.

4) При аналізі метагеному прокаріотного комплексу чорнозему було виявлено, що у варіанті з удобренням рослинними рештками попередника та мінеральним добривом розвивалось майже у 2 рази більше видів бактерій порівняно з варіантом контролю. При цьому дані варіанти призводили до розвитку бактерій (до 76%), які не культивуються на селективних середовищах. Органо-мінеральна система удобрення ґрунту формувала досить високі показники біорізноманіття ґрунтових мікроорганізмів (в 1,5–2 рази порівняно з варіантом контролю). Найширша і складніша будова філотипового різноманіття ґрунтових мікроорганізмів була за удобрення побічною продукцією (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$ і представлена 2 основними кластерами, які відповідають домінуючим генотипам, 6 підкластерами, 22 видами, 54% з яких некультивовані.

5) Вперше ідентифіковано два домінантні морфотипи, що належать до роду *Phyllobacterium* та роду *Bacillus*. Ризосферні бактерії цих родів часто проявляють властивості азотфіксації, що дозволяє зменшити використання хімічних добрив та підвищити врожайність рослин. Здійснювати біологічний контроль захворювань рослин, виробляючи різні антибіотики та біоактивні сполуки, які допомагають у боротьбі за патогенними мікроорганізмами. За філогенетичним аналізом отримано нуклеотидну послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Phyllobacterium ifriqiense* 1 загальною довжиною 991 нуклеотид та штаму *Bacillus velezensis* 10 — 1126 нуклеотидів. Первинний порівняльний аналіз сиквенсів досліджуваних штамів

з послідовностями гена 16S рРНК, задепонованими у базі даних GenBank, виявив 99% подібності штамів до сиквенсів типових представників відповідних видів. Нуклеотидні послідовності штаму *Phyllobacterium ifriqiyense 1* зареєстровано у базі GenBank під № МК947049 і МК947055, та *Bacillus velezensis 10* – МК947050 і МК947056 відповідно.

6) Дослідження щодо антагоністичної активності морфотипів бактерій, що домінують у ризосфері ячменю ярого, проявлялась уже на третю добу досліду й підсилювала свій вплив на ріст і розвиток фітопатогенних мікроміцетів упродовж експерименту. За отриманими результатами досліджень бактерії *Bacillus velezensis 10* та *Phyllobacterium ifriqiyense 1* на 3 добу досліду пригнічували ріст та розвиток фітопатогенних мікроміцетів, зокрема, зони затримки росту мікроміцетів були такі: *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 3 і 9 мм відповідно, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 11 і 13 мм та *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 5 і 11 мм відповідно. Та на 10 добу досліду бактерії *Bacillus velezensis 10* та *Phyllobacterium ifriqiyense 1* пригнічували ріст грибів *Fusarium sporotrichioides* Sherb. 23.2 – 1 та 2 мм, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 3.45 – 3 і 5 мм та *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch. 18.77 – 2 та 7 мм відповідно. Ризосферні бактерії *Bacillus velezensis 10* та *Phyllobacterium ifriqiyense 1*, мають антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів, а також проявляють інгібуючий вплив на них, а отже, і можливість конкурувати з конкретними дослідженими фітопатогенами рослин.

7) Обробка насіння ячменю бактеріальною суспензією домінантних морфотипів показала дуже високий рівень позитивного впливу особливо при розведенні 1:1. Спостерігалось збільшення довжини коренів тест-рослин ячменю ярого на 84,3 % щодо контролю, та збільшення пагонів на 33,7% при інокуляції *P. ifriqiyense 1*. Інокуляція бактеріальними суспензіями *P. ifriqiyense 1* та *B. velezensis 10* сприяє активізації функцій фотосинтетичного апарату рослин ячменю в лабораторних умовах. А параметр впливу екзогенних факторів (К1) що відповідає впливу чинників зовнішнього середовища на рослинний організм у тест-рослин становив 71,0 та 77,0 %; а показник впливу ендогенних чинників (К3), що відповідає внутрішньо-системним чинникам, становив відповідно — 55,0 та 99,0%.

8) Виділені домінантні морфотипи ризосфери - *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 раніше не розглядалися в якості можливих агентів для біологічних препаратів при вирощування ячменю ярого. Вони продемонстрували перспективність у напрямку широкого спектру функціональної активності щодо рослини, починаючи від контролю мікробіоти та фітопатогенних форм мікроорганізмів, і завершуючи біоріємедіаційними властивостями відносно забруднених ґрунтів, а також виробництва фармацевтичних препаратів.

ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА

Як ефективний метод сучасного аграрного виробництва рекомендується застосування удобрення ячменю ярого рослинними рештками попередника та мінеральним добривом у нормі (3,0 т/га) + $N_{45}P_{42}K_{55}$.

Досить перспективним є використання бактерій *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 як основи біопрепаратів для збільшення врожайності ячменю ярого. Для цього вважається за доцільне розробка технології виробництва бактеріальної суспензії та її застосування в польових умовах.

Рекомендується передпосівна обробка насіння ячменю ярого бактеріальною суспензією у концентрації 1:1, титр $6,0 \cdot 10^7$ КУО/мл та нормі використання 1,5 л/т для збільшення врожайності та профілактики захворювання рослин.

Для оптимального розвитку рослин, активізації процесів фотосинтезу та стимуляції росту кореневої системи і мікробного біому ризосфери рекомендується обробка рослин за типом позакореневого підживлення у концентрації 1:2 з тим самим титром.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Балаєв А. Д., Тонха О. Л., Козак В. М., Карабач К. С. Методичні рекомендації з застосування ресурсощадних технологій вирощування озимої пшениці в короткоротаційних сівозмінках Правобережного Лісостепу України. Київ, 2011. 35 с.
2. Бойко М., Патика Т., Патика М., Вінцковська Ю. Оцінка антагоністичних властивостей штамів бактерій роду *Bacillus*. *Садівництво*. 2017. 72. С. 148-155.
3. Гадзало Я. М., Патика М. В., Заришняк А. С. Агробіологія ризосфери рослин: монографія. К. : Аграрна наука, 2015. 386 с.
4. Єщенко В., Накльока Ю., Савранська Л., Калієвський М. В. (2009). Біогенність чорнозему опідзоленого за різних факторів мінімалізації основного обробітку ґрунту. *Вісник ХНАУ ім. В. В. Докучаєва. Серія «Ґрунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство, екологія»*. 2009. 2. С. 127–134.
5. Іутинська Г. О. Ґрунтова мікробіологія: навчальний посібник. К. : Арістей, 2006. 284 с.
6. Кулік А.Ф. Біорізноманіття та роль зооценозу в природних і антропогенних екосистемах. Матеріали III Міжнародної наукової конференції. Д. : Вид-во ДНУ. 2005. 125-127 с.
7. Малиновська І. М., Ткаченко М. А. Чисельність та фізіолого-біохімічна активність мікроорганізмів горизонтів сірого лісового ґрунту. *Збірник наукових праць ННЦ «Інститут землеробства НААН»*. 2015. 4. С. 13–24.
8. Мельничук А. О., Тараріко М. Ю. Цикл карбону та азоту за різних систем удобрення в сівозміні на дерново-підзолистому ґрунті в Поліссі. *Збалансоване природокористування*. 2015. 1. С. 53–56.
9. Мікробіологія ґрунту. Терміни та визначення: ДСТУ 3750-98. – [Чинний від 1999-07-01]. – К. : Держспоживстандарт України, (1999): 9 с. (Національні стандарти України).
10. Москалевська Ю., Патика М. Функціональне різноманіття мікробіоти чорнозему типового при вирощуванні буряка цукрового. *Збірник наукових*

праць Уманського національного університету садівництва. 2014. 85. С. 47–54.

11. Патика В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. Біологічний азот: монографія. К. : СВІТ, 2003. 424 с.
12. Патика В. П., Тихонович І. А., Філіп'єв І. Д. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. К. : Урожай, 1993. 176 с.
13. Патика М. В., Бойко Ю. П., Цюк О. А. Особливості формування різноманіття еубактеріального комплексу ризосфери буряка цукрового (*Beta vulgaris*) при застосуванні різних агрозаходів. *Мікробіологічний журнал*. 2017. 2. С. 86-94.
14. Патика М. В., Колодяжний О. Ю., Борко Ю. П. Сучасні молекулярно-біологічні методи вивчення мікробного біому та матагеному ґрунтів аграрного використання. *Агрохімія і ґрунтознавство*. 2017. 86. С. 116-124.
15. Патика М. В., Колодяжний О. Ю., Ібатуллин І. І. Оцінка метагенома та детекція функціонально-значущих поліморфізмів прокаріот ґрунту з використанням методу піросеквінування. *Мікробіологічний журнал*. 2016. 78 (2). С. 43-50.
16. Патика Т. І., Дудіна Т. А., Патика М. В. Особливості розвитку та функціонування мікробних угруповань в агроценозах плодових, ягідних насаджень. *Садівництво*. 2016. 71. С. 123-129.
17. Стариченко В. М., Патика М. В., Голик Л. М. Контроль стану посівів за флуоресценцією хлорофілу в листках пшениці озимої м'якої на різних етапах органогенезу. *Науковий вісник НУБіП України*. 2016. 1. С. 234.
18. Токмакова Л. М., Трепач А. О. Мікробіологічна деструкція органічної речовини в агроценозах. *Вісник аграрної науки*. 2022. 2. С. 19–27.
19. Тонха О. Л. Біогенність та склад мікробних ценозів цілинних і освоєних чорноземів Українського степового заповідника (відділення «Михайлівська цілина»). *Науковий вісник НУБіП України*. 2011. №162. С. 100–106.
20. Тонха О. Л. Мікробний ценоз і органічна речовина чорноземів Українського степового природного заповідника (відділення «Михайлівська цілина») за різного їх використання. *Вісник ХНАУ ім. В.В. Докучаєва. Серія*

«Грунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство, еволюція ґрунтів». 2011. 1. С. 101–107.

