

Микробиология почв

УДК 633:631.8:632.95:631.46

doi: 10.15389/agrobiology.2024.1.142rus

**ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО
БИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ
И ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**В.А. БАБАК[✉], Е.Ж. ЖАКУПОВ, И.А. ПУНТУС, А.Н. ФОМИНА

Микробиота почвы оказывает непосредственное влияние на ее плодородие и состав и, как следствие, на урожайность растений. Современные условия сельскохозяйственного производства стимулируют внимание к биологическому земледелию, суть которого заключается в использовании потенциальных возможностей естественных экосистем, в частности почвенных микроорганизмов. Самая обширная и разнообразная по свойствам группа почвенных микроорганизмов — свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие бактерии. Еще одна группа — фосфатмобилизующие микроорганизмы почвы участвуют в превращении труднодоступных неорганических и органических фосфатов в усвояемые растениями водорастворимые формы. В условиях Казахстана для повышения урожайности культур и улучшения почвенного плодородия важное значение имеют экологичные и безопасные комплексные биологические удобрения на основе изолятов микроорганизмов из местных природных биогеоценозов. Целью представленной работы была лабораторная оценка эффективности комбинированного биологического удобрения на основе фосфатмобилизующих и азотфиксирующих бактерий и его совместимости с некоторыми фунгицидными и гербицидными препаратами, применяемыми в Республике Казахстан. В вегетационных опытах испытывали биологическое удобрение БиоАзоФосфит на основе азотфиксирующих бактерий *Raoultella oxytoca* MS и фосфатмобилизующих бактерий *Serratia plymuthica* MS на саженцах огурцов сорта Мева и семенах яровой пшеницы сорта Акмола 2. Тесты подтвердили эффективность комбинированного биологического удобрения на растениях огурца по основным биометрическим показателям (длина стебля и междоузлий, число и размеры плодов). Установлено, что средняя длина плодов в опыте была на 12,4 % ($p < 0,05$) больше, чем в контроле, а общая масса собранных плодов в опыте — на 20,3 % ($p < 0,05$) больше, чем в контроле. Биоудобрение БиоАзоФосфит показало эффективность на яровой пшенице при предпосевной обработке семян. Обработанные семена давали более дружные всходы (доля проросших семян к установленному сроку на 5,2 % выше), а полученные из них растения по росту и развитию достоверно ($p < 0,05$) опережали контрольные в течение всего времени наблюдения (на 12-31 %). Оценка совместимости комбинированного биоудобрения БиоАзоФосфит с основными фунгицидными (Фламинго, Дивиденд Экстрим) и гербицидными (Ассолюта, Трибун, Глифосат и Смерч) препаратами, применяемыми на пшенице в Казахстане, показала снижение жизнеспособности живых микроорганизмов под влиянием гербицидов широкого спектра действия (Глифосат и Смерч). Остальные испытанные фунгициды и гербициды незначительно подавляли культуры микроорганизмов. Следовательно, не рекомендуется применять биоудобрение на основе живых микроорганизмов с гербицидами широкого спектра действия. Результаты проведенных испытаний позволяют рекомендовать использованные параметры роста и продуктивности при лабораторной экспресс-оценке качества партий микробиологических препаратов.

Ключевые слова: ризобактерии, азотфиксирующие бактерии, фосфатмобилизующие бактерии, биологическое удобрение, плодородие, фунгицид, гербицид.

Экономический и экологический кризис, снижение качества продукции растениеводства, падение естественного плодородия почв стимулируют внимание к биологическому земледелию, суть которого заключается в использовании потенциальных возможностей естественных экосистем, в частности почвенных микроорганизмов (1, 2).

Микробиота почвы оказывает непосредственное влияние на ее плодородие и состав и, как следствие, на урожайность растений. Почвенные микроорганизмы в процессе роста и развития улучшают структуру почвы, накапливают в ней питательные вещества, минерализуют различные органические соединения, превращая их в легко усвояемые растениями формы. Для стимуляции этих процессов применяют различные бактериальные удобрения на основе полезных микроорганизмов, обогащающих ризосферный (прилегающий к корням растения) слой почвы питательными веществами (3, 4). Микроорганизмы, используемые для производства

бактериальных препаратов, улучшают снабжение растений не только элементами минерального питания (азотом и фосфором), но и физиологически активными веществами (фитогормонами, витаминами и др.). Положительное действие многих биопрепаратов также обусловлено их фитосанитарной функцией за счет вытеснения патогенных почвенных микроорганизмов и ингибирования их размножения (5, 6).

Самая обширная и разнообразная по своим свойствам группа почвенных микроорганизмов — свободноживущие и симбиотические азотфиксирующие бактерии, усваивающие азот атмосферы, которые связаны с корневой системой или наземной вегетативной частью растений у представителей злаковых, пасленовых, масличных и других семейств (7, 8).

Экспериментально установлено, что азот, фиксированный микроорганизмами, на 100 % усваивается растениями, в то время как азот минеральных удобрений — всего на 50 %. Помимо этого, биологический азот практически бесплатный, поскольку бактерии для осуществления азотфиксации используют энергию органических веществ, синтезированных растениями в процессе фотосинтеза (9, 10).

Фосфор, как известно, — один из важнейших биогенных элементов, при участии которого в животных и растительных организмах происходит синтез нуклеиновых кислот, белков, углеводов и осуществляется энергетический обмен. Одновременно фосфор служит основным лимитирующим элементом питания для растений в почве. Недостаток фосфора в ранний период развития растения нельзя компенсировать обильным фосфорным питанием в последующие фазы роста (11-13). Фосфатмобилизующие микроорганизмы почвы участвуют в превращении труднодоступных неорганических и органических фосфатов в усвояемые растениями водорастворимые формы (14, 15).

Разнообразные биохимические процессы, протекающие в почве, обусловлены, прежде всего, жизнедеятельностью микроорганизмов. Между микрофлорой почвы и растениями эволюционно сформировались сложные взаимоотношения как симбиотического, так и антагонистического характера. Симбиоз между растениями и почвенными бактериями имеет в основном трофическую природу. Жизнедеятельность микроорганизмов, в свою очередь, в значительной степени определяет режим корневого питания растений, их устойчивость к заболеваниям и неблагоприятным условиям среды, а в конечном итоге — урожайность (16-18).

