

14.12.23.

15 гр.

Мікробіологічний та хіміко-бактеріологічний аналіз.

ТЕМА . БАКТЕРІАЛЬНІ ДОБРИВА.

План

1. *Значення бактеріальних добрив.*
2. *Препарати
бульбочкових
бактерій. а) нітрагін
б) ризоторфін*
3. *Бактеріальне добриво азотобактерин.*
4. *Бактеріальне добриво фосфобактерин.*

Ключові терміни та поняття: мікрофлора ґрунту, *Rhizobium*, нітрогеназна активність, вірулентність, видова і сортова специфічність, сухий нітрагін, ґрунтовий і торф'яний азотобактерин, фосфобактерин, *Bacillus megaterium var. phosphaticum*.

1. Значення бактеріальних добрив.

Мікрофлора ґрунту безпосередньо впливає на її родючість і, як наслідок, на врожайність рослин. Ґрунтові мікроорганізми в процесі росту й розвитку поліпшують структуру ґрунту, накопичують у ній живильні речовини, мінералізують різні органічні сполуки, перетворюючи їх у легко засвоювані рослиною компоненти харчування. Для стимуляції цих процесів застосовують різні бактеріальні добрива, що збагачують ризосферу рослин корисними мікроорганізмами. Мікроорганізми, що використовуються для виробництва бактеріальних препаратів, сприяють постачанню рослин не тільки елементами мінерального харчування, але й фізіологічно активними речовинами (фітогормонами, вітамінами й ін.).

У цей час випускають такі бактеріальні добрива, як нітрагін, ризоторфін, азотобактерин, фосфобактерин, екстрасол.

2. Препарати бульбочкових бактерій.

Вітчизняна промисловість випускає два види препаратів бульбочкових бактерій: **нітрагін** і **ризоторфін**. Обидва препаративиробляються на основі активних життєздатних бульбочкових бактерій з роду *Rhizobium*. Ці бактерії в симбіозі з бобовими культурами здатні фіксувати вільний азот атмосфери, перетворюючи його в з'єднання, що легко засвоюються рослиною.

Бактерії роду *Rhizobium* - строгі аероби. Серед них розрізняють активні, малоактивні й неактивні культури. Критерієм активності бульбочкових бактерій служить їхня здатність у симбіозі з бобовою рослиною фіксувати атмосферний азот і використовувати його у вигляді з'єднань для кореневого харчування рослин.

Фіксація атмосферного азоту можлива тільки в бульбочках рослин, що утворюються на коріннях. Виникають вони при інфікуванні кореневої системи бактеріями з роду *Rhizobium*. Зараження кореневої системи відбувається через молоді кореневі волоски. Після впровадження бактерії проростають усередині них

до самої підстави у вигляді інфекційної нитки. Вирослі нитки проникають крізь стінки епідермісу в кору кореня, розгалужуються й розподіляються по клітками кори. При цьому індукується розподіл кліток хазяїна й розростання тканин. У місці локалізації бактерій на корені рослини хазяїна утворюються бульбочки, у яких бактерії швидко розмножуються й розташовуються окремо або групами в цитоплазмі рослинних кліток. Самі бактеріальні клітки збільшуються в кілька раз і міняють забарвлення. Якщо бульбочки мають червонувате або рожеве забарвлення, обумовлене наявністю пігменту леоглобін (леггемоглобін) - аналог гемоглобіну крові тварин, то вони здатні фіксувати молекулярний азот. Незабарвлені ("порожні") або, що мають зеленувате фарбування бульбочки не фіксують азот.

Бактерії, що перебувають у бульбочках, синтезують ферментну систему з **нітрогеназною активністю**, що відновлює молекулярний азот до аміаку. Асиміляція аміаку відбувається, в основному, шляхом залучення його в ряд ферментативних перетворень, що приводять до утвору глутаміна й глутамінової кислоти, що використовуються надалі на біосинтез білка.