21. Тонха О. Л. Мікробна трансформація органічної речовини чорнозему типового за різних обробітків ґрунту. *Вісник ХНАУ ім. В.В. Докучаєва. Серія «Грунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство, еволюція ґрунтів»*. 2012. 4. С. 61–66.
22. Тонха О. Л. Молекулярно-генетична оцінка прокаріотного комплексу чорнозему типового. *Вісник аграрної науки*. 2012. №1. С. 38–41.
23. Шевченко І. П., Драч Ю. О., Яценко С. В. Вплив способів обробітку і добрив на стан мікробного ценозу та фітотоксичні властивості чорнозему типового еродованого. *Вісник аграрної науки*. 2006. 10. С. 12–15.
24. Цюк А. А. Продуктивність ріллі зерно-просапної сівозміни Лісостепу під впливом екологізації землеробства. *Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В. В. Докучаєва. Серія «Грунтознавство, агрохімія, землеробство, лісове господарство»*. 2008. 4. С. 75–78.
25. Якість ґрунту. Відбирання проб. ДСТУ 4287:2004. – [Чинний від 2004-04-30]. – К. : Держспоживстандарт України, (2005): 5 с. (Національні стандарти України).
26. Якість ґрунту. Відбирання проб. Частина 1. Настанови щодо складання програм відбирання проб (ISO 10381–1:2002, IDT). ДСТУ ISO 10381–1:2004. – [Чинний від 2004-11-30]. – К. : Держспоживстандарт України, (2006): 31 с. (Національні стандарти України).
27. Якість ґрунту. Відбирання проб. Частина 2. Настанови з методів відбирання проб (ISO 10381–2:2002, IDT). ДСТУ ISO 10381–2:2004. – [Чинний від 2004-11-30]. – К. : Держспоживстандарт України, (2006): 23 с. (Національні стандарти України).
28. Якість ґрунту. Визначання загального вмісту азоту. модифікований метод К'ельдаля. ДСТУ ISO 11261:2001. – [Чинний від 2001-04-01]. – К. : Держспоживстандарт України, (2002): 9 с. (Національні стандарти України).
29. Якість ґрунту. Методи визначання органічної речовини. ДСТУ 4289:2004. –

[Чинний від 2004-04-30]. – К. : Держспоживстандарт України, (2005): 9 с. (Національні стандарти України).

30. Ab Rahman S. F., Singh E., Pieterse C. M., Schenk P. M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*. 2018. 267. P. 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
31. Adeniji A. A., Loots D. T., Babalola O. O. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. 103 (9). P. 3659. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
32. Ahmad H. M., Fiaz S., Hafeez S., Zahra S., Shah A. N., Gul B., Aziz O., Mahmood-Ur-Rahman., Fakhar A., Rafique M., Chen Y., Yang S. H., Wang X. Management of rhizosphere microbiota and plant production under drought stress: A comprehensive review. *Plants (Basel)*. 2022. 11 (18). P. 24-37.
33. Agler M. T., Ruhe J., Kroll S., Morhenn C., Kim S.-T., Weigel D., Kemen E. M. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biology*. 2016. 14 (1). P. 23-52. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002352>
34. Alenezi F. N., Ben Slama H., Chenari Bouket A., Cherif-Silini H., Silini A., Luptakova L., Nowakowska J. A., Oszako T., Belbahri L. *Bacillus velezensis*: a treasure house of bioactive compounds of medicinal, biocontrol and environmental importance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, No 11. P. 55-66. doi: 10.3390/ijms22115566
35. Alexander, M. Microbiology of the rhizosphere. Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York London Sydney, 1961. 444–445 pp.
36. Almario J., Jeena G., Wunder J., Langen G., Zuccaro A., Coupland G., Bucher M. Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabis alpina* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. 14 (44). P. 12-40. doi: 10.1073/pnas.1710455114.
37. Alori E. T., Glick B. R., Babalola O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 2017. 8. P. 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
38. Amruta N., Prasanna Kumar M. K., Narayanaswamy S., Gowda M., Channakeshava

- B. C., Vishwanath K. Isolation and identification of rice blast disease-suppressing antagonistic bacterial strains from the rhizosphere of rice. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2016. 10 (2). P. 1043-1054.
39. Anderson J. P. E., Domsch K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1978. 10 (3). P. 215-221. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8)
 40. Andrade G., Mihara K. L., Linderman R. G., Bethlenfalvay G. J. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 1997. 192. P. 71-79. doi: 10.1023/A:1004210113916
 41. Arcate J. M., Karp M. A., Nelson E. B. Diversity of *Peronosporomycete* (Oomycete) communities associated with the rhizosphere of different plant species. *Microbial Ecology*. 2006. 51. P. 36-50. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0222-2>
 42. Arora S., Sahni D. Pesticides effect on soil microbial ecology and enzyme activity- An overview. *Journal of Applied and Natural Science*. 2016. 8 (2). P. 1126-1132.
 43. Ash C., Farrow J.A., Dorsch M., Stackebrandt E., Collins M.D. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematics Bacteriology*. 1991. 41 (3). P. 343-346.
 44. Bardgett R. D., Bowman W. D., Kaufmann R., Schmidt S. K. A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *Trends in Ecology & Evolution*. 2005. 20 (11). P. 634-641. doi: 10.1016/j.tree.2005.08.005
 45. Badri D. V., Vivanco J. M. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*. 2009. 32 (7). P. 666-681. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x
 46. Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2006. 57. P. 233-266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
 47. Baite M. S., Prabhukarthikeyan S. R., Raghu S. Biological control of a fungus *Ustilaginoidea virens* causing false smut of rice. *BioControl*. 2022. 67 (2). P. 357-363. <https://doi.org/10.1007/s10526-022-10148-4>

48. Baker B. P., Green T. A., Loker A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control*. 2020. 140. P 95-114. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>
49. Baldock J. A., Skjemstad J. O. Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. *Organic geochemistry*. 2009. 31 (8). P. 697-710. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00049-8)
50. Baldrian P. The known and the unknown in soil microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 2019. 95 (2). fiz005. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz005>
51. Bal'-Prilipko L. V., Patyka N. V., Leonova B. I., Starkova E.R., Brona A.I. Trends achievements and prospects of biotechnology in the food industry. *Mikrobiologichnyi zhurnal*. 2016. 78 (3). P. 99-111.
52. Barret M., Briand M., Bonneau S., Préveaux A., Valière S., Bouchez O., Jacques M. A. Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. 81 (4). P. 1257-1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.03722-14>
53. Bastida F., Eldridge D. J., García C., Png G. K., Bardgett R. D., Delgado-Baquerizo M. Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *The ISME Journal*. 2021. 15. P. 2081–2091.
54. Battini F., Gronlund M., Agnolucci M., Giovannetti M., Jakobsen I. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Scientific Reports*. 2017. 7. P. 46-62.
55. Bej A. K., McCarty S. C., Atlas R. M. Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991. 57 (8). P. 2429–2432. doi: 10.1128/aem.57.8.2429-2432.1991
56. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009. 68 (1). P. 1-13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x
57. Bergey D. H. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1st Edition. Williams &

Wilkins, Baltimore. 1975. 4-201 pp.

58. Blanco-Canqui H., Lal R. No-tillage and soil-profile carbon sequestration: an on-farm assessment. *Soil Science Society of America Journal*. 2008. 72 (3). P. 693-701.
59. Bodenhausen N., Bortfeld-Miller M., Ackermann M., Vorholt J. A. A synthetic community approach reveals plant genotypes affecting the phyllosphere microbiota. *PLoS Genetics*. 2014. 10 (4). e1004283. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004283>
60. Caporaso S., Esposito A., Mazzoleni S. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. *New Phytologist*. 2006. 169 (3). P. 571-578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01611.x>
61. Bonito G., Reynolds H., Robeson M. S., Nelson J., Hodkinson B. P., Tuskan G., Schadt C. W., Vilgalys R. Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Molecular Ecology*. 2014. 23 (13). P. 3356-3370. <https://doi.org/10.1111/mec.12821>
62. Bordenstein S. R., Theis K. R. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLOS Biology*. 2015. 13 (8). e1002226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
63. Bouffaud M. L., Poirier M. A., Muller D., Moënne-Loccoz Y. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other poaceae. *Environmental Microbiology*. 2014. 16 (9). P. 2804-2814. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12442>
64. Bravo A., Gill S. S., Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007. 49. P. 423-435.
65. Breitzkreuz C., Buscot F., Tarkka M., Reitz T. Shifts between and among populations of wheat rhizosphere *Pseudomonas*, *Streptomyces* and *Phyllobacterium* suggest consistent phosphate mobilization at different wheat growth stages under abiotic stress. *Frontiers in Microbiology*. 2020. 10. P. 103-109.
66. Bresson J., Vasseur F., Dauzat M., Labadie M., Varoquaux F., Touraine B., Vile D. Interact to Survive: *Phyllobacterium brassicacearum* improves *Arabidopsis* tolerance to severe water deficit and growth recovery. *PLoS One*. 2014. 9 (9). e107607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107607>

