

# ВІДГУК

На дисертаційну роботу КИРИЛЕНКО Людмили Василівни  
«Функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник за дії  
фітопатогенних мікроорганізмів», представленої на здобуття наукового  
ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.07 –  
мікробіологія

Біологічна продуктивність наземних та водних екосистем, а також біосфери в цілому істотно залежить від джерел зв'язаного азоту. Задоволення потреб зелених рослин в азоті – досить складне завдання, оскільки вищі рослини не здатні використовувати вільний азот як джерело азотного живлення через відсутність у них механізмів, що долають сили зчеплення атомів у його молекулі. Найбільший парадокс полягає в тому, що всі без винятку живі організми планети Земля, в тому числі й рослини, постійно потребуючи доступних форм азоту і не маючи способів його резервування, знаходяться в «океані» молекулярного азоту. З усієї біорізноманітності живої матерії лише незначна кількість організмів здатна більшою чи меншою мірою забезпечувати себе азотом, тоді як мікроорганізми-азотфіксатори забезпечують не тільки себе, але і всю біосферу біологічним азотом, а також – його резервування у вигляді різних азотовмісних сполук. При цьому єдиним способом створення запасів азоту є його перетворення в специфічну органічну речовину ґрунту – гумус. Тільки ґрунти мають здатність до накопичення (іммобілізації) зв'язаного в ході біологічної фіксації азоту і відіграють роль єдиного в біосфері довготривалого депо цього елемента. Невипадково за значимістю для живої природи явище азотфіксації, здійснюване мікроорганізмами в симбіозі та асоціаціях із рослинами, прийнято порівнювати з іншим глобальним процесом планети Земля – фотосинтезом.

Найважливіша роль ґрунтових мікроорганізмів полягає у формуванні та підтримці протягом тисячоліть біогеохімічного циклу азоту, в тому числі і за рахунок його біологічної азотфіксації.

Зважаючи на гостру необхідність вирішення вже сьогодні нагальних питань відновлення і збереження ґрутової родючості, одержання екологічно безпечної продукції, безпечної для здоров'я людини, цілком зрозумілим є постійно зростаючий інтерес дослідників різних областей біології до питань, пов'язаних із процесом біологічного перетворення молекулярного азоту, здійснюваного діазотрофними мікроорганізмами в симбіозі і асоціаціях із рослинами в природних екосистемах та агрофітоценозах, створених людиною. За останні десятиліття відбувся значний прогрес в області біологічної азотфіксації, пов'язаний з розробленням інструментальних методів, що дозволяють здійснювати комплексні дослідження, які охоплюють різні рівні організації та функціонування рослинно-мікробних систем – генетичний, молекулярний, клітинний, організменний, системний. При цьому нові методи молекулярної біології, біотехнології та генетичної інженерії поряд із класичними методами мікробіології, фізіології рослин, генетики й агрочімії дозволяють як вирішувати фундаментальні питання, що стосуються виявлення особливостей формування та функціонування фітобактеріальних систем різної ефективності, так і розкривають практичні шляхи корекції взаємин симбіотичних партнерів із метою створення високоефективних симбіозів, спрямовані на підвищення існуючого рівня біологічного перетворення азоту атмосфери в органічні азотовмісні сполуки.

Вагомим фактором підвищення продуктивності агроекосистем, потенціал яких у даний час використовується недостатньо, є активізація мікробно-рослинної взаємодії шляхом внесення мікробних препаратів. Вони інтенсифікують фізіологічно-біохімічні процеси у рослинах, підвищують їх стійкість до хвороб і позитивно впливають на мікроорганізми ґрунту. Без використання біопрепаратів для обробки насіння бобових культур виробництво недобирає як мінімум 10-30 % урожаю. При їх застосуванні збільшується вміст білків у насінні на 2-6 %, навіть за наявності в ґрунті популяцій аборигенних ризобій.

Розв'язанню проблеми ефективності функціонування бобово-rizобіальної системи у різні часи було приділено багато уваги, наглядним

прикладом чого є видання 4-х томної монографії «Биологическая фиксация азота» С.Я. Коць та ін., 2010 – 2014 pp.).