Крім критерію **активності** в характеристиці бульбочкових бактерій використовують критерій **вірулентності**. Він характеризує здатність мікроорганізму вступати в симбіоз із бобовою рослиною, тобто проникати через кореневі волоски усередину кореня й викликати утворення бульбочок. Велике значення має швидкість такого проникнення. У симбіотичному комплексі рослина - *Rhizobium* бактерії забезпечуються живильними речовинами, а самі забезпечують рослини азотним живленням. З вірулентністю зв'язана й **видова вибірковість**, яка характеризує здатність даного виду бактерій до симбіозу з певним видом бобової рослини. Класифікація різних видів *Rhizobium* ураховує рослину хазяїна, наприклад: *Rhizobium phaseoli* - для квасолі, *Rhizobium*

lurini - для люпину. Вірулентність і видоспецифічність взаємозалежні й не є постійними властивостями штаму.

Завданням виробництва бактеріальних добрива є максимальне нагромадження життєздатних клітин, збереження їх життєздатності на всіх стадіях технологічного процесу, готування на їхній основі готових форм препарату зі збереженням активності протягом гарантійного строку зберігання.

Вітчизняна промисловість випускає два види нітрагіну: ґрунтовий і сухий. Уперше культура бульбочкових бактерій на ґрунтовому субстраті була виготовлена в 1911 році на бактеріальній агрономічній станції в Москві. У цей час його виробництво має обмежене значення, тому що технологія досить складна й трудомістка при виконанні окремих операцій. Більш перспективна технологія виробництва сухого нітрагіну.

Сухий нітрагін - порошок ясно-сірого кольору, що містить в 1 г не менш 9 млрд. життєздатних бактерій у суміші з наповнювачем. Вологість не перевищує 5- 7%. Промислове виробництво має типову схему. Необхідно відзначити, що важливо підбирати штами, стійкі до висушування. Для виробництва посівного матеріалу вихідну культуру бульбочкових бактерій вирощують на агаризованому середовищі, що містить відвар бобового насіння, 2% агару й 1% сахарози, потім культуру розмножують у колбах на рідкому живильному середовищі протягом 1-2 доби при 28-30°C і рН 6.5-7.5. На всіх етапах промислового культивування застосовують

живильне середовище, що включає такі компоненти, як меляса, кукурудзяний екстракт, мінеральні солі у вигляді сульфатів амонію й магнію, крейда, хлорид натрію й двозаміщений фосфат калію. Основна ферментація йде за тих самих умов протягом 2-3 доби. Готову культуральну рідину сепарують, виходить біомаса у вигляді пасти з вологістю 70-80%. Пасту змішують із захисним середовищем, що містить тіосечовину й мелясу (1:20) і направляють на висушування. Сушать шляхом сублімації (у вакуум-сушильних шафах). Висушену біомасу розмелюють. Продуктивніше висушування розпилювання, але при цьому 75% клітин втрачають життєздатність. Препарати сухого нітрагіну фасують і герметизують у поліетиленові пакети по 0.2 - 1 кг, зберігають при температурі 15 °С не більш 6 місяців. Насіння обробляють перед посівом. Внесення нітрагіну підвищує врожайність у середньому на 15-25%.

Ризоторфін. Препарат бульбочкових бактерій може випускатися й у вигляді **ризоторфїну**. Уперше торф'яний препарат бульбочкових бактерій був приготовлений в 30-их роках, але технологія була створена в 1973-77 рр. Для готування ризоторфїну торф сушать при температурі не вище 100°C і розмелюють у порошок. Найбільш ефективним способом стерилізації є опромінення його гамма- променями. Перед стерилізацією розмелений, нейтралізований крейдою й зволожений до 30-40% торф розфасовують у поліетиленові пакети. Потім його опромінюють і заражають бульбочковими бактеріями, використовуючи шприц, за допомогою якого впорскується живильне середовище збульбочковими бактеріями. Прокол

після внесення бактерій заклеюється липкою стрічкою. Кожний грам ризоторфіну повинен містити не менш 2.5 млрд. життєздатних клітин з високою конкурентоспроможністю й інтенсивною азотфіксацією. Препарат зберігають при температурі 5-6°C і вологості повітря 40-55%. Пакети можуть бути вагою від 0.2 до

1.0 кг. Доза препарату становить 200 г на га. Зараження насіння роблять наступним чином: ризоторфін розбавляють водою й проціджують через подвійний шар марлі. Отриманою суспензією обробляють насіння. Насіння висівають у день обробки або на наступний.