67. Broderick N. A., Raffa K. F., Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2006. 103. P 196-199.
68. Brückner R., Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*. 2002. 209 (2). P. 141-148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11123.x>
69. Buée M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*. 2009. 321. P. 189-212.
70. Bulgarelli D., Rott M., Schlaeppi K., Ver Loren van Themaat E., Ahmadinejad N., Assenza F., Rauf P., Huettel B., Reinhardt R., Schmelzer E., Peplies J., Gloeckner F. O., Amann R., Eickhorst T., Schulze-Lefert P. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 2012. 488. P. 91-95.
71. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Van Themaat E. V. L., Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2013. 64. P. 807-838.
72. Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P. C., Weiman A., Dröge J., Pan Y., McHardy A. C., Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*. 2015. 17 (3). P. 392-403. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
73. Busse H. J., Denner E. B., Lubitt W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*. 1996. 47. P. 3-38.
74. Buszewski B., Rogowska A., Pomastowski P., Złoch M., Railean-Plugaru V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Jurnal of AOAC International*. 2017. 100. P. 1607-1623.

75. Cardinale M., Grube M., Erlacher A., Quehenberger J., Berg G. Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environmental Microbiology*. 2015. 17 (1). P. 239-252. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12686>
76. Case R. J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W. F., Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*. 2007. 73 (1). P. 278-288. doi: 10.1128/AEM.01177-06
77. Catley, B. J. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Applied Microbiology*. 1971. 22 (4). P. 641-649. <https://doi.org/10.1128/am.22.4.641-649.1971>
78. Chakraborty M., Mahmud N. U., Ullah C., Rahman M., Islam T. Biological and biorational management of blast diseases in cereals caused by *Magnaporthe oryzae*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021. 41 (8). P. 994-1022. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1898325>
79. Chandrashekar R., Revathi K., Jayanthi S. Combined effect of *Bacillus subtilis* against *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2015. 7. P. 127-141.
80. Chanway C.P., Shishido M., Holl F.B. Root-endophytic and rhizosphere plant growth-promoting rhizobacteria for conifer seedlings. In Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds.): *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*. CSIRO Division of Soils, Australia. 1994. 72-74 pp.
81. Chaparro J. M., Badri D. V., Vivanco J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*. 2014. 8 (4). P. 790-803.
82. Chelius M. K., Triplett E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*. 2001. 41. P. 252-263.
83. Chen X. H., Koumoutsis A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süßmuth R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. 2009. 140 (1-2). P. 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>

84. Chen Z., Zhao L., Dong Y., Chen W., Li C., Gao X. The antagonistic mechanism of *Bacillus velezensis* ZW10 against rice blast disease: evaluation of ZW10 as a potential biopesticide. *PLoS One*. 2021. 16 (9). e0256807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256807>
85. Cheng X., Ji X., Ge Y., Li J., Qi W., Qiao K. Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. *Phytopathology*. 2019. 109 (4). P. 571-581.
86. Chung E. J., Hossain M. T., Khan A., Kim K. H., Jeon C. O., Chung Y. R. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *Plant Pathology Journal*. 2015. 31 (1). P. 1-13. doi: 10.5423/PPJ.OA.12.2014.0136
87. Clark F.E. Soil microorganisms and plant roots. *Advances in Agronomy*. 1st edition. Elsevier. 1949. 241- 288 pp.
88. Coince A., Cael O., Bach C., Lengelle J., Cruaud C., Gavory F., Buée M. Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology*. 2013. 6. P. 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>
89. Coleman J. J., Ghosh S., Okoli I., Mylonakis E. Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites. *PLoS ONE*. 2011. 6 (9). P. e25321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025321>
90. Coleman-Derr D., Desgarennes D., Fonseca-Garcia C., Gross S., Clingenpeel S., Woyke T., Tringe S. G. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*. 2016. 209 (2). P. 798-811. doi: 10.1111/nph.13697
91. Conant R. T., Cerri C. E., Osborne B. B., & Paustian K. Grassland management impacts on soil carbon stocks: a new synthesis. *Ecological Applications*. 2017. 27 (2). P. 662-668. <https://doi.org/10.1002/eap.1473>

92. Copeland J. K., Yuan L., Layeghifard M., Wang P. W., Guttman D. S. Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28 (3). P. 274-285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0331-FI>
93. Coutinho T. A., Bophela K. N. Forest microbiology. tree leaves as a habitat for *Phyllobacteria*. Academic Press. 2021. 133-144 pp.
94. Cristofolletti P. T., Ribeiro A. F., Deraison C., Rahbe Y., Terra W. R. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*. 2003. 49. P. 11-24.
95. Czigány S., Sarkadi N., Lóczy D., Cséplő A., Balogh R., Fábrián S. Á., Ciglić R., Ferk M., Pirisi G., Imre M., Nagy G., Pirkhoffer E. Impact of agricultural land use types on soil moisture retention of loamy soils. *Sustainability*. 2023. 15 (6). 25-49. <https://doi.org/10.3390/su15064925>
96. Dakora F. D., Phillips D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. *Plant and Soil*. 2002. 245. P. 35-47.
97. Danhorn T., Fuqua, C., (2007): Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61: 401-422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
98. D'Angioli, A., Viani R., Lambers H. Inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V4, Ab-V5) increases Zea mays root carboxylate-exudation rates, dependent on soil phosphorus supply. *Plant and Soil*. 2017. 410. P. 499-507.
99. Davis K. E., Joseph S. J., Janssen P. H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. 71 (2). P. 826-834. doi:10.1128/AEM.71.2.826-834.2005
100. Davison J., Öpik M., Daniell T. J., Moora M., Zobel M. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011. 78 (1). P. 103-115. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01103.x.

101. de Barjac H. Insect pathogens in the genus *Bacillus*. Aerobic Endospore forming Bacteria: Classification and Identification. R.C.W. and Goodfellow, New York: Academic Press. 1981. 241-250 pp.
102. de Maagd R.A., Weemen-Hendriks M., Molthoff J.W., Naimov S. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Archives of Microbiology*. 2003. 179. P. 363-367.
103. de Souza R., Ambrosini A., Passaglia L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015. 38 (4). P. 401-419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053
104. de Vries F. T., Thébault E., Liiri M., Richard D. Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. 110 (35). P. 296-301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305198110>
105. Delamare J., Brunel-Muguet S., Morvan-Bertrand A., Cantat O., Firmin S., Trinsoutrot-Gattin I., Le Franc L., Personeni E. Thermopriming effects on root morphological traits and root exudation during the reproductive phase in two species with contrasting strategies: *Brassica napus* (L.) and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Environmental and Experimental Botany*. 2023. 210. P. 105-118. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105318>
106. Deng Y. W., Ning Y. S., Yang D. L., Zhai K., Wang G. L., He Z. H. Molecular basis of disease resistance and perspectives on breeding strategies for resistance improvement in crops. *Molecular Plant*. 2020. 13 (10). P. 1402-1419. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.018>
107. Derpsch R., Friedrich T., Kassam A., Hongwen L. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2010. 3 (1). P. 1-25.
108. Dombrowski N., Schlaeppi K., Agler M. T., Hacquard S., Kemen E., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P. Root microbiota dynamics of perennial *Arabidopsis alpina* are dependent on soil residence time but independent of flowering time. *ISME Journal*. 2017. 11. P. 43-55.

109. Dong X. Z., Cai M. Y. Manual for systematic identification of common bacteria. Science Press. 2001. 354-398 pp.
110. Dong Y., Iniguez A. L., Ahmer B. M., Triplett E. W. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. 69 (3). P. 1783-1790. doi: 10.1128/AEM.69.3.1783-1790.2003
111. Donn S., Kirkegaard J. A., Perera G., Richardson A. E., & Watt M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. *Environmental Microbiology*. 2014. 16 (3). P. 825-838. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12452>
112. Doran J. W., Parkin T. B. Defining and assessing soil quality. In *Soil Science Society of America Journal*, Madison. 1994. 3-21 pp. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c1>
113. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987. 19 (1). P. 11-15.
114. Du S., Trivedi P., Wei Z., Feng J., Hu H. W., Bi L., Huang Q., Liu Y. R. The proportion of soil-borne fungal pathogens increases with elevated organic carbon in agricultural soils. *mSystems*. 2022. 7. P. e01337-e1421. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01337-21>
115. Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2006. 308 (5728). P. 1635-1638. doi:10.1126/science.1110591
116. Edwards C. A., Bohlen P. J. Biology and ecology of earthworms. Springer Science & Business Media. 1992. 105-157 pp.
117. Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C., Liechty Z., Nguyen B., Lurie E., Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. 112 (8). P. 911-929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
118. Eilers, K. G., Lauber C. L., Knight R., Fierer N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to

- soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. 42 (6). P. 896-903. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.003>
119. Eivazi, F., Tabatabai, M. A. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1990. 22 (7). P. 891-897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-K)
 120. El-Beltagi H. S., Basit A., Mohamed H. I., Ali I., Ullah S., Kamel E. A. R., Shalaby T. A., Ramadan K. M. A., Alkhateeb A. A., Ghazzawy H. S. Mulching as a sustainable water and soil saving practice in agriculture: A review. *Agronomy*. 2022. 12 (8). P. 68-81. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081881>
 121. El-Beltagi H. S., Hashem F. A., Maze M., Shalaby T. A., Shehata W. F., Taha N. M. Control of gas emissions (N₂O and CO₂) associated with applied different rates of nitrogen and their influences on growth, productivity, and physio-biochemical attributes of green bean plants grown under different irrigation methods. *Agronomy*. 2022. 12 (249). <https://doi.org/10.3390/agronomy12020249>
 122. Ewing W.H. Enterobacteriaceae. Biochemical methods for group differentiation. NCDC Publication, Atlanta, Georgia. 1964. 178-216 pp.
 123. Fan B., Wang C., Song X. F. *1 FZB42* in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in microbiology*. 2018. 9. P. 24-41. doi: 10.3389/fmicb.2018.01279
 124. Fierer N., Jackson R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103 (3). P. 626-631. doi: 10.1073/pnas.0507535103
 125. Flores-Félix J. D., Carro L., Velazquez E., Valverde A., Cerda Castillo M. E., Garcia-Fraile P., Rivas R. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov. isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* in Northern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012. 63 (3). doi: 10.1099/ijs.0.038497-0.
 126. Franco-Duarte R., Černáková L., Kadam S., Kaushik K., Salehi B., Bevilacqua A., Corbo M.R., Antolak H., Dybka-Stępień K., Leszczewicz M., Relison Tintino S., Alexandrino de Souza V.C., Sharifi-Rad J., Melo Coutinho H.D., Martins N.,

- Rodrigues C.F. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms - From past to present. *Microorganisms*. 2019. 7 (5). P. 130-144.
127. Franzluebbers, A. J. Achieving soil organic carbon sequestration with conservation agricultural systems in the Southeastern United States. *Soil Science Society of America Journal*. 2010. 74 (2). P. 347-357. <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0079>
 128. Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A. Bacterial-Fungal Interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011. 75 (4). P. 583–609. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>
 129. Fritze, D. *Bacillus* identification - traditional approaches. In Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N., De Vos P., (eds.): Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Blackwell Science Ltd. 2002. 234-319 pp.
 130. Gałazka A., Gawryjolek K., Perzyński A., Gałazka R., Księżak J. Changes in enzymatic activities and microbial communities in soil under long-term maize monoculture and crop rotation. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2017. 26 (1). P. 39-46.
 131. Garbaye J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 1994. 128 (2). P. 197-210. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x
 132. García-Orenes F., Guerrero C., Roldán A., Mataix-Solera J., Cerdà A., Campoy M., Zornoza R., Bárcenas G., Caravaca F. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*. 2010. 109 (2). P. 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.05.005>
 133. Gao R. P., Duan Y., Zhang J., Ren Y. F., Liang J. M., Jing Y. P., Zhao P. Y. Effects of long-term fertilization on soil microbial diversity and community structure in the agro-pastoral ecotone. *PubMed*. 2022. 44 (2). P. 1063-1073. doi: 10.13227/j.hjlx.202203143.
 134. Garcia-Vallvé S., Palau J., Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*. 1999. 16. P. 1125- 1134.

135. Ge G., Li Z., Fan F., Chu G., Hou Z., Liang Y. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant and Soil*. 2010. 326 (1-2). P. 31-44.
136. Ghignone S., Salvioli A., Anca I., Lumini E., Ortu G., Petiti L., Cruveiller S., Bianciotto V., Piffanelli P., Lanfranco L., Bonfante P. The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *The ISME Journal*. 2012. 6. P. 136-145. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.110>
137. Ghonaim M. M., Mohamed H. I., Omran A. Evaluation of wheat salt stress tolerance using physiological parameters and retrotransposon-based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2021. 68. P. 227-242.
138. Glynou K., Ali T., Buch A. K., Haghi Kia S., Ploch S., Xia X., Çelik A., Thines M., Maciá-Vicente J. G. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environmental microbiology*. 2016. 18. P. 2418–2434. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13183>
139. Godini R., Fallahi H. A brief overview of the concepts, methods and computational tools used in phylogenetic tree construction and gene prediction. *Meta Gene*. 2019. 21. P. 65-86. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100586>
140. Goetghebuer L., Servais P., Isabelle F. Carbon utilization profiles of river bacterial strains facing sole carbon sources suggest metabolic interactions. *FEMS Microbiology Letters*. 2017. 364. P. 73-98.
141. Gonzalez-Bashan L.E., Lebsky V.K., Hernandez J.P., Bustillos J.J., Bashan Y. Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000. 46. P. 653-659.
142. Gottel N. R., Castro H. F., Kerley M., Yang Z. M., Pelletier D. A., Podar M., Schadt C. W. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. 77 (17). P. 5934-5944. doi: 10.1128/AEM.05255-11.

143. Goudar G., Alagawadi A.R., Krishnaraj P.U., Basavana G.K. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates of western ghats and their insecticidal activity against diamond black moth (*Plutella xylostella* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Science*. 2012. 25 (2). 199-202.
144. Griffiths B. S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G., Caul S. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998. 31 (1). P. 145-153. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00117-5)
145. Griffiths R. I., Whiteley A. S., O'Donnell A. G., Bailey M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. 66 (12). P. 5488-5491. doi: 10.1128/aem.66.12.5488-5491.2000
146. Gu S., Hu Q., Cheng Y., Bai L., Liu Z., Xiao W., Gong Z., Wu Y., Feng K., Deng Y., Tan L. Application of organic fertilizer improves microbial community diversity and alters microbial network structure in tea (*Camellia sinensis*) plantation soils. *Soil and Tillage Research*. 2019. 195. P. 104-156.
147. Guo L. B., Gifford R. M. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology*. 2002. 8 (4). P. 345-360. <https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x>
148. Gurtler V., Stanisich V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 1996. 142. P. 3-16.
149. Haack S. K., Garchow H., Klug M. J., Forney L. J. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. 61 (4). P. 1458-1468. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1458-1468.1995>
150. Hacquard S. Disentangling the factors shaping microbiota composition across the plant holobiont. *New Phytologist*. 2016. 209 (2). P. 454-457. <https://doi.org/10.1111/nph.13760>

151. Haggag K. H. E., Yousef H. A. Differentiation among *Egyptian Bacillus thuringiensis* strains at sporulation by whole cellular protein profiles. *Journal of Agriculture Science*. 2010. 6. P. 224-233.
152. Haichar F. Z., Santaella C., Heulin T., Achouak W. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*. 2014. 7. P. 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
153. Haney C. H., Samuel B. S., Bush J., Ausubel F. M. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*. 2015. 1. P. 35-51. doi:10.1038/nplants.2015.51.
154. Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2015. 79 (3). P. 293-320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
155. Hassani M. A., Durán P., Hacquard S. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*. 2018. 6 (1). P. 58. doi: 10.1186/s40168-018-0457-7
156. Hinsinger P., Herrmann L., Lesueur D., Robin A., Trap J., Waithaisong K., Plassard C. Impact of roots, microorganisms, and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. In H. Lambers & C. P. William (Eds.), Wiley-Blackwell. 2015. 377-398 pp.
157. Hiruma K., Gerlach N., Sacristán S., Nakano R. T., Hacquard S., Kracher B., Schulze-Lefert P. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*. 2016. 165 (2). P. 464-474. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.028.
158. Honchar A. N., Tonkha O. L., Patyka N. V., Makarchuk O. S. Peculiarities of change in number and composition of winter wheat rhizosphere microbiome in the process of ontogenesis. *Plant and Soil Science*. 2021. 3. P. 56-65. doi: 10.31548/agr2021.03.056

159. Horner-Devine M. C., Carney K. M., Bohannon B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *The Royal Society Publishing*. 2004. 271. P. 113-122. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2549>
160. Horton M. W., Bodenhausen N., Beilsmith K., Meng D., Muegge B. D., Subramanian S., Vetter M. M., Vilhjálmsson B. J., Nordborg M., Gordon J. I., Bergelson J. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. *Nature Communications*. 2014. 5. P. 28-53. <https://doi.org/10.1038/ncomms6320>
161. Huber H. E., Luthy P., Ebersold H. R., Cordier J. L. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. *Archives of Microbiology* 1981. 129. P. 14-18.
162. Hugh R., Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1953. 66. P. 24-26.
163. Ishida J. K., Bini A. P., Creste S., Van Sluys M. A. Towards defining the core *Saccharum microbiome*: input from five genotypes. *BMC Microbiology*. 2022. 22. P. 193-216.
164. Ji X., Yao X., Li X., Zhu L., Wang J., Wang J. Responses of soil microbial community to herbicide atrazine contamination. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2023. 234. P. 25-51. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-5649-9>
165. Johansson J. F., Paul L. R., Finlay R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004. 48 (1). P. 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.11.012>
166. Johnson C. A., Bishop H. A. Technique for the enrichment and isolation of *Bacillus thuringiensis* FEMS. *Microbiology Letter*. 1996. 14. P. 173-177.
167. Johnston A. E., Poulton P. R., Fixen P. E., Curtin D. Phosphorus: its efficient use in agriculture. *Advances in Agronomy*. 2014. 123. P. 177-228.
168. Jurado V., Laiz L., Gonzalez J. M., Hernandez-Marine M., Valens M., Saiz-Jimenez C. *Phyllobacterium catacumbae* sp. nov., a member of the order