Інтерес до козлятника східного обумовлений його здатністю покращити екологічний стан екосистеми країни завдяки забагаченню ґрунту біологічним азотом, який засвоюється з атмосфери бульбочковими бактеріями у симбіозі з козлятником, нагромаджуючи понад 300 кг/га його в орному шарі за вегетаційний період. Саме тому для підвищення ефективності рослинно-мікробної взаємодії і урожайності бобових культур слід проводити аналітичну селекцію бульбочкових бактерій та бобових рослин. Крім того, цінність козлятника східного полягає не тільки у здатності до багаторічного зростання, резистентності до мінливих кліматичних умов, високому вмісті білка, вітамінів, поживних речовин, амінокислот, а й у здатності фіксувати біологічний азот великими кількостями.

На формування та функціонування бобово-ризобіального симбіозу величезний вплив мають абіотичні, біотичні, та антропогенні фактори зовнішнього середовища. Серед біотичних особливу роль відіграють ґрутові мікроорганізми, зокрема, фітопатогенні гриби, бактерії, які є збудниками хвороб бобових рослин. Нагромаджуючись у ґрунті, вони пригнічують ріст рослин і знижують врожайність сільськогосподарських культур (Р.І. Гвоздяк та ін., 2011). Проте, вплив фітопатогенних мікроорганізмів на азотфіксуючий потенціал бобових рослин, зокрема козлятнику досліджено недостатньо.

Як зазначає автор дисертаційної роботи Л.В. Кириленко у літературі обмежені відомості стосовно стосовно ефективного функціонування симбіотичної системи *Rhizobiumlegaleae* – козлятник за дії фітопатогенних мікроорганізмів. Тому зазначені вище дослідження є актуальним і має практичне значення. Якраз ці питання і розв'язує у своїй роботі Кириленко Людмила Василівна. Тому не має ніяких сумнівів в актуальності теми дисертаційної роботи і її значимості для розв'язанням мікробіологічних, екологічних, біотехнологічних і практичних завдань.

Дисертація написана згідно вимог ДАК Міністерства освіти і науки України і включає всі необхідні розділи – вступ, огляд наукової літератури,

опис матеріалів, методи та умови проведення досліджень, чотирьох розділів експериментальної частини, висновків, рекомендацій виробництву, додатків. Дисертаційну роботу викладено на 164 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 22 таблицями та 10 рисунками. Список використаної літератури становить 305 джерел, з яких 83 латиною.

Дисертаційна робота виконувалась відповідно до угоди про творчу науково-технічну співдружність між Вінницьким національним аграрним університетом та Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (від 24.03. 2009 р.) у межах науково-дослідної роботи відділу фітопатогенних бактерій за темами: «Моніторинг і генетична різноманітність фітопатогенних бактерій в системі органічного землеробства» (ДР № 0112U002751, 2012–2016 рр.) та «Метаболічні профілі сапрофітних бактерій родів *Pantoea* і *Pseudomonas* при формуванні асоціативних взаємодій у системах мікроорганізм – рослина» (ДР № 0112U002747, 2012–2016 рр.).

У вступі з необхідною деталізацією викладені актуальність роботи, мета, яка полягає у дослідженні ефективності симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник східний за дії фітопатогенних мікроорганізмів.

Для досягнення даної мети автором були поставлені наступні завдання:

- виділити високоефективні штами бульбочкових бактерій з кореневої системи козлятнику, вивчити їхні культурально-морфологічні властивості і вплив на ростові процеси, функціонування симбіотичного апарату та кормову і насіннєву продуктивність козлятнику;
- визначити чисельність та родовий склад фітопатогенних бактерій і грибів козлятнику, дослідити їхній вплив на процес формування бульбочок та активність симбіотичної фіксації азоту;
- вивчити взаємодію штамів *Rhizobium galegae* з фітопатогенними грибами і бактеріями, що спричиняють хвороби козлятнику;
- дослідити вплив інокуляції насіння козлятнику бульбочковими бактеріями на підвищення резистентності рослин до збудників хвороб та на амоніфікуючу і нітрифікуючу здатність ґрунту;
- дати економічну та енергетичну оцінку застосуванню передпосівної

інокуляції насіння козлятнику активними штамами бульбочкових бактерій.

**В огляді літератури**, який складається з п'яти підрозділів, викладено аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури щодо біологічних особливостей і використання козлятнику, формування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник, ролі генотипів макро- і мікросимбіонтів за утворення симбіотичних систем, селекції високоефективних штамів бульбочкових бактерій, біологічної фіксації азоту, зокрема видів азотфіксаторів та розповсюдження їху природі, впливу екологічних факторів на розвиток і продуктивність бобово-ризобіального симбіозу. На основі аналізу літературних даних обґрунтовано актуальність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи, визначено напрями та основні завдання роботи. Огляд в основній своїй масі представляє цінний аналітичний матеріал, який закінчується висновком, що важливим завданням є щонайповніше використовувати високий біологічний потенціал козлятника східного, досліджувати шляхи активізації його симбіотичних систем та підвищення продуктивності культури за допомогою екологічно безпечних елементів технології.