Ежегодно исследователи выделяют новые изоляты почвенных микроорганизмов из различных семейств с полезными фосфатмобилизующими и азотфиксирующими свойствами и разрабатывают на их основе монокомпонентные и комплексные биологические удобрения. Биологические удобрения оказывают значимый эффект как стимуляторы роста и защиты для разных семейств растений, но в большей степени на зерновых и зернобобовых культурах — пшенице, ячмене, сое (19-22).

В условиях Казахстана для повышения урожайности культур и улучшения почвенного плодородия важное значение имеет создание и практическое использование экологических и безопасных комплексных биологических удобрений на основе изолятов микроорганизмов из местных природных биогеоценозов, оценка эффективности таких препаратов, разработка методов контроля их качества и регламентов применения.

В настоящей работе впервые представлены результаты лабораторного испытания комбинированного биологического удобрения БиоАзо-

Фосфит на овощной (огурцы, сорт Мева) и зерновой (яровая пшеница, сорт Акмола 2) культурах и определена чувствительность микроорганизмов, входящих в его состав, к воздействию ряда фунгицидов и гербицидов. Параметры биометрического контроля, которые мы определяли, предлагается использовать при лабораторной экспресс-оценке эффективности микробиологических препаратов для зерновых и овощных культур, а также качества заводских партий таких препаратов.

Целью наших исследований была лабораторная оценка эффективности комбинированного биологического удобрения на основе фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий и его совместимости с некоторыми фунгицидными и гербицидными препаратами, применяемыми в Республике Казахстан.

Методика. Серии комплексного биологического удобрения БиоАзо-Фосфит на основе штаммов бактерий *Raoultella oxytoca* MS (азотфиксирующий компонент, АФК) и *Serratia plymuthica* MS (фосфатмобилизирующий компонент, ФМК) (23) (серии № 2, № 3 и № 4) изготовлены ТОО «БИОТРОН ГРУП» (Республика Казахстан). Производственные штаммы *R. oxytoca* и *S. plymuthica* были выделены в 2017 году из темно-каштановых почв в Акмолинской области (Северный Казахстан), идентифицированы (ТОО «BIOTRON Progress») и в 2018 году депонированы в Республиканском государственном предприятии «Государственная коллекция микроорганизмов» Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан под номерами соответственно В-РКМ 0833 и В-РКМ 0832.

При производстве биоудобрения БиоАзоФосфит серии № 2 штаммы изначально выращивали в смешанной культуре. Численность обоих штаммов (титр активности препарата) составила $3,0 \times 10^9$ КОЕ/мл. Штаммы для серий № 3 и № 4 культивировали отдельно, затем объединяли в двухкомпонентные препараты из АФК и ФМК. Титр активности штаммов составил в первом случае соответственно $1,15 \times 10^{10}$ и $1,48 \times 10^9$ КОЕ/мл, во втором — $3,65 \times 10^9$ и $2,18 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Биоудобрение БиоАзоФосфит серии № 2 использовали в лабораторных экспериментах для повышения всхожести семян яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Акмола 2 (ТОО «Агрофирма ТНК», Акмолинская обл., Республика Казахстан) и стимуляции роста рассады огурцов (*Cucumis sativus* L.) сорта Мева (ТОО «Тепличные технологии Казахстана», г. Степногорск, Республика Казахстан) в фазу первого настоящего листа. Исследования проводили в ТОО «BIOTRON Progress» (Акмолинская обл., Республика Казахстан). В опытах с пшеницей использовали сформированные искусственные грядки (грядка представляла собой поддон размером $90 \times 50 \times 15$ см). Почва — темно-каштановая, содержание гумуса от 3 до 4 %, pH 7,46-7,49 (слабощелочной), общего азота в горизонте А — 0,15-0,21 %, свободно гидролизуемого азота — 2,6-4,2 мг-экв., валовой фосфорной кислоты — до 0,10-0,13 %. Количество общего фосфора в почвообразующей породе достигало 0,18 %, содержание валового калия по профилю горизонта колебалось в пределах 1,6-2,2 %.

Огурцы высаживали из транспортировочной тары в грунт через 15 сут после всходов (2021 год), по 3 растения в каждом из 6 вегетационных сосудов в контроле и опыте (по $n = 18$). В опыте растения обрабатывали только биоудобрением в период вегетации (инструкция по применению биопрепарата для овощных культур предусматривает следующий регламент: 1,0 л/т для предпосевной обработки семян и 1,0 л/га для обра-

ботки в период вегетации; водный раствор биопрепарата готовили перед применением из расчета 5-7 л/т семян и 200-250 л/га). В контроле растения не получали никаких подкормок в виде химических монокомпонентов, минеральных (NPK) или биологических удобрений. Режимы инсоляции и полива почвы (по мере просыхания грунта) в опыте и контроле совпадали. В течение всего периода опыта (70 сут) еженедельно отмечали показатели роста и развития. Статистическую оценку результатов проводили на основании учета биометрических показателей (число плодов, длина плода, длина междоузлий, площадь листьев, масса плодов) на 50-е и 62-е сут в период активного плодоношения.

На яровой пшенице сорта Акмола 2 в опыте провели предпосевную обработку семян биоудобрением в течение 4 ч с последующей однократной обработкой в период вегетации (инструкция по применению биопрепарата для зерновых культур предусматривает следующий регламент: 1,5 л/т для предпосевной обработки семян и 1,5 л/га для обработки в период вегетации; водный раствор биопрепарата готовили перед применением из расчета 10-15 л/т семян и 250-300 л/га). В опыте при выращивании пшеницы применяли только биоудобрение. В контроле для замачивания семян в течение 4 ч и обработки вегетирующих растений использовали водопроводную воду. Семена высевали на искусственные грядки 1 апреля 2021 года с одинаковой нормой высева в опыте и контроле. Контрольные растения не получали никаких подкормок в виде химических монокомпонентов, минеральных (NPK) или биологических удобрений. Режимы инсоляции и полива почвы по мере просыхания грунта в опыте и контроле были одинаковыми. В течение периода от посева семян до 10-х сут роста вели визуальное наблюдение и ежесуточно с 4-х сут учитывали биометрические показатели (равномерность всходов, длина листа). Замеры проводили случайно, на разных участках грядки 2-кратно по принципу конверта в пяти точках по 4 замера в каждой. Для статистической обработки использовали результаты измерения листа, имеющего максимальную длину, у 20 растений на каждой из двух смежных грядок.