Обробка насіння бобових культур міцно ввійшло у світову сільськогосподарську практику. Найбільшими виробниками таких препаратів є США й Австралія.

3. Бактеріальне добриво азотобактерин.

Азотобактерин - бактеріальне добриво, що містить вільноживучий ґрунтовий мікроорганізм *Azotobacter chroococcum*, здатний фіксувати до 20 мг атмосферного азоту на 1 г використаного цукру. Внесені в якості добрива в ґрунт бактерії також виділяють біологічно активні речовини (нікотинову й пантотенову кислоти, піридоксин, біотин, гетероауксин, гіберелін і ін.). Ці речовини стимулюють ріст рослин. Крім того, фунгіцидні речовини із групи анисомицина, що продукує *Azotobacter*, пригнічують розвиток деяких небажаних мікроскопічних грибів у ризосфері рослини.

Усі види *Azotobacter* строгі аероби. Чутливі до вмісту в середовищі фосфору й розвиваються лише при високому його

змісті в живильному середовищі. Азотфіксуюча здатність культури пригнічується аміаком (взагалі зміст у середовищі зв'язаного азоту пригнічує азотфіксацію). Стимулюють процес фіксації азоту з'єднанням молібдену.

Встановлено, що при фіксації азоту процес його відновлення протікає на тому самому синтезованому азотобактером ферментному комплексі й лише кінцевий продукт (аміак) відділяється від ферменту. Нітрогеназна азотфіксуюча система являє собою мультиферментний комплекс, що містить не пов'язане з геном залізо та молібден.

Мікробіологічна промисловість випускає кілька видів азотобактерину: **сухий, ґрунтовий і торф'яний.**

Технологія одержання **сухого азотобактерину** має багато загального з технологією виробництва сухого нітрагіну. Сухий азотобактерин - активна культура висушених кліток азотобактера з наповнювачем. В 1 г препарату міститься не менш

0.5 млрд. життєздатних кліток. Культуру мікроорганізму вирощують методом глибинного культивування на середовищі компонента, що містить ті ж, що й при культивуванні клітин *Rhizobium*. Додатково вводять тільки сульфати заліза й марганцю, а також складну сіль молібденової кислоти, рН 5.7-6.5.

Процес ферментації проводять до стаціонарної фази розвитку культури, тому що в цій фазі біологічно активні речовини виділяються із клітки й залишаються в культуральній рідині. Біологічно активні речовини можуть також повністю або частково втрачатися при висушуванні, однак життєздатні клітини швидко відновлюють здатність їх продукувати. Висушену культуру стандартизують, фасують у поліетиленові пакети по 0.4-2 кг і зберігають при температурі 15°C не більш 3 місяців.

Грунтовий і торф'яний азотобактерин являють собою активну культуру азотобактера, розмножену на твердому живильному середовищі й містять в 1 г не менш 50 млн. життєздатних клітин. Для їхнього виготовлення беруть родючий ґрунт або торф із нейтральною реакцією середовища. До просіяного субстрату додають 2% вапна й 0.1% суперфосфату. По 500 г отриманій суміші переносять у сулії ємністю по 0.5 л, зволожують до 40-60% за об'ємом водою, закривають ватяними пробками й стерилізують. Посівний матеріал готують на агарових середовищах, що містять 2% сахарози й мінеральні солі. Коли агар повністю покривається слизуватою масою коричневого кольору, отриманий матеріал стерильно змивається дистильованою водою й переноситься на приготовлений субстрат. Вміст пляшок ретельно перемішують і терmostатують при 25-27°C. Культивування продовжують доти, поки бактерії не розмножаться до необхідної кількості. Отриманий препарат зберігає свою активність протягом 2-3 місяців.