**У другому розділі «умови, об'єкти та методи проведення досліджень»** автором роботи показано, що експериментальну частину виконували впродовж 2011 – 2016 рр. у вегетаційних та лабораторних умовах відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, у польових умовах дослідного поля Вінницького національного аграрного університету і Вінницької державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства НААН у с. Агрономічне Вінницького району за 7 км на південь від м. Вінниця.

Об'єктами досліджень було: 6 штамів *Rhizobium galegae* Л1, Л2, Л3, Л4, Л5, Л6, виділених нами у різні роки з бульбочок козлятнику східного; еталонний виробничий штам *Rhizobium galegae* CIAM 0703(зберігається у Колекції культур бульбочкових бактерій (ВНДІСГМ РАН); еталонний штам

*Rhizobium galegae* MC-1 №159 української колекції; 55 штамів збудників бактеріозу козлятнику східного, виділених нами з уражених бактеріозами рослин у різні періоди з досліджуваних регіонів України; 14 колекційних штамів *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*; 7 колекційних штамів *Pseudomonas fluorescens*, колекційні штами *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

У дослідженнях використовували 3 сорти козлятнику східного: Салют, Донецький 90, Кавказький бранець.

Наводяться мікробіологічні, біохімічні, фізіологічні, фізико-хімічні методи дослідження, а також методи постановки дослідів.

Математичне оброблення експериментальних даних проводили за методикою Б.О. Доспехова (Б.О. Доспехов, 1985) за t-критерієм Стьюдента ( $p=0,05$ ) із застосуванням програми Excel.

**Третій розділ "Формування високоефективної симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник".** За час досліджень проаналізовано близько 300 зразків рослин козлятнику східного з відносно великою кількістю бульбочок на корінні. Найефективнішими виявилися 6 штамів *Rh. galegae*, виділених нами у різні роки з бульбочок козлятнику східного і залучених до досліджень, виробничий шtam *Rh. galegae* CIAM 0703ВНДІСГМ РАН, еталонний шtam *Rh. galegae* MC-1 №159 української селекції.

Встановлено, що інтродуковані штами бульбочкових бактерій утворили з козлятником східним сорту Кавказький бранець бобово-ризобіальні симбіози, які вирізнялися різною азотфіксуючою активністю 2,55–3,07 мкг/год азоту на рослину. Найвищим цей показник був за інокуляції рослин штамом Л2 – 3,07. Урожай зеленої маси козлятнику зростав при цьому на 54,9 – 67,5% порівняно з контролем і на 14,1 й 38,4 – порівняно зі штамом-еталоном виробничим CIAM 0703 та №159 відповідно.

Автор роботи робить висновок, що передпосівне оброблення насіння козлятнику східного азотфіксуючими мікробними штамами дасть можливість

розробити екологічно безпечні технології вирощування цієї багаторічної бобової культури, що сприятиме не тільки одержанню високих стаих урожаїв, а й збалансованому забезпеченням рослин азотом, зменшенню витрат мінеральних добрив, зниженню вмісту нітратів у зеленій масі, відтворенню родючості ґрунтів

**Четвертий розділ** присвячено дослідженням впливу біопрепаратів на мікробні угруповання ґрунту ризосфери козлятнику східного. Встановлено, що біомаса бактерій при застосуванні мінеральних добрив збільшувалася порівняно з варіантом без добрив у понад 1,42 раза, при застосуванні ризобофіту та ризобофіту з  $N_{60}P_{60}K_{60}$  – в 1,84 і 1,78 раза відповідно. Чисельність олігонітрофільних бактерій, що беруть участь у трансформуванні рештків органічної речовини в 1,56, а стрептоміцетів – у 2,9 раза. Слід також зазначити, що ґрунт варіанта з ризобофітом та ризобофітом сумісно з мінеральним добривом характеризувався максимальним вмістом целюлозоруйнівних мікроорганізмів у 8,5 і 8,7 раза вищим, порівняно з контролем відповідно. Вміст мікроскопічних грибів мав тенденцію до збільшення від контролю до мінерального фону і до варіантів із застосуванням ризобофіту.