Выживаемость и совместимость фосфатмобилизирующих и азотфиксирующих бактерий, входящих в состав препарата БиоАзоФосфит, оценивали с фунгицидами Фламинго, Дивиденд Экстрим (ООО «Сингента», Россия), гербицидами Ассолюта, Трибун (ООО «Агро Эксперт Групп», Россия), Глифосат («AFD Chemicals», США) и Смерч (ТОО «Астана-Нан», Республика Казахстан). Двухкомпонентный фунгицид Фламинго используют из расчета 0,4 л/т семян в 10 л воды (рабочий раствор препарата 1:25), фунгицид-протравитель Дивиденд Экстрим — из расчета 0,5 л/т семян в 10 л воды (рабочий раствор препарата 1:20), препарат Ассолюта — из расчета 0,5 л/га посевов в 150 л воды (рабочий раствор препарата 1:300), послевсходовый гербицид Трибун с действующим веществом трибенурон-метил — из расчета 20 г/га посевов в 150 л воды (рабочий раствор препарата 1:7500), системный гербицид Глифосат (глифосат, изопропиламинная соль) — из расчета 5 л/га посевов в 150 л воды (1:30), системный гербицид Смерч (глифосат, изопропиламинная соль) растворяли из расчета 5 л/га посевов в 150 л воды (рабочий раствор препарата 1:30).

Биоудобрения серий № 3 и № 4 смешивали с перечисленными препаратами в их рабочей концентрации (соотношении 1:1, экспозиции в одном опыте до 4 ч). Титры штаммов *R. oxytoca* MS и *S. plymuthica* MS определяли при высеве серийных разведений от 10^{-6} до 10^{-9} на агаризован-

ных средах Эшби и МПА (мясопептонный агар) на основании подсчета колоний через 48 ч культивирования при 29 °С. Учет проводили в трех повторностях по 2 чашки Петри (всего в среднем 18 чашек на препарат). Концентрацию жизнеспособных клеток в 1 см³ суспензии рассчитывали по формуле (ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток»): $C = (n6 + n7)/1,1$, где C — число жизнеспособных клеток в 1 см³ препарата, млн, $n6$ — среднее число колоний, выросших при посеве из разведения 10⁻⁶, $n7$ — среднее число колоний, выросших при посеве из разведения 10⁻⁷, 1,1 — постоянный коэффициент. За положительный показатель совместимости принимали снижение титра (ΔC) испытуемого материала АФК и ФМК не более чем на $1,0 \times 10^1$ КОЕ/мл ($\Delta C < 1,0 \lg$), за отрицательный результат — снижение титра штаммов более чем на один порядок ($\Delta C > 1,0 \lg$).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel 2016 с помощью статистического пакета анализа данных и в программе STATISTICA 8.0 («StatSoft, Inc.», США). Уровень значимости всех представленных величин был не ниже первого критерияльного порога достоверности ($p < 0,05$). Использовали общепринятые способы статистической обработки экспериментально полученных выборок варьирующих переменных для биотехнологических исследований. Определяли дисперсию, средние значения (M), стандартные отклонения ($\pm SD$), доверительные интервалы средних значений, проводили двухвыборочный t -тест с одинаковыми дисперсиями (24).

Результаты. Штамм *R. oxytoca* MS относится к ассоциативным азотфиксаторам почвы семейства *Enterobacteriaceae*. Проведенный нами ранее генетический анализ с амплификацией участка гена с использованием праймеров *nifH-1F* и *nifH-1R* показал, что специфический ПЦР-продукт размером ~ 430 п.н. присутствует у выделенного штамма *R. oxytoca* MS, то есть штамм относится к азотфиксаторам (Отчет о научно-исследовательской работе «Выделить и отселекционировать штаммы фосфатмобилизующих и азотфиксирующих бактерий с целью получения на их основе комплексного биоудобрения» в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС, 2014 год). Бактерии *S. plymuthica* MS относятся к свободноживущим почвенным микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae*. Фосфатмобилизующие бактерии *S. plymuthica* MS способны к растворению неорганических и органических фосфатов до усвояемых водорастворимых форм, что было изучено на селективной агаризованной глюкозо-аспарагиновой среде с содержанием неорганического фосфора и на среде PSM с фитатом кальция. Установлено, что способность штаммов-фосфатмобилизаторов растворять неорганические фосфаты в основном колеблется в пределах 35-52 мг P/л. *S. plymuthica* были идентифицированы в банке генов как фосфатмобилизующие бактерии (23).

При испытании комбинированного биологического удобрения Био-АзоФосфит на огурцах сорта Мева на 50-е сут после всходов (табл. 1) средняя длина плодов в опыте была на 17,25 % больше, чем в контроле. Средняя длина междоузлий в опыте была на 5,6 % больше, чем в контроле. Средняя площадь листовой поверхности (ПЛП, показатель фотосинтезирующей биомассы) составила в опыте 2183 см² против 1872 см² в контроле, или на 16,6 % больше. Среднее число плодов на 50-е сут наблюдения в опыте было $16,8 \pm 0,65$ против $14,7 \pm 1,36$ шт. в контроле, что превышало показатель без применения биоудобрения на 14,28 %.

На 62-е сут наблюдения (см. табл. 1) средняя длина плодов в опыте составила 16,3 см против 14,4 см в контроле, то есть на 13,2 % больше. Число плодов в опыте в среднем было на 17,8 % больше, чем в контроле. Средняя площадь листа в опыте составляла 2586 см² против 2130 см² в контроле. В целом использование комплексного биоудобрения позволило достоверно увеличить биометрические показатели растений (см. табл. 1), что было подтверждено статистическим анализом данных в двухвыборочном *t*-тесте показателями *t*-критического двухстороннего при $p(T \leq t)$ двухстороннем < заданного уровня значимости $p = 0,05$. Общая масса собранных плодов в опыте была на 20,3 % ($p < 0,05$) больше, чем в контроле.