- ‘Rhizobiales’ isolated from Roman catacombs. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 2005. 55. P. 1487-1490.
169. Kabala C. Origin, transformation and classification of alluvial soils (mady) in Poland – soils of the year 2022. *Soil Science Annua*. 2022. 73 (3). P. 143-156. <https://doi.org/10.37501/soilsa/156043>
 170. Kanukollu S., Remus R., Rücker A. M., Buchen-Tschiskale C., Hoffmann M., Kolb S. Methanol utilizers of the rhizosphere and phyllosphere of a common grass and forb host species. *Environmental Microbiome*. 2022. 17 (35).
 171. Kaur P., Joshi N., Brar K. S. Morphological and biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates and their evaluation against *Plutella xylostella* Linnaeus. *Journal of Biological Control*. 2006. 20 (2). P. 191-195.
 172. Ke P.-J., Miki T., Ding T.-S. The soil microbial community predicts the importance of plant traits in plant–soil feedback. *New Phytologist*. 2015. 206 (1). P. 329-341. <https://doi.org/10.1111/nph.13215>
 173. Khatri S., Chaudhary P., Shivay Y. S., Sharma S. Role of fungi in imparting general disease suppressiveness in soil from organic field. *Microbial Ecology*. 2023. 85 (1). P. 64-76.
 174. Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 2004. 58 (2). P. 169-188.
 175. Kiroiants M. O. Forming the microbial complex type chernozem in agrofitocenosis of various barley for rise farming systems. *Podilian bulletin*. 2019. 1 (30). P. 39-48. [doi10.37406/2706-9052-2019-1-5](https://doi.org/10.37406/2706-9052-2019-1-5).
 176. Kiroiants M., Patyka T., Patyka M. Phylogenetic analysis of dominant microorganisms of the genera *Bacillus* and *Phyllobacterium*, isolated from the rhizosphere of spring barley. *Visnyk agrarnoi nauky*. 2020. 98 (5). P. 41-47. doi: [10.31073/agrovisnyk202005-06](https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202005-06).
 177. Kiroiants M. O., Patyka M. V., Patyka T. I. Antagonistic activity of dominant strains of bacteria of spring barley rhizosphere against phytopathogenic

- micromycetes. *Plant and Soil Science*. 2021. 12 (2). doi: 10.31548/agr2021.02.054.
178. Kiroiants M., Patyka M., Patyka T. Estimation of the biological efficiency of prospective dominant strains of bacteria in the rhizosphere of spring barley. *Dopovidi Akademii nauk Ukrayiny*. 2021. 1 (89). DOI: 10.31548/dopovidi2021.01.001.
 179. Kiroiants M., Patyka M. The use of methods for identification and studying the functional features of the dominant rhizosphere microorganisms of the barley. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*. 2023. 30 (1). P. 7-15.
 180. Klingauf F.A. Host plant finding and acceptance. Aphids, their biology, natural enemies and control. 2nd Edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 1987. 209-223 pp.
 181. Kohl J., Kolnaar R., Ravensberg W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*. 2019. 10. P. 845-853.
 182. Kovyrova O. Methods of chlorophyll fluorescence induction curves processing. *Computer Tools, Networks and Systems*. 2014. 13. P. 117-124.
 183. Kumar A., Bhoot N., Soni I., John P.J. Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain that degrades endosulfan and endosulfan sulfate. *Biotech*. 2014. 4 (5). P. 467-475.
 184. Kumar K. V. K., Reddy M. S., Kloepper J. W., Lawrence K. S., Groth D. E., Miller M. E. Sheath blight disease of rice (*Oryza sativa* L.). *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2016. 6 (2). P. 65-80.
 185. Lambert B., Joos H., Dierickx S., Vantomme R., Swings J., Kersters K., van Montagu M. Identification and plant interaction of a *Phyllobacterium* sp., a predominant rhizobacterium of young sugar beet plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. 56. P. 1093-1102.
 186. Lambers H., Hayes P. E., Laliberté E., Oliveira R. S., Turner B. L. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. *Trends in Plant Science*. 2015. 20. P. 83-90.

187. Larcher M., Muller B., Mantelin S., Rapior S., Cleyet-Marel J.-C. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytologist Foundation*. 2003. 160. P. 119-125.
188. Larousse M., Rancurel C., Syska C., Palero F., Etienne C., Industri B., Nesme X., Bardin M., Galiana E. Tomato root microbiota and *Phytophthora* parasitica-associated disease. *Microbiome*. 2017. 5 (1). P. 56.-67. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0276-1>
189. Laura T., Jacynthe D. R., Caron J. Short-term improvement in soil physical properties of cultivated histosols through deep-rooted crop rotation and subsoiling. *Agronomy Journal*. 2019. 111. P. 2084-2096.
190. Layeghifard M., Hwang D. M., Guttman D. S. Disentangling Interactions in the Microbiome: A Network Perspective. *Trends in microbiology*. 2016 25 (3). P. 217-228. doi:10.1016/j.tim.2016.11.008
191. Leff J. W., Del Tredici P., Friedman W. E., Fierer N. Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. *Environmental microbiology*. 2015. 17 (7). P. 2352-2361. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12695>
192. Li M., Hong L., Ye W., Wang Z., Shen H. Phyllosphere bacterial and fungal communities vary with host species identity, plant traits and seasonality in a subtropical forest. *Environmental Microbiome*. 2022. 17 (29).
193. Li H., Ye D., Wang X., Settles M. L., Wang J., Hao Z., Zhou L., Dong P., Jiang Y., Ma Z. Soil bacterial communities of different natural forest types in Northeast China. *Plant and Soil*. 2014. 383. P. 203-216.
194. Li S. Z., Chen Y., Yang R. H., Zhang C., Liu Z., Li Y. Isolation and identification of a *Bacillus velezensis* strain against plant pathogenic *Xanthomonas spp.* *Acta Microbiologica Sinica*. 2019. 59. P. 1969–1983. doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20180513

195. Lin. W., Lin. M., Zhou. H., Wu H., Li Z., Lin W. The effects of chemical and organic fertilizer usage on rhizosphere soil in tea orchards. *PloS one*. 2019. 14 (5). P. e0217018.
196. Links M. G., Demeke T., Gräfenhan T., Hill J. E., Hemmingsen S. M., Dumonceaux T. J. Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds. *New Phytologist*. 2014. 202 (2). P. 542-553. <https://doi.org/10.1111/nph.12693>
197. Little. A. E. F., Robinson C. J., Peterson S. B., Raffa K. F., Handelsman J. Rules of engagement: interspecies interactions that regulate microbial communities. *Annual Review of Microbiology*. 2008. 62. P. 375-401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
198. Liu B.-R., Jia G.-M., Chen J., Wang G. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*. 2006. 16 (1). P. 18-24.
199. Liu Z., Cao S., Sun Z., Wang H., Qu S., Lei N., He J., Dong Q. Tillage effects on soil properties and crop yield after land reclamation. *Scientific Reports*. 2021. 11. P. 46-61. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83502-x>
200. Lv C., Wang C., Cai A., Zhou Z. Global magnitude of rhizosphere effects on soil microbial communities and carbon cycling in natural terrestrial ecosystems. *Science of The Total Environment*. 2003. 856 (1). P. 158961. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158961>
201. Lucy M., Reed E., Glick B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology*. 2004. 86 P. 8-25.
202. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2009. 63. P. 541-556.
203. Maida I., Chiellini C., Mengoni A., Bosi E., Firenzuoli F., Fondi M., Fani R. Antagonistic interactions between endophytic cultivable bacterial communities isolated from the medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Environmental microbiology*. 2015. 17 (12). P. 4763-4784. doi: 10.1111/1462-2920.12911

204. Malinich E., Bauer C. Transcriptome analysis of *Azospirillum brasilense* vegetative and cyst states reveals large-scale alterations in metabolic and replicative gene expression. *Microbial Genomics*. 2018. 4 (8). P. e000200.
205. Mantelin S., Fischer-Le Saux M., Zakhia F., Béna G., Bonneau S., Jeder H., de Lajudie P., Cleyet-Marel J. C. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006. 56 (4). P. 827-839. doi: 10.1099/ijs.0.63911-0.
206. Márcio R., Douglas L. K., Moorman T. B. Tillage intensity effects on soil structure indicators — A US meta-analysis. *Sustainability*. 2020. 12. P. 4-17.
207. McCully M. E. Roots in soil: unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999. 50. P. 695-718.
208. Mendes R., Krujuit M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider J. H. M., Raaijmakers J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*. 2011. 332 (6033). P. 1087-1100. doi: 10.1126/science.1203980.
209. Mergaert J., Boley A., Cnockaert M. C., Muller W. R., Swings J. Identity and potential functions of heterotrophic bacterial isolates from a continuous-upflow fixed-bed reactor for denitrification of drinking water with bacterial polyester as source of carbon and electron donor. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001. 24. P. 303-310.
210. Mirskaya G. V., Khomyakov Y. V., Rushina N. A., Vertebny V. E., Chizhevskaya E. P., Chebotar V. K., Chesnokov Y. V., Pishchik V. N. Plant development of early-maturing spring wheat (*Triticum aestivum* L.) under inoculation with *Bacillus* sp. V2026. *Plants (Basel)*. 2022. 11 (14). P. 18-35.