Використовувати азотобактерин рекомендується тільки на ґрунтах, що містять фосфор і мікроелементи. Азотобактерин застосовують для бактеризації насіння, розсади, компостів. При цьому врожайність збільшується на 10-15%. Насіння зернових обробляють сухим азотобактерином з розрахунку 100 млрд. клітин на 1 гектарну норму насіння. Картоплю й кореневу систему розсади рівномірно змочують водною суспензією бактерій. Для одержання суспензії 1 гектарну норму (300 млрд. клітин) розводять в 15 літрах води. При обробці ґрунтовим або торф'яним

азотобактерином насіння перемішують зі зволженим препаратом і для рівномірного висіву підсушують. Кореневу систему розсади змочують приготовленою суспензією.

4. Бактеріальне добриво фосфобактерин.

Фосфобактерин - бактеріальне добриво, що містить спори мікроорганізму *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Являє собою порошок ясно-сірого або жовтуватого кольори.

Бактерії мають здатність перетворювати складні фосфорорганічнісполуки (нуклеїнові кислоти, нуклеопротеїди і т.д.) і важкозасвоювані мінеральні фосфати в доступну для рослин форму. Крім цього бактерії виробляють біологічно активні речовини (тіамін, піридоксин, біотин, пантотенову й нікотинову кислоти та ін.), що стимулюють ріст рослини. Фосфобактерин належить до препаратів зі стимулюючим ефектом.

Bacillus megaterium var. phosphaticum являють собою дрібні, грампозитивні аеробні спороутворюючі палички розміром 2-6 мкм. Клітини містять значну кількість з'єднань фосфору. У ранній стадії розвитку це рухливі поодинокі палички, при старінні утворюють ендоспори, що локалізуються в одному з кінців клітки. У силу вищевикладеного технологія вирощування зводиться до одержання спор.

У цілому виробництво фосфобактерину схоже на виробництво азотобактерину й препаратів бульбочкових бактерій. Склад живильного середовища у відсотках: кукурудзяний екстракт -1.8, меляса - 1.5, сульфат амонію - 0.1, крейда - 1, решта - вода. Культивування ведеться глибинним методом у строго асептичних умовах при постійнім перемішуванні й примусової аерації до стадії утворення спор. Основні параметри проведення процесу: температура 28-30°C, рН 6.5-7.5, тривалість культивування 1.5-2 доби.

Отриману в ході культивування біомасу клітин відокремлюють центрифугуванням і висушують у розпилювальній сушарці при температурі 35-40°C до залишкової вологості 2-3%. Висушені спори змішують із наповнювачем. В якості наповнювача – каолін. Розфасовують препарат у поліетиленові пакети по 50-500 г. В кожному грамі сухого доброякісного фосфобактерину повинно міститися не менше 200 млн. життєздатних клітин бактеріального препарату. На відміну від нітрагіну й азотобактерину фосфобактерин має більшу стійкість при зберіганні.

Фосфобактерин рекомендують застосовувати на чорноземних ґрунтах, які містять значну кількість фосфорорганічних сполук. Необхідний для підвищення врожайності зернових, картоплі, цукрового буряка й ін. сільськогосподарських рослин. Насіння обробляють сумішшю сухого фосфобактерину з наповнювачем (золою, ґрунтом і ін.) у співвідношенні 1:40. На 1 гектарну порцію потрібно 5 г препарату й 200 г наповнювача. Бульби картоплі рівномірно зволожують суспензією спор, приготовленої з розрахунку 15 г препарату на 15 л води. Урожай при цьому підвищується на 10%. Фосфобактерин рекомендовано для чорноземів на фоні внесення органічних добрив. Виявлено, що ефективність фосфобактерину на ґрунтах, удобрених суперфосфатом, не знижується, а підвищується.

Д\3 Опрацювати тему.