1. Биометрические показатели у растений огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Мева при обработке комбинированным биологическим удобрением БиоАзо-Фосфит на основе штаммов бактерий *Raoultella oxytoca* MS и *Serratia plymthica* MS на 50-е и 62-е сут наблюдения ($n = 18$)

Показатель	Опыт	Контроль	К контролю, %
50-е с у т			
Длина главного стебля, см:			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	131,5±6,54	127,3±5,20	+3,30
Дисперсия выборки, D[X]	40,2	23,4	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0330 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Число плодов, шт.			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	16,8±0,65	14,7±1,36	+14,28
Дисперсия выборки, D[X]	0,85	1,62	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0029 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Длина плода, см			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	13,3±0,91	12,6±0,82	+5,50
Дисперсия выборки, D[X]	1,15	0,94	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0160 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Площадь листовой поверхности, см ²			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	2183,0±34,70	1872,0±29,11	+16,60
Дисперсия выборки, D[X]	765,7	573,7	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0311 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
62-е с у т			
Длина главного стебля, см			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	142,5±7,40	134,4±4,50	+6,00
Дисперсия выборки, D[X]	46,7	21,2	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0337 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Число плодов, шт.			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	18,5±0,55	15,7±1,36	+17,80
Дисперсия выборки, D[X]	0,92	1,86	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0025 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Длина плода, см			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	16,3±0,86	14,4±0,78	+13,20
Дисперсия выборки, D[X]	0,74	0,62	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,010 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
Площадь листовой поверхности, см ²			
<i>M</i> ± <i>SD</i>	2586,0±42,18	2130,0±31,45	+21,40
Дисперсия выборки, D[X]	996,2	747,6	
Двухвыборочный <i>t</i> -тест с одинаковыми дисперсиями, $p(T \leq t)$ двухстороннее	0,0241 < заданного уровня значимости $p = 0,05$		
П р и м е ч а н и е. Для каждого показателя в таблице значения в опыте статистически значимо отличаются от значений в контроле при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных включала проверку гипотез о разнице средних значений двух распределений при одинаковых дисперсиях и их двухстороннее сравнение при заданном уровне значимости 5 %.			

В опыте растения огурца, обработанные комплексным биоудобрением, даже при визуальном осмотре опережали контрольные по развитию (высота растений, площадь листьев, длина и число плодов) (рис. 1). То

есть потенциал урожайности с одного растения оказался больше при обработке биоудобрением БиоАзоФосфит.



Рис. 1. Растения огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Мева при обработке комбинированным биологическим удобрением БиоАзоФосфит на основе штаммов бактерий *Raoultella oxytoca* MS и *Serratia plymuthica* MS (А) и в контроле без обработки (Б) на 40-е сут после всходов.

В опытах на яровой пшенице сорта Акмола 2 всхожесть семян на 1-2-е сут в опыте и контроле составила соответственно 96,7 и 91,5 %. По интенсивности роста уже с 4-5-х сут после всходов растения в опыте статистически значимо опережали контрольные ($p < 0,05$) (табл. 2).

2. Длина листа (см) у растений яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Акмола 2 при обработке комбинированным биологическим удобрением БиоАзоФосфит на основе штаммов бактерий *Raoultella oxytoca* MS и *Serratia plymuthica* MS ($n = 40$, $M \pm SD$)

Вариант	Время наблюдения, сут						
	4-е	5-е	6-е	7-е	8-е	9-е	10-е
Опыт	4,83±1,011	7,75±2,085	11,14±2,056	14,32±2,562	16,18±1,822	18,65±1,134	21,04±1,215
Контроль	3,68±0,838	6,29±1,874	9,94±2,206	12,22±3,034	14,14±1,681	16,63±1,573	18,54±1,299
К контролю, %	+31,25	+23,31	+12,10	+17,23	+14,43	+12,15	+13,49

Примечание. Для каждого показателя в таблице значения в опыте статистически значимо отличаются от значений в контроле при $p < 0,05$. Приведены данные расчета по 20 листьям для 20 растений с каждой из двух смежных грядок (см. раздел «Методика»).

Средняя длина листа на 4-е сут наблюдения в опыте составила 4,83 см, что было на 31,25 % больше, чем в контроле; на 7-е сут показатель был на 17,23 % больше (см. табл. 2). Превышение значений средней длины листа в опыте относительно контроля сохранялось примерно на одном уровне и к концу наблюдения (10-е сут) составило 13,49 %. Использование биоудобрения БиоАзоФосфит позволило статистически значимо увеличить прирост зеленой массы ростков пшеницы на 12,1-31,25 % (t -статистика 3,58610 > t -критическое двухстороннее 2,64691, $p(T \leq t)$ двухстороннее 0,0241 < заданного уровня значимости $p = 0,05$). Кроме того, растения яровой пшеницы при предпосевной обработке семян биоудобрением давали более дружные всходы (число проросших семян к установленному сроку было выше на 5,2 %).

Известно, что выделение бактериальных ауксинов азотфиксирующими штаммами оказывает положительный эффект на инициацию и удлинение корней, развитие боковых корней и корневых волосков. Благодаря этому ускоряется рост, улучшается потребление питательных веществ

и повышается устойчивость растения к стрессам (5, 16, 17). Визуальные наблюдения (рис. 2) подтверждали полученные нами результаты оценки опережающего роста обработанных растений пшеницы. С 10-х сут отмечали массовое полегание ростков пшеницы (в большей степени в контроле), вероятно, вследствие малой глубины заделки семян в грунт. Дальнейшее наблюдение и учет были затруднительны и потому остановлены.