Підвищення чисельності бацил і стрептоміцетів у ґрунті із застосуванням ризобофіту і мінеральних добрив свідчить про глибшу деструкцію органічної речовини. Ці групи мікроорганізмів засвоюють сполуки, які часто недоступні для неспорових бактерій, а розвиваються на субстраті бідному на доступні сполуки.

Дослідження амоніфікуючої та нітрифікуючої здатності ґрунту при вирощуванні козлятнику східного показали, що використання ризобофіту позитивно впливає на цей показник ґрунту. Порівняно з контролем амоніфікуюча здатність зросла на 158 мг  $NH_3/100$  г ґрунту, а нітрифікуюча – на 24 мг  $NO_3/100$  г ґрунту. Результати досліджень показали, що застосування ризобофіту за вирощування козлятнику східного сприяє збільшенню виділення  $CO_2$  у 2 рази порівняно з контролем. Такі самі закономірності спостерігали і за визначення поглинання  $O_2$ .

Авторський висновок. При вирощуванні сільськогосподарських культур з використанням ризобофіту у ґрунті складаються сприятливіші умови для життєдіяльності мікроорганізмів, у результаті чого підвищується його біологічна активність.

У 5 розділі «Вплив фітопатогенних бактерій та грибів на ефективність функціонування симбіотичної системи *Rhizobium galegae* – козлятник» автором показано, що основним збудником бактеріозу козлятнику, який уражує усі надземні частини рослини, є *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – поліфаг, що спричинює чорно-коричневі некротичні плями, тому назва хвороби має такі синоніми: бактеріальна плямистість, чорна плямистість, коричнева дрібна плямистість.

Охарактеризовано і проілюстровано найрозважальніші грибні хвороби козлятнику східного, якими виявилися іржа, бура плямистість, рамуляріоз, церкоспороз, хоча козлятник вважають достатньо резистентною рослиною.

Для з'ясування впливу бактеріальних та грибних метаболітів на нітрогеназну активність бульбочок за дії фільтратів культуральних рідин *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas* sp. P14 та *Uromyces galegae* P15 на симбіотичну систему козлятник східний – бульбочкові бактерії показали, що під їхньою дією знижувалась нітрогеназна активність бульбочок порівняно з контролем варіантом, а при замочуванні бульбочок у культуральній рідині *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Uromyces galegae* P15 азотфіксація взагалі була відсутня. Інокуляція насіння козлятнику східного активним штамом бульбочкових бактерій *Rh. galegae* Л2 пом'якшувала негативний вплив фітопатогенів на рослини козлятнику.

**Висновок автора:** «за умов жорсткого інфекційного навантаження знижується ефективність функціонування бобово-різобіальної системи. Це призводить до пригнічення розвитку рослин, про що свідчить зниження надземної маси козлятнику східного, її якості та маси коренів порівняно з контролем варіантом.

**Шостий** розділ присвячено дослідженню з визначення економічної ефективності передпосівної інокуляції насіння козлятнику східного штамом *Rhizobium galegae* Л2. Встановлено, що за роки досліджень сукупні енерговитрати за варіантами досліду становили 41,1 – 41,4 ГДж/га. Накопичення енергії в урожаї козлятнику східного під впливом інокуляції у всіх варіантах перевищує витрати енергії на її застосування. Що підтверджено показниками енергетичного коефіцієнта та коефіцієнта енергетичної ефективності, які становили 6,46 і 3,58 відповідно у контролі, збільшуючись до 7,95 і 4,42 у варіанті із застосуванням штаму *Rh.galegae* Л2. Отримані результати свідчать про високу енергетичну ефективність насіння за передпосівної інокуляції козлятнику східного, що вивчали у досліді.

**Всі основні результати є нові. Найбільш значими із них є наступні:**

уперше визначено градацію штамів бульбочкових бактерій для створення ефективно функціонуючого бобово-ризобіального симбіозу *Rhizobium galegae*– козлятник східний задії фітопатогенних бактерій і грибів.

Розширено уявлення про можливість формування високопродуктивної симбіотичної системи *Rhizobium galegae*– козлятник східний шляхом координованої селекції макро- та мікросимбіонтів в умовах Лісостепу України.

Науково обґрунтовано та експериментально доведено, що за умов ефективної взаємодії макро- та мікросимбіонтів інокуляція насіння козлятнику активними штамами ризобій сприяє підвищенню урожайності та резистентності рослин до збудників хвороб.

Виділено новий штам *Rhizobium galegae* Л2, який за впливом на ефективність приросту зеленої маси козлятнику східного та її якість значно перевершував виробничий штам *Rhizobium galegae* CIAM 0703 і еталонний штам *Rhizobium galegae* MC-1 №159.