211. Moebius N., Üzümlü Z., Dijksterhuis J., Lackner G., Hertweck C. Active invasion of bacteria into living fungal cells. *eLife*. 2013. 3. P. e03007. <https://doi.org/10.7554/eLife.03007>
212. Mousa W. K., Shearer C., Limay-Rios V., Ettinger C. L., Eisen J. A., Raizada M. N. Root-hair endophyte stacking in finger millet creates a physicochemical barrier to trap the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *Nature Microbiology*. 2016. 1. P. 16-26. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.167>
213. Msimbira L. A., Smith D. L. The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2020. 4. P. 106-115.
214. Müller H., Berg C., Landa B. B., Auerbach A., Moissl-Eichinger C., & Berg G. Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Frontiers in microbiology*. 2015. 6. P. 73-84. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01384>
215. Myrold D. D. Soil microbiology and biochemistry. BioScience, Oxford University Press. 1989. 805-820 pp.
216. Newton A. C., Flavell A. J., George T. S., Leat P., Mullholland B., Ramsay L., Revoredo-Giha C., Russell J., Steffenson B. J., Swanston J. S. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. *Food Security*. 2011. 3. P. 141-178.
217. Nie P., Li X., Wang S., Guo J., Zhao H., Niu D. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2017. 8. P. 238-251.
218. Niu. B., Paulson J. N., Zheng X., Kolter R. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. 114 (12). P. E2450-E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
219. Nour S. M., Cleyet-Marel J. C., Beck D., Effosse A., Fernandez M. P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*. 1994. 40. P. 345-354.

220. Nwachukwu B. C., Ayangbenro A. S., Babalola O. O. Structural diversity of bacterial communities in two divergent sunflower rhizosphere soils. *Annals of Microbiology*. 2023. 73 (9).
221. Oberzill W. Mikrobiologische analytik. Hans Carl, Nürnberg. 1967. 122-128 pp.
222. Ofek-Lalzar M., Sela N., Goldman-Voronov M., Green S. J., Hadar Y., Minz D. Niche and host-associated functional signatures of the root surface microbiome. *Nature Communications*. 2014. 5. P. 49-58. <https://doi.org/10.1038/ncomms5950>
223. Oger P. M., Mansouri H., Nesme X., Dessaux Y. Engineering root exudation of oward the production of two novel carbon compounds leads to the selection of distinct microbial populations in the rhizosphere. *Microbial Ecology*. 2004. 47. P. 96-103.
224. Orlova O. V., Andronov E. E., Vorobyov N. I., Kolodyazhnii A. Y., Moskalevskaya Y. P., Patyka N. V., Sviridova O. V. Composition and functioning of microbial communities in the decomposition of straw cereals in sod podzolic soil. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2015. 77 (3). P. 38-47.
225. Pagare K. A., Jadhav D. B., Khot G. G., Mohite P. B. Studies on native isolate of *Bacillus thuringiensis* against diamond backmoth (*Plutella xylostella*) on cabbage. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceuticals and Chemical Sciences*. 2015. 1 (1). P. 74-83.
226. Pal K. K., Tilak K. V., Saxena A. K., Dey R., Singh C. S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*. 2001. 156 (3). P. 209- 223.
227. Papke R. T., Ward D. M. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004. 48 (3). P. 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.013>
228. Park Y., Solhtalab M., Thongsomboon W., Aristilde L. Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation. *Environmental Microbiology Reports*. 2022. 14 (1). P. 3-24. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13040>

229. Patyka N. V., Kruglov I. V., Berdnikov A. M., Patyka V. F. Role of *Linum usitatissimum* L. in formation of microbic communities of podzol soils. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2008. 70 (1). P. 59-70.
230. Patyka N. V., Kolodyazhnyi O. Y., Ibatullin I. I. The evaluation of metagenome and detection of functionally significant polymorphisms of prokaryotes of soil by method of pyrosequencing. *Mikrobiologichnyi zhurnal*. 2016. 78 (2). P. 43-51. doi: 10.15407/microbiolj78.02.043
231. Patyka N. V., Kolodyazhnyi O. Y., Bublyk N. A., Patyka T. I. Evaluation of Metagenomes and Detection of Functionally Significant Polymorphisms of Soil Prokaryotes Using the Pyrosequencing Method. *Journal of Nature science and sustainable technology*, 11: 1.
232. Patyka, N. V., Tonkha, O. L., Patyka, T. I., Kiroiants, M. O., Veretyuk, S. V., (2018): Estimation of prokaryotic complex methagenom of chernozem under agricultural use. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2017. 80 (6). P. 109-122. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.06.109>
233. Patyka N. V., Tonkha O. L., Sinchenko V. N., Honchar A. N., Patyka T. I. Features of the formation of the structural and functional composition of the microbiome of chernozem virgin in the steppe of Ukraine. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2019. 81 (4). P. 90-106.
234. Peay K. G., Garbelotto M., Bruns T. D. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: Isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecolog.* 2010. 91 (12). P. 3631-3640. <https://doi.org/10.1890/09-2237.1>
235. Peay K. G., Kennedy P. G., Talbot J. M. Dimensions of biodiversity in the earth mycobiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2016. 14. P. 31-47.
236. Peiffer J. A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S. G., Dangl J. L., Buckler E. S., Ley R. E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. 110 (16). P. 6548-6553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>
237. Pikovskaya R. I. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*. 1948. 17. P. 362-370.

238. Porcar M., Grenier A. M., Federici B., Rahbe Y. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Applied Environmental Microbiology*. 2009. 75. P. 4897-4900.
239. Priest F.G. Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus subtilis* and other grampositive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. ASM Press, Washington DC. 1993. 309-325 pp.
240. Pushpakumara B. L. D. U., Tandon K., Willis A., Verbruggen H. The bacterial microbiome of the coral skeleton algal symbiont *ostreobium* shows preferential associations and signatures of phylosymbiosis. *Microbial Ecology*. 2023. 85. P. 12-28. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02209-7>
241. Quintero M. C. T., Sosa I. A., Velázquez V. M. H., Rodríguez R. S., Chora G. P. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (*Bacillaceae*) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomologist*. 2016. 99 (4). P. 639-643.
242. Rabbee M. F., Ali M. S., Choi J., Hwang B. S., Jeong S. C., Baek K. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*. 2019. P. 24 (6). P. 10-46. doi: 10.3390/molecules24061046
243. Ramamoorthy V., Raguchander T., Samiyappan R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Soil*. 2002. 239. P. 55-68.
244. Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*. 2001. 20. P. 8-31.
245. Rajashekhar M., Shahanaz E., Vinay K. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus* spp. isolated from insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2018. 5 (5). P. 581-598.
246. Rastogi G., Sbodio A., Tech J. J., Suslow T. V., Coaker G. L., Leveau J. H. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*. 2012. 6 (10). P. 1802-1822. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.32>

247. Reinhold-Hurek B., B nger W., Burbano C. S., Sabale M., Hurek T. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual Review of Phytopathology*. 2015. 53. P. 403-424. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342>
248. Rezki S., Champion C., Iacomi-Vasilescu B., Preveaux A., Toualbia Y., Bonneau S., Briand M., Laurent E., Hunault G., Simoneau P., Jacques M. A., Barret M. Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *Frontiers in Plant Science*. 2016. 7. P. 565. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00565>
249. Rigin B. V., Zuev E. V., Tyunin V. A., Shrejder E. R., Pyzhenkova Z. S., Matvienko I. I. Breeding and genetic aspects of creating productive forms of fast-developing spring bread wheat. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2018. 179. P. 194-202.
250. Ritpitakphong U., Falquet L., Vimoltust A., Berger A., M traux J. P., L'Haridon F. The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen. *New Phytologist*. 2016. 210 (3). P. 1033-1043. doi: 10.1111/nph.13808
251. Robertson-Albertyn S., Terrazas R. A., Balbirnie K., Blank M., Janiak A., Szarejko I., Chmielewska B., Karcz A., Morris J., Hedley P. E., George T. S., Bulgarelli D. Root hair mutations displace the barley rhizosphere microbiota. *Frontiers in Plant Science*. 2017. 8. P. 1058-1094.
252. Rojas A., Holguin G., Glick B. R., Bashan Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂ -fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecology*. 2001. 35. P. 181-187.
253. Rohrbacher, F., St-Arnaud, M. Root exudation: the ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. *Agronomy*. 2016. 6 (1). P. 19-34. <https://doi.org/10.3390/agronomy6010019>
254. Rolli E., Marasco R., Vigani G., Ettoumi B., Mapelli F., Deangelis M. L., Daffonchio D. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental microbiology*. 2015. 17 (2). P. 316-331. doi:10.1111/1462-2920.12439.