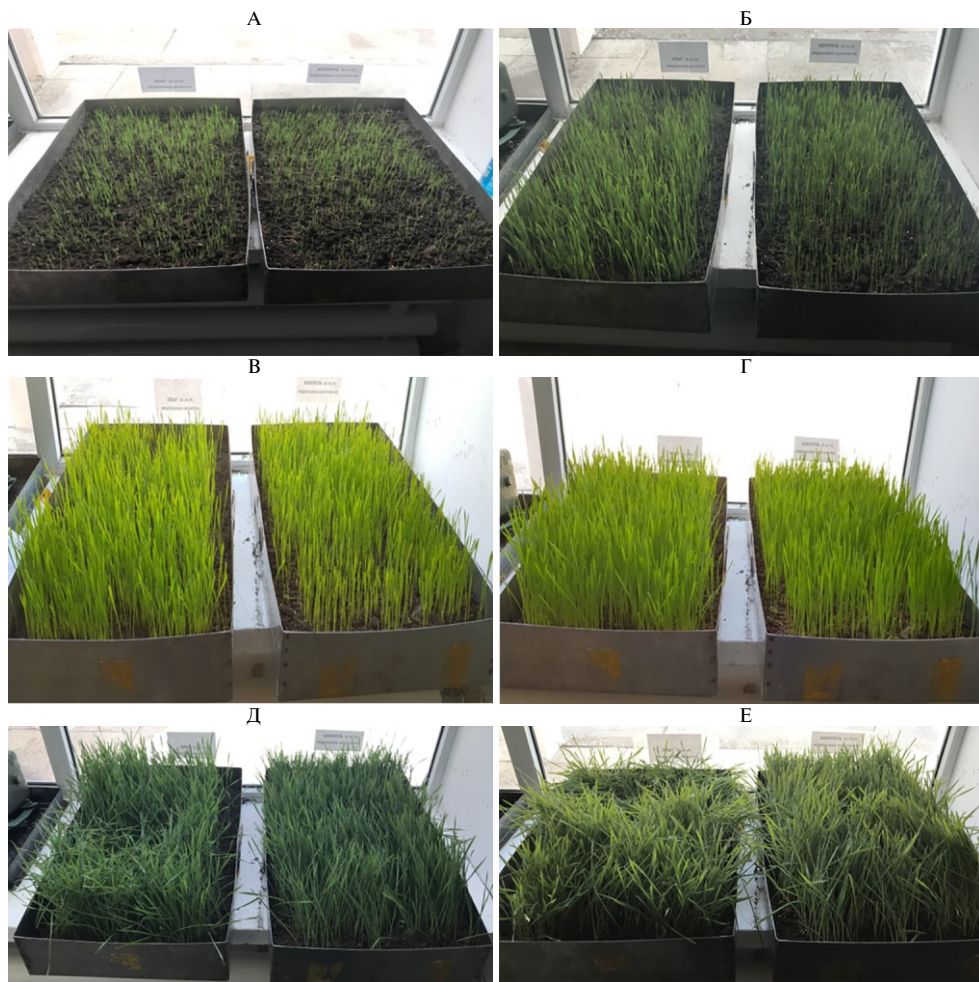


Рис. 2. Растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Акмола 2 при обработке комбинированным биологическим удобрением БиоАзоФосфит на основе штаммов бактерий *Raoultella oxutosa* MS и *Serratia plymuthica* MS (слева) и в контроле без обработки (справа) в начальный период развития: А — 3-и сут, Б — 6-е сут, В — 8-е сут, Г — 9-е сут, Д — 10-е сут, Е — 11-е сут.

В целом результаты проведенного вегетационного опыта показали, что предпосевная обработка семян и опрыскивание вегетирующих растений пшеницы комплексным биоудобрением БиоАзоФосфит стимулировали развитие листового аппарата. Полученные нами данные о влиянии азотного и фосфатного компонента биоудобрения БиоАзоФосфит на формирование фотосинтетической поверхности растений (вегетативной биомассы) согласуются с выводами других авторов (9, 14, 17), которые использовали био-препараты Биоплант-К (ООО «НПО Биопром», Россия) и Экстрасол (ООО «Бисолби Плюс», Россия) на различных сортах яровой мягкой пшеницы. При этом В.С. Курсакова с соавт. (17) установили влияние азотного биоудобрения и прямую взаимосвязь между развитием фотосинтетической

поверхности растений и повышением урожайности у разных сортов пшеницы. Кроме того, сообщалось об эффективности оценки биологического удобрения по вегетативной массе и средней высоте растений, числу и массе семян (3, 25), что в целом согласуется с результатами выполненных нами лабораторных тестов.

Таким образом, мы полагаем, что использованное нами на разных культурах (огурцы и пшеница) лабораторное определение эффективности биоудобрений достаточно информативно в качестве экспресс-оценки их действия.

В исследованиях двухкомпонентных биопрепаратов на зерновых культурах (21) и их различных комбинаций установлено, что наиболее эффективным было сочетание биоудобрений Азотобактерина и Фосфатобактерина («Инновационная компания Биоинвест-Агро», Украина), а также добавление органического удобрения Гумат К (ТОО «Химия и технология», Казахстан), что положительно отражалось на качественных и количественных характеристиках зерновых культур. Эти результаты подтверждают правильность выбранной нами стратегии по разработке комплексного биологического удобрения БиоАзоФосфит с включением азотфиксирующего и фосфатмобилизующего компонентов.

При разработке регламентов применения микробиологических препаратов важно учитывать их совместимость с используемыми фунгицидами и гербицидами. Так, двухкомпонентный фунгицид Фламинго системно-контактного действия на основе тебуконазола и прохлораза применяется для защиты семян зерновых культур от комплекса болезней, передаваемых через семена и почву (твердая, пыльная, каменная головня, гельминтоспориозная и фузариозная корневые гнили, плесневение семян зерновых). Фунгицид-протравитель Дивиденд Экстрим на основе дифеноконазола и мефеноксама активен против твердой головни и пыльной головни, фузариозной корневой гнили, гельминтоспориозной корневой гнили, плесневения семян и других патогенов. Препарат Ассолюта относится к системным гербицидам против однолетних двудольных, в том числе устойчивых к 2,4-D (дихлорфеноксиуксусная кислота) и МСРА (2-метил-4-хлорфеноксиуксусная кислота), и некоторых многолетних корнеотпрысковых сорняков на посевах пшеницы, ячменя и кукурузы. Послевсходовый гербицид Трибун предназначен для борьбы с широким спектром двудольных сорняков в посевах зерновых колосовых культур. Глифосат — системный гербицид сплошного действия для борьбы с однолетними и многолетними злаковыми и двудольными сорняками, а также для десикации, Смерч — системный гербицид сплошного действия для уничтожения вегетирующих растений.