**Практичне значення одержаних результатів:**

до макросимбіонту козлятнику (*Galega orientalis* Lam.) підібрано комплементарний йому високоактивний штам *Rhizobium galegae* Л2, який

захищено патентом України (№ 95714, 2015 р.). Доведено можливість застосування цього штаму для підвищення урожайності насіння і поліпшення його якості за дії фітопатогенних мікроорганізмів. Отримані дані є потенційно важливими для скринінгу високоефективних штамів бульбочкових бактерій в процесі створення мікробних препаратів для рослинництва.

Основні результати досліджень хвороб козлятнику східного, заходів захисту його від фітопатогенних мікроорганізмів та застосування біологічно активних препаратів природного походження використано у методичних рекомендаціях «Хвороби козлятнику східного: моніторинг, діагностика, профілактика», Вінниця, 2016. Результати дисертації рекомендовано використовувати при викладанні курсів «Фітопатологія», «Бактеріози рослин», «Біологічні методи захисту рослин», «Загальна мікробіологія» тощо у вищих навчальних закладах сільськогосподарського та біологічного профілю.

Основні результати наукових досліджень пройшли у 2014–2015 рр. виробничу перевірку в господарствах Оратівського району Вінницької області: СФГ «Надія М.В.» на площі 25 га, у СФГ «Ескіт»— на площі 23 га та у ТОВ «Скоморошківське». Впроваджена технологія вирощування козлятнику забезпечила приріст урожаю 4,5 т/га, 4,2 і 5,3 т/га відповідно.

Проте робота не позбавлена недоліків, основними з яких можна вважати наступні:

- невиправданою є надмірна деталізація окремих методів визначення азотфіксувальної активності тощо, що є традиційними у таких дослідженнях і добре висвітлені в літературі;

- бажано було б у роботі навести порівняльні дані щодо впливу окремих внесених вхідних факторів (дані щодо ефективності штаму *Rhizobium galegae* Л2 на козлятнику східному, впливу фітопатогенних мікроорганізмів) на підсумкові, тобто на врожай представників козлятнику;

- виходячи з аналізу V розділу підрозділ 5.3, де зазначено, що за дослідження з визначення біологічної цінності протейну зеленої маси

козлятнику східного було ідентифіковано 18 амінокислот. Доцільно було б зазначити, яка кількість цих амінокислот є незамінними;

– у розділі VI, де наведено економічні розрахунки, не вказаночому економічні витрати більші за інокуляційновим штамом *Rhizobium galegae* L2, якщо в усіх варіантах використовували інокуллю окрім контролю?

–як отримували культуральну рідину: через бактеріальний фільтр чи центрифугу?

–чому для досліджень обрали штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* та *Uromyces galegae* P15;

–поясніть цінність глутамінової кислоти.

– у авторефераті на сторінці 11 у шостому абзаці таблиця 4 названа неправильно, а саме – 4.2, що є явною друкарською помилкою;

–цікавим було б вивчення не лише кількісних, але й якісних показників урожаю;

–автором у деяких поясненнях використовується слово «можливо, доцільно», хоча результати, отримані автором дають право говорити на наш погляд стверджувально;

–є окремі помилки редакційного характеру.

Перераховані зауваження не мають принципового характеру і не змінюють загального сприятливого враження на дисертаційну роботу Л.В. Кириленко. Вона заслуговує самої високої оцінки, оскільки за об'ємом одержаного матеріалу, глибині його критичного аналізу, новизні висновків, безумовно, відповідає всім вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013р. №567, зі змінами, затвердженими Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 року та № 1159 від 30 грудня 2015 р., на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук, а її автор, Людмила Василівна Кириленко цілком заслуговує присудження ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю – 03.00.07 –

мікробіологія. Автореферат відповідає змісту дисертації. Основні результати дисертації опубліковані у опубліковано 15 наукових праць, з них 2 монографії, 6 статей у фахових виданнях (у тому числі 2 в зарубіжних виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 розділ у зарубіжній монографії, 3 – у матеріалах і тезах конференцій, 2 методичні рекомендації, 1 патент.

ОПОНЕНТ, кандидат біологічних наук,  
асистент кафедри мікробіології  
та імунології ННІЦ «Інституту  
біології та медицини» Київського  
національного університету  
імені Тараса Шевченка



Ю.М. ЮМИНА

«3 » березня 2017 року, м. Київ



• 