255. Rousk J., Brookes P. C., Bååth E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. 75 (6). P. 1589-1596. <https://doi.org/10.1128/AEM.02775-08>
256. Ruggiero M. A., Gordon D. P., Orrell T. M., Bailly N., Bourgoin T., Brusca R. C., Kirk P. M. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*. 2015. 10 (4). P. e0119248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
257. Sağlam M., Selvi K. C. Effects of different tillage managements on soil physical quality in a clayey soil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015. 187 (1). P. 1-12.
258. Salvador L., Petr B. Community-level physiological profiling analyses show potential to identify the copiotrophic bacteria present in soil environments. *PLoS ONE*. 2017. 12 (2). P. e0171638.
259. Sameh H. Y., Fayrouz H. A. E., Ethan A. H., Maskit M., Akram H. M., Saleh A. S., Ann M. H. Comparative analysis of the cultured and total bacterial community in the wheat rhizosphere microbiome using culture-dependent and culture-independent approaches. *Microbiology Spectrum*. 2021. 9 (2). P. e0067821.
260. Sánchez M., Ramírez-Bahena M. H., Peix A., Lorite M. J., Sanjuán J., Velázquez E., Monza J. *Phyllobacterium loti* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. 64 (3). P. 761-786. doi: 10.1099/ij.s.0.052993-0.
261. Sands D. C. Physiological criteria – determinative tests. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 1990. 133-143 pp.
262. Schink, B. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. 81. P. 257-261.
263. Schlaeppli K., Dombrowski N., Garrido Oter R., van Themaat E. V. L., Schulze-Lefert P. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. 111 (2). P. 575-592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321597111>

264. Sen R., Tripathy S., Padhi S. K., Mohanty S., Maiti N. K. Assessment of genetic diversity of *Bacillus spp.* isolated from eutrophic fish culture pond. 3 *Biotech.* 2015. 5 (4). P. 393-400.
265. Shakya M., Gottel N., Castro H., Yang Z. K., Gunter L., Labbé J., Muchero W., Bonito G., Vilgalys R., Tuskan G., Podar M., Schadt C. W. A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS One*. 2013. 8 (10). P. e76382. doi: 10.1371/journal.pone.0076382.
266. Shanmugaiah V., Mathivanan N., Balasubramanian N., Manoharan P. T. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous MML2270* isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*. 2008. 7. P. 2562–2568.
267. Shelud'ko A. V., Filip'echeva Y. A., Telesheva E. M., Burov A. M., Evstigneeva S. S., Burygin G. L., Petrova L. P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense Sp245* biofilms. *Microbiology*. 2018. 87. P. 610-628.
268. Shi S., Nuccio E., Herman D. J., Rijkers R., Estera K., Li J., da Rocha U. N., He Z., Pett-Ridge J., Brodie E. L., Zhou J., Firestone M. Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. *MBio*. 2015. 6 (4). P. e00746-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00746-15>
269. Singh D., Sharma A., Saini G. Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. *Biotechnology Journal*. 2013. 3. P. 205-212.
270. Sneath P. H. A. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman & Co, San Francisco. 1973. 221-296 pp.
271. Sokal R. R., Michener C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 1958. 38. P. 1409-1438.
272. Song K., Li Y., Liu E., Cheng X., Meng F., Yang X. Effects of tillage and straw return on water-stable aggregates, carbon stabilization and crop yield in an

- estuarine alluvial soil. *Scientific Reports*. 2019. 9. P. 45-86.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41034-w>
273. Starr M. P. The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 1981. 176-193 pp.
 274. Sturz A. V., Christie B. R., Matheson B. G., Nowak J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*. 1997. 25. P. 11-29.
 275. Sun D. S., Li K. J., Bi Q. F., Zhu J., Zhang Q. C., Jin C. W., Lu L. L., Lin X. Y. Effects of organic amendment on soil aggregation and microbial community composition during drying-rewetting alternation. *Science of the Total Environment*. 2017. 574. P. 735-743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.112>
 276. Suslow T. V., Schroth M. N., Isaka M. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*. 1982. 72. P. 907-918.
 277. Taketani R. G., Lançon M. D., Kavamura V. N., Durrer A., Andreote F. D., Melo I. S. Dry season constrains bacterial phylogenetic diversity in a semi-arid rhizosphere system. *Microbial Ecology*. 2017. 73. P. 153-161.
 278. Talbot J. M., Bruns T. D., Taylor J. W., Smith D. P., Branco S., Glassman S. I., Erlandson S., Vilgalys R., Liao H. L., Smith M. E., Peay K. G. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. 111 (17). P. 6341-6346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402584111>
 279. Tao J. M., Liu X. D., Liang Y. L., Niu J. J., Xiao Y. H., Gu Y. B., Ma L. Y., Meng D. L., Zhang Y. G., Huang W. K. Maize growth responses to soil microbes and soil properties after fertilization with different green manures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017. 101. P. 1289-1299.
 280. Tao L., Mingjing K., Peijnenburg W. J. G. M., Youchao Z., Meng Z., Liwei S., Zhengwei F., Haifeng Q. Investigation of rhizospheric microbial communities in wheat, barley, and two rice varieties at the seedling stage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2018. 66 (11). P. 2645-2653.

281. Tan S., Dong Y., Liao H., Huang J., Song S., Xu Y., Shen Q. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Management Science*. 2013. 69. P. 1245-1252.
282. Taredahalli N. Isolation, characterization and evaluation of *Bacillus spp.* infective to white grubs (*Coleoptera*: scarabaeidae). Ph.D thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Bangalore. 2013.
283. Terrazas R. O., Balbirnie-Cumming K., Morris J., Hedley P. E., Russell J., Paterson E., Baggs E. M., Fridman E., Bulgarelli D. Adaptation on the composition of the barley rhizosphere bacterial microbiota. *Scientific Reports*. 2020. 10. P. 12-26.
284. Thalhun L., Kipgen B. L. Biochemical differentiation of *Pseudomonas fluorescens* of Assam soil and their utility in management of bacterial wilt of solanaceous crops. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017. 6 (6). P. 2796-2806.
285. Thies J. E. Molecular methods for studying microbial ecology in the soil and rhizosphere. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 2008. 411-436 pp. doi: 10.1007/978-3-540-75575-3_17
286. Thomson B. C., Tisserant E., Plassart P., Uroz S., Griffiths R. I., Hannula S. E., Buée M., Mougel C., Ranjard L., Van Veen J. A., Martin F., Bailey M. J., Lemanceau P. Soil conditions and land use intensification effects on soil microbial communities across a range of European field sites. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015. 88. P. 463-479. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.012>
287. Timmusk S., Paalme V., Pavlicek T., Bergquist J., Vangala A., Danilas T., Nevo E. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. *PLoS One*. 2011. 6 (3). P. e17968.
288. Tkacz A., Cheema J., Chandra G., Grant A., Poole P. S. Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME Journal*. 2015. 9 (11). P. 2349-2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>
289. Toju H., Yamamoto S., Sato H., Tanabe A. S. Sharing of diverse mycorrhizal and root-endophytic fungi among plant species in an oak-dominated cool-temperate

- forest. *PloS one*. 2013. 8 (10). P. e78248.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078248>
290. Toju H., Guimarães P. R., Olesen J. M., Thompson J. N. Assembly of complex plant-fungus networks. *Nature communications*. 5. P. 52-73.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6273>
 291. Toljander J. F., Lindahl B. D., Paul L. R., Elfstrand M., Finlay R. D. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007. 61 (2). P. 295-304.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x>
 292. Trevaskis B., Hemming M. N., Dennis E. S., Peacock W. J. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science*. 2007. 12. P. 352-357.
 293. Tripathi M., Kumar A., Kalia V., Saxena A. K., Gujar G. Isolation and characterization of lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis* strains predominantly from north-eastern states of India. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016. 54. P. 431-452.
 294. Truyens S., Weyens N., Cuypers A., Vangronsveld J. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*. 2015. 7 (1). P. 40-50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>
 295. Turner T. R., James E. K., Poole P. S. The plant microbiome. *Genome Biology*. 2013. 14 (6). P. 190-209.
 296. Tyc O., van den Berg M., Gerards S., van Veen J. A., Raaijmakers J. M., de Boer W., Garbeva P. Impact of interspecific interactions on antimicrobial activity among soil bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014. 5. P. 549-567.
[10.3389/fmicb.2014.00567](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00567).
 297. Uroz S., Oger P., Morin E., Frey-Klett P. Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. 78 (3). P. 976-988.
<https://doi.org/10.1128/AEM.06742-11>

298. Vacher C., Cordier T., Vallance J. Phyllosphere fungal communities differentiate more thoroughly than bacterial communities along an elevation gradient. *Microbial Ecology*. 2016. 72. P. 11-30.
299. Valverde A., Velazquez E., Fernandez-Santos F., Vizcaino N., Rivas R., Mateos P. F., Martinez-Molina E., Igual J. M., Willems A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005. 55. P. 1985-1999.
300. Van Acker H., Van Dijck P., Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*. 2014. 22 (6). P. 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.001>
301. Van der Heijden M. G. A., de Bruin S., Luckerhoff L., van Logtestijn R. S. P., Schlaeppli K. A widespread plant–fungal–bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *The ISME journal*. 2016. 10 (2). P. 389-402. doi:10.1038/ismej.2015.120.
302. Vandenkoornhuyse P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*. 2015. 206 (4). P. 1196-1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
303. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 1996. 60. P. 407-438.
304. Vidal C., González F., Santander C., Pérez R., Gallardo V., Santos C., Aponte H., Ruiz A., Cornejo P. Management of rhizosphere microbiota and plant production under drought stress. *Plants (Basel)*. 2022. 11 (18). P. 24-37.
305. Vik U., Logares R., Blaailid R., Halvorsen R., Carlsen T., Bakke I., Kolstø A. B., Økstad O. A., Kauserud H. Different bacterial communities in ectomycorrhizae and surrounding soil. *Scientific Reports*. 2013. 3. P. 34-51. <https://doi.org/10.1038/srep03471>
306. Vilmos P., Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letter*. 1998. 62. P. 59-76.