3. Результаты испытания совместимости биоудобрения БиоАзоФосфит и фунгицидов системно-контактного действия ($n = 18$ на препарат, $M \pm SD$)

Препарат	Активность, КОЕ/мл	Препарат	Активность, КОЕ/мл
<i>Raoultella oxytoca</i> , контроль (серия № 4)	$(3,65 \pm 0,650) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> , контроль (серия № 4)	$(2,18 \pm 0,522) \times 10^9$
<i>Raoultella oxytoca</i> (серия № 4) + Фламинго	$(1,48 \pm 0,315) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> (серия № 4) + Фламинго	$(1,40 \pm 0,248) \times 10^9$
<i>Raoultella oxytoca</i> (серия № 4) + Дивиденд Экстрим	$(1,83 \pm 0,288) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> (серия № 4) + Дивиденд Экстрим	$(1,25 \pm 0,154) \times 10^9$
<i>Raoultella oxytoca</i> (серия № 3) + Фламинго	$(6,35 \pm 0,731) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> (серия № 3) + Фламинго	$(7,42 \pm 0,436) \times 10^8$
<i>Raoultella oxytoca</i> , контроль (серия № 3)	$(1,15 \pm 0,347) \times 10^{10}$	<i>Serratia plymuthica</i> , контроль (серия № 3)	$(1,48 \pm 0,271) \times 10^9$

Примечание. Для каждого показателя в таблице значения в опыте статистически значимо отличаются от значений в соответствующем контроле при $p < 0,05$.

При испытании совместимости биоудобрения БиоАзоФосфит с фунгицидами Фламинго и Дивиденд Экстрим было установлено, что эти препараты не оказывали значимого воздействия на используемые производственные штаммы (табл. 3). Контролем служили нативные биопрепараты тех же серий (рис. 3) с добавлением равных объемов стерильной дистиллированной воды. Активность каждого компонента при этом была выше минимального порога соответствия стандарту организации (СТО) производителя ($1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл). Соответственно, они могут свободно использоваться в баковой смеси при предпосевной обработке семян.

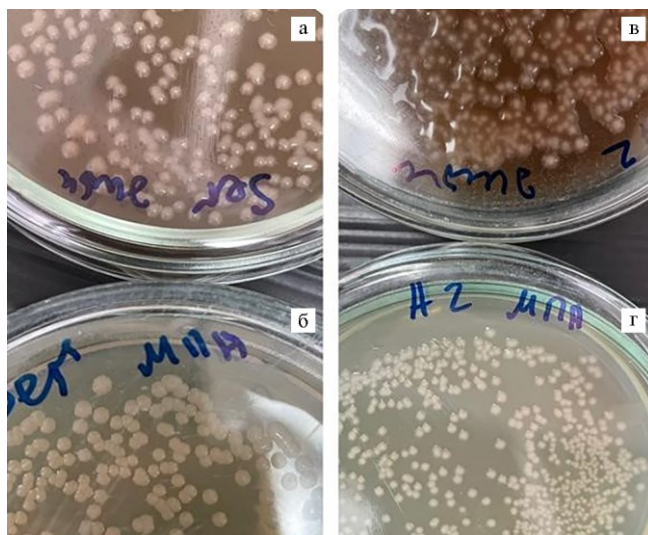


Рис. 3. Рост *Serratia plymuthica* MS (а, б) и *Raoultella oxytoca* MS (в, г) на средах Эшби (а, в) и мясопептонном агаре (б, г).

Системные гербициды Трибун и Ассолюта также не оказывали существенного воздействия на производственные штаммы комплексного биоудобрения БиоАзоФосфит (табл. 4). Активность каждого компонента при этом была выше минимального порога соответствия СТО производителя ($1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл), что дает возможность использовать их в баковой смеси при обработке всходов методом орошения. Гербициды сплошного действия Глифосат и Смерч вызывали существенное снижение активности на 2-3 lg, при этом остаточная концентрация клеток была низкой для эффективного применения биоудобрения. В связи с этим не рекомендуется использовать биоудобрение на основе живых микроорганизмов с гербицидами широкого спектра действия.

4. Результаты испытания совместимости биоудобрения БиоАзоФосфит (серия № 3) с системными препаратами и гербицидами сплошного действия ($n = 18$ на препарат, $M \pm SD$)

Препарат	Активность, КОЕ/мл	Препарат	Активность, КОЕ/мл
<i>Raoultella oxytoca</i> , контроль	$(1,15 \pm 0,170) \times 10^{10}$	<i>Serratia plymuthica</i> , контроль	$(1,48 \pm 0,125) \times 10^9$
<i>Raoultella oxytoca</i> + Трибун	$(5,20 \pm 0,286) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> + Трибун	$(8,46 \pm 0,228) \times 10^8$
<i>Raoultella oxytoca</i> + Ассолюта	$(3,26 \pm 0,130) \times 10^9$	<i>Serratia plymuthica</i> + Ассолюта	$(1,21 \pm 0,147) \times 10^9$
<i>Raoultella oxytoca</i> + Глифосат	$(1,63 \pm 0,181) \times 10^8$	<i>Serratia plymuthica</i> + Глифосат	$(1,00 \pm 0,092) \times 10^7$
<i>Raoultella oxytoca</i> + Смерч	$(2,37 \pm 0,272) \times 10^7$	<i>Serratia plymuthica</i> + Смерч	$(1,84 \pm 0,426) \times 10^7$
<i>Raoultella oxytoca</i> + Смерч (повтор)	$(6,00 \pm 0,321) \times 10^7$	<i>Serratia plymuthica</i> + Смерч (повтор)	$(3,72 \pm 0,361) \times 10^6$

Примечание. Для каждого показателя в таблице значения в опыте статистически значимо отличаются от значений в соответствующем контроле при $p < 0,05$.

Многие авторы (26-30) подтверждают слабое токсическое действие

гербицидов и фунгицидов на микробиологические препараты и рекомендуют их сочетанное применение. Так, оценка совместимости биологических и химических средств защиты в условиях *in planta* на огурце показала незначительное супрессирующее влияние препаратов на культуру микроорганизмов (26). Показана эффективность и целесообразность совмещения всех использованных средств защиты растений как химического, так и биологического происхождения. Установлено (27, 28), что гербициды различных по химическому составу групп и их баковые смеси целесообразно сочетать с биологическими препаратами, устойчивыми к химическому воздействию. Так, применение гербицидов с антистрессовым биопрепаратом Фитоспорин М (29) влияет на биологическую эффективность самих препаратов, фитотоксичность гербицидов не проявляется, в итоге значительно повышается урожайность и качество зерна. Однако некоторые химические препараты значительно снижают активность микробиологических удобрений, что необходимо учитывать при составлении баковой смеси или при опрыскивании всходов (30, 31).

Итак, в лабораторных опытах нами достоверно ($p < 0,05$) подтверждена эффективность комбинированного биологического удобрения БиоАзоФосфит на основе фосфатмобилизирующих бактерий *Serratia plymuthica* MS и азотфиксирующих бактерий *Raoultella oxytoca* MS на саженцах огурцов сорта Мева и семенах и ростках яровой пшеницы сорта Акмола 2. У огурца для оценки по биометрическим показателям учитывали длину стебля и междоузлий, число и размеры плодов, площадь листа. Установлено, что средняя длина плодов в опыте была на 13,2 % больше, чем в контроле, а общая масса собранных плодов с растений в опыте — на 20,3 %. Семена яровой пшеницы при предпосевной обработке биоудобрением БиоАзоФосфит давали более дружные всходы (доля проросших семян за установленный срок больше на 5,2 %), а по росту и развитию растения в опыте опережали контрольные за весь период наблюдения на 12-31 %. Указанные биометрические показатели могут использоваться при лабораторной экспресс-оценке качества микробиологических препаратов для зерновых и овощных культур, а также при контроле качества заводских партий продукта. Оценка совместимости комбинированного биоудобрения БиоАзоФосфит с основными фунгицидными и гербицидными препаратами, применяемыми на злаковых культурах, показала, что не рекомендуется одновременно использовать биоудобрение на основе живых микроорганизмов и гербициды широкого спектра действия, например Глифосат и Смерч (при необходимости их следует применять отдельно). Остальные испытанные фунгициды и гербициды оказывали незначительное супрессирующее воздействие на культуры микроорганизмов.

ТОО «BIOTRON Progress»,
021500 Республика Казахстан, Акмолинская обл., г. Степногорск,
Промышленная зона, 4, комплекс 7,
e-mail: vgavm2003@mail.ru ✉, zhakupov_bio@mail.ru,
puntosira@mail.ru, vgavm2003@mail.ru

Поступила в редакцию
15 мая 2023 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 1, pp. 142-155

LAB TESTS ON EFFICIENCY OF A BIOLOGICAL FERTILIZER BASED ON NITROGEN-FIXING AND PHOSPHATE-MOBILIZING BACTERIA

V.A. Babak ✉, E.Zh. Zhakupov, I.A. Puntos, A.N. Fomina

ORCID:

Babak V.A. orcid.org/0000-0003-1860-1210

Puntus I.A. orcid.org/0009-0004-0628-5999

Zhakupov E.Zh. orcid.org/0000-0002-7294-257X

Fomina A.N. orcid.org/0000-0001-8655-0879

The authors declare no conflict of interests

Final revision received May 15, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2024.1.142eng

Accepted December 28, 2023

Abstract

Soil microbiota has a direct impact on soil fertility and composition and, as a consequence, on plant productivity. Currently, agricultural production requirements focus on biological farming the essence of which is to use the potential capabilities of natural ecosystems, in particular soil microorganisms. The most extensive and diverse group of soil microorganisms in properties are free-living and symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Another group, phosphate-mobilizing soil microorganisms, participate in the conversion of hard-to-reach inorganic and organic phosphates into water-soluble forms assimilated by plants. Environmentally friendly and safe complex biological fertilizers based on isolates of microorganisms from local natural biogeocenoses are important to increase crop yields and improve soil fertility in the conditions of Kazakhstan. The purpose of the submitted work was a lab assessment of the effectiveness of a combined biological fertilizer based on phosphate-mobilizing and nitrogen-fixing bacteria and its compatibility with some fungicidal and herbicide preparations used in the Republic of Kazakhstan. In pot trials, the biological fertilizer BioAzoPhosfit based on nitrogen-fixing bacteria *Raoultella oxytoca* MS and phosphate-mobilizing bacteria *Serratia plymuthica* MS was tested on cucumber seedlings of the Meva variety and spring wheat seeds of the Akmola 2 variety. Tests confirmed the effectiveness of the combined biological fertilizer on cucumber plants according to the main biometric indicators (e.g., length of stem and internodes, number and size of fruits). It was revealed that the average fruit length in the treatment was 12.4 % ($p < 0.05$) greater than in the control, and the total weight of harvested fruits in the treatment was 20.3 % ($p < 0.05$) greater than in control. Biofertilizer BioAzoPhosfit showed effectiveness on spring wheat after pre-sowing seed treatment. The treated seeds produced more vigorous shoots (the proportion of seedlings that sprouted by the set date was 5.2 % higher), and the plants from the treated seeds were significantly ($p < 0.05$) ahead of the control ones in growth and development throughout the entire observation period (by 12-31 %). In lab tests with the main fungicidal (Flamingo, Dividend Extreme) and herbicide (Assoluta, Tribune, Glyphosate and Smerch) preparations used on wheat in Kazakhstan, the combined biofertilizer BioAzoPhosfit showed a decrease in the viability of living microorganisms under the influence of broad-spectrum herbicides Glyphosate and Smerch. All other fungicides and herbicides tested slightly suppressed microbial cultures. Therefore, we recommend not using biofertilizers based on live microorganisms with broad-spectrum herbicides. The results of the tests allow us to recommend the growth and productivity parameters we used in this work for laboratory express testing the quality of microbiological preparation batches.

Keywords: rhizobacteria, nitrogen-fixing bacteria, phosphate-mobilizing bacteria, biological fertilizer, fertility, fungicide, herbicide.