307. von Bülow J. F. W., Döbereiner J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1975. 72 (6). P. 89-113.
308. Vorholt J. A. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 2012. 10. P. 828-840.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Відокремленого підрозділу
Національного університету біоресурсів і
природокористування України
«Великоснітинське НДГ ім. О.Музиченка»
Микола ЖУРАВЕЛЬ
« » 2024 р.

М.П.

АКТ

про впровадження результатів дисертаційних досліджень у виробництво

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на
тему: «Визначення функціонально-значущих рослинно мікробних взаємодій
ризосфери ячменю ярого в чорноземі типовому»,
(назва теми)

що представлена на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 201
«Аграрномія», спеціальності 201 «Агрономія»,
виконаної Кіроянц Мідією Олегівною

(П.І.Б. здобувача)

впроваджені у Відокремленому підрозділі Національного університету
біоресурсів і природокористування України «Великоснітинське НДГ імені О.В.
Музиченка» Фастівського району Київської
області

(назва підприємства, де здійснювалось впровадження)

Вид впроваджуваних результатів: Виробнича перевірка ефективності
бактеризації насіння ячменю ярого сорту Акордіна селекції SAATEN Union
(Німеччина) новими домінантними штамми ризосферних
бактерій *Phyllobacterium ifrigiense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 при вирощуванні
культури в зоні Лісостепу
України.

Обсяг впровадження 113 га, сорт ячменю ярого Акордіна селекції
SAATEN Union (Німеччина); чорнозем опідзолений, легкосуглинковий. Рівень
гідролітичної кислотності 5,7 мг/100г ґрунту, забезпеченість основними
елементами живлення: 70 мг/кг азоту, що легко гідролізується в ґрунті (низький
показник, середній 89,6 мг/кг), підвищений вміст калію на рівні 120-150 мг/кг
ґрунту, низький вміст рухомого фосфору на рівні 100-120 мг/кг, задовільне
волого забезпечення.

Новизна отриманих результатів: Вперше проведено комплексну оцінку
ефективності застосування заходів інокуляції насіння новими
штамами *Phyllobacterium ifrigiense* 1 та *Bacillus velezensis* 10 при вирощуванні
ячменю ярого, дослідження впливу інокулянтів на
продуктивність рослин.

Практичне впровадження / використання результатів: Показано, що застосування нових штамів *Phyllobacterium ifriqiense* 1 та *Baccillus velezensis* 10 як інокуляційних культур при вирощуванні ячменю ярого ефективно впливають на функціональний стан рослин з ефектом рістстимулювання та контролю фітопатогенних форм мікроорганізмів, а саме: бактерізація насіння ячменю ярого сорту Акордіна у вигляді зрілої бактеріальної спорової суспензії забезпечила збільшення довжини коренів рослин на 84,3 %, а пагонів на 33,7 % порівняно з контрольним варіантом без бактеризації. Антагоністична активність досліджуваних бактерій пригнічувала ріст та розвиток фітопатогенних мікроміцетів на 65,2 % при інокуляції *Baccillus velezensis* 10; та при інокуляції *Phyllobacterium ifriqiense* 1 86,7 %. Сорт Акордіна сформував у 2023 році найвищий урожай (41,8 ц/га) серед досліджених сортів, що вирощувались у ВП НУБіП України «Великоснітинське НДГ ім. О.В.Музиченка» у період 2020-2023 рр.

Таблиця

Варіант	Урожайність, ц/га	Приріст урожаю	
		ц/га	%
Акордіна			
Контроль – без добрив	30,8	–	–
N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	41,8	11,0	19,6
Солома (3,0 т/га) + N ₄₅ P ₄₂ K ₅₅	15,0		
Солома (3,0 т/га) + N ₆₀ P ₅₀ K ₆₅	24,9	9,9	19,0

Підписи відповідальних за проведення впровадження:

Агроном ВП НУБіП України

«Великоснітинське НДГ ім. О. Музиченка» _____ /Сергій ЗАПОЛЬСЬКИЙ/
(підпис)

Здобувач

_____ /Мідія КІРОЯНЦ/
(підпис)

Акт складено « ____ » _____ 2024 р.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у періодичних наукових виданнях,
включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України
та/або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних
Scopus та/або Web of Science Core Collection**

1. Патика М. В., Тонха О. Л., Патика Т. І., **Кіроянц М. О.**, Веретюк С. В. Оцінка метагеному прокаріотного комплексу чорнозему за аграрного використання. Мікробіологічний журнал. 2018. № 80 (6). С. 109–122. *(Патикою М. В. проведено аналіз метагеному прокаріотного комплексу, виділення та очищення ґрунтової ДНК, секвенування та ампліфікація зразків. Тонхою О. Л. побудовано дендрограми та філогенетичні дерева, проведено відповідні статистичні розрахунки. Патикою Т. І. сформульовано наукову новизну, практичне значення та мету проведених досліджень. Кіроянц М. О. узгоджено з рештою співавторів висновки, підготовлено публікацію до друку відповідно до вимог видання, здійснено корегування статті за рекомендаціями видавництва. Веретюком С. В. підготовлено список використаних джерел та проаналізовано сучасні видання).*

2. **Kiroiants M.**, Patyka M. The use of methods for identification and studying the functional features of the dominant rhizosphere microorganisms of the barley. The Annals of Oradea University, Biology Fascicle. 2023. Vol. 30 (1). P. 7–15. *(Kiroiants M. проведено аналіз на джерела вуглецевого живлення за допомогою сучасної системи HI CARbo KIT, проаналізовано та описано результати дослідження. Patyka M. здійснено ідентифікацію домінантних штамів за допомогою визначника Берджі, проведено контроль основних етапів дослідження).*

**Статті у наукових виданнях,
включених до Переліку наукових фахових видань України**

3. Кіроянц М. О. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого за різних систем землеробства. Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. 2019. Вип. 30. С. 39–48.

4. **Кіроянц М. О.**, Патика Т. І., Патика М. В. Філогенетичний аналіз домінантних мікроорганізмів родів *Bacillus* і *Phyllobacterium*, ізольованих з ризосфери ячменю ярого. Вісник аграрної науки. 2020. № 5 (806). С. 48–53. *(Кіроянц М. О. проведено філогенетичний аналіз домінантних морфотипів. Патиною Т. І. опрацьовано наукові літературні джерела. Патиною М. В. проведено узагальнення отриманих експериментальних даних).*

5. **Кіроянц М. О.**, Патика Т. І., Патика М. В. Антагоністична активність бактерій, що домінують, ізольованих із ризосфери ячменю ярого щодо фітопатогенних мікроміцетів. Рослинництво та ґрунтознавство. 2021. Т. 12. № 2. С. 54–59. *(Кіроянц М. О. підготовлено поживні середовища та чисті культури домінантних штамів, проведено інокуляцію антагоністичних штамів блочним методом. Патиною М. В. проведено облік на 3 і 10 добу антагоністичної активності домінантних морфотипів, здійснено оцінку результатів. Патиною Т. І. проаналізовано та систематизовано результати досліджень).*

6. **Кіроянц М. О.**, Патика М. В., Патика Т. І. Оцінка біологічної ефективності перспективних домінантних штамів бактерій ризосфери ячменю ярого. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2021. № 1 (89). URL:<https://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/14722> *(Кіроянц М. О. проведено підготовку препаратів жива крапля, мікроскопію зразків домінантних штамів у камері Горяєва. Патиною М. В. розроблено протокол дослідження, узагальнено результати, написано висновки. Патиною Т. І. проведено інокуляцію рослин домінантними штамами, вирощування та догляд за лабораторними зразками інокульованих рослин, облік параметрів росту інокульованих рослин).*

Тези наукових доповідей

7. Кироянц М. О. Оценка функционально-значимых растительно-микробных взаимодействий ризосферы пшеницы яровой в агрофитоценозах чернозема типичного. Микробное биоразнообразие: актуальные проблемы и решения: Международная научно-практическая конференция, посвященная 25-летию Независимости Республики Казахстан. Астана, 2016. С. 199–201.

8. Патика М. В., **Кіроянц М. О.** Оцінка функціонально-значущих рослинно-мікробних взаємодій ризосфери ячменю ярого. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: V Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, 21 квітня 2017 року: тези доповіді. Центральне, 2017. С. 100. *(Патикою М. В. визначено мету та актуальність дослідження. Кіроянц М. О. підготовлено матеріал до друку).*

9. **Кіроянц М. О.**, Колодяжний О. Ю., Пшеничний С. Ю. Формування мікробного комплексу чорнозему типового в агрофітоценозі ячменю ярого. Цілі сталого розвитку третього тисячоліття: виклики для університетів наук про життя: Міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 23–25 травня 2018 року: тези доповіді. Київ, 2018. С. 35. *(Кіроянц М. О. проведено аналіз мікробного комплексу чорнозему типового. Колодяжним О. Ю. проведено відбір зразків ґрунту. Пшеничним С. Ю. проведено аналіз статистичних даних).*