REFERENCES

1. Tereshchenko N.N. *Biudobreniya na osnove mikroorganizmov: uchebnoe posobie* [Biofertilizers based on microorganisms: a tutorial]. Tomsk, 2003 (in Russ.).
2. Sytnikov D.M. *Biotekhnologiya*, 2012, 5(4): 34-45 (in Russ.).
3. Til'ba V.A., Shkarupa M.V. *Maslichnye kul'tury*, 2019, 1(177): 104-109 (doi: 10.25230/2412-608X-2019-1-177-104-109) (in Russ.).
4. Ignatov V.V. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, 1998, 9: 28-33 (in Russ.).
5. Ortiz A., Sansinenea E. The role of beneficial microorganisms in soil quality and plant health. *Sustainability*, 2022, 14(9): 5358 (doi: 10.3390/su14095358).
6. Froussart E., Bonneau J., Franche C., Bogusz D. Recent advances in actinorhizal symbiosis signaling. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(6): 613-622 (doi: 10.1007/s11103-016-0450-2).
7. Rosenblueth M., Ormeño-Orrillo E., López-López A., Rogel M.A., Reyes-Hernández B.J., Martínez-Romero J.C., Reddy P.M., Martínez-Romero E. Nitrogen fixation in cereals. *Front. Microbiol.*, 2018, 9(9): 1794 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01794).
8. Tikhonovich I.A., Zavalin A.A. *Plodородie*, 2016, 5: 28-32 (in Russ.).
9. Alferov A.A., Chernova L.S., Zavalin A.A., Chebotar' V.K. *Vestnik rossiyской sel'skokhozyaystvennoy nauki*, 2017, 5: 21-24 (doi: 10.25680/S19948603.2019.106.13) (in Russ.).
10. Soumare A., Diedhiou A.G., Thuita M., Hafidi M., Ouhdouch Y., Gopalakrishnan S.,

- Kouisni L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*, 2020, 9(8): 1011 (doi: 10.3390/plants9081011).
11. Shvartau V.V., Gulyaev B.I., Karlova A.B. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rasteniy*, 2009, 41(3): 208-220 (in Russ.).
 12. Mikhaylovskaya N.A., Mikanova O.A., Barashenko T.B., Tarasyuk E.G., Dyusova S.V. *Pochvovedenie i agrokhimiya*, 2011, 2(47): 120-129 (in Russ.).
 13. Jha B.K., Gandhi Pragash M., Cletus J., Raman G., Sakthivel N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25(4): 573-581 (doi: 10.1007/s11274-008-9925-x).
 14. Djuuna I.A.F., Prabawardani S., Massora M. Population distribution of phosphate-solubilizing microorganisms in agricultural soil. *Microbes and Environments*, 2022, 37(1): ME21041 (doi: 10.1264/jsme2.ME21041).
 15. Belyasova N.A., Ignatovets O.S., Sergievich D.S., Minakovskiy A.F. *Vestnik Belorusskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*, 2018, 2: 93-97 (in Russ.).
 16. Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Kadmiri I.M. Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 1-19 (doi: 10.3389/fmicb.2021.628379).
 17. Kursakova V.S., Khizhnikova T.G., Novikova L.A. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2014, 2(112): 23-27 (in Russ.).
 18. Park J., Bolan N., Mallavarapu M., Naidu R. Enhancing the solubility of insoluble phosphorus compounds by phosphate solubilizing bacteria. *Proc. 19-th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*. Brisbane, Australia, 2010: 65-68.
 19. Zavalin A.A., Alferov A.A., Chernova L.S. *Agrokhimiya*, 2019, 8: 83-96 (doi: 10.1134/S0002188119080143) (in Russ.).
 20. Zlotnikov A.K., Alekhin V.T., Andrianov A.D., Andrianov D.A., Apasov I.V., Balandina A.V., Begunov I.I., Boronin A.M., Volkova G.V., Gamuev V.V., Gins V.K., Gins M.S., Glazova Z.I., Derov A.I., Dolgushkin A.K., Dulov M.I., Durygina E.P., Zhdanov N.S., Zhuk G.P., Zaytseva L.A., Zakharkina R.A., Zeyruk V.N., Zlotnikov K.M., Zubarev A.A., Ivanova N.N., Kazakov A.V., Kazakova M.L., Kargin Yu.I., Kirsanova E.V., Kononov P.F., Kostin D.A., Kudryavtsev N.A., Lebedev A.V., Lebedev V.B., Likhacheva A.E., Maslov M.I., Pakhnenko O.A., Perov N.A., Popov Yu.V., Pukhova L.F., Romanova E.V., Rukin V.F., Ryabchinskaya T.A., Ryabchinskiy A.V., Sadovnikova L.K., Sarantseva N.A., Safonov P.A., Sergeev V.R., Sibikeeva Yu.E., Slobodyanyuk V.M., Strelkov E.V., Syroizhko N.P., Talash A.I., Trots A.P., Kharchenko G.L., Khryukina E.I., Shulyakovskaya L.N. *Biopreparat Al'bit dlya povysheniya urozhaya i zashchity rasteniy: opyty, rekomendatsii, rezul'taty primeneniya* [Biological product Albit for increasing yield and protecting plants: experiments, recommendations, application results]. Moscow, 2008 (in Russ.).
 21. Bobrenko I.A., Popova V.I., Kormin V.P., Goman N.V., Boldysheva E.P., Chernyavskaya M.A. *Elektronnyy nauchno-metodicheskiy zhurnal Omskogo GAU*, 2021, 4(27): 1-6 (in Russ.).
 22. Mosa W., Sas-Pasz L., Frac M., Trzcinski P. Microbial products and biofertilizers in improving growth and productivity of apple — a review. *Polish Journal of Microbiology*, 2016, 26; 65(3): 243-251 (doi: 10.5604/17331331.1215599).
 23. *Serratia plymuthica strain*. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ729609>. Accessed: 03/18/2022.
 24. Neminushchaya L.A., Skotnikova T.A., Tokarik E.F., Koval'skiy I.V., Eremets N.K., Pavlenko I.V., Provotoroka O.V., Eremets V.I., Samuylenko A.Ya., Kanarskaya Z.A. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*, 2015, 18(2): 377-382 (in Russ.).
 25. Allouzi M.M.A., Allouzi S.M.A., Keng Z.X., Supramaniam C.V., Singh A., Chong S. Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. *Heliyon*, 2022, 8 (12): 12609. (doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12609).
 26. Voitka D.V., Yankovskaya E.N., Radevich S.Yu., Garko L.S., Fedorovich M.V. *Zashchita rasteniy (Belarus')*, 2018, 42: 306-315 (in Russ.).
 27. Mohiddin, F.A., Khan M.R. Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. *African Journal of Agricultural Research*, 2013, 43(8): 5331-5334.
 28. Dasgupta D., Kumar K., Miglani R., Mishra R., Kumari P.A., Bisht S.S. Microbial biofertilizers: recent trends and future outlook. In: *Recent advancement in microbial biotechnology*. S. De Mandal, A. Kumar Passari (eds.). Academic Press, 2021, 1: 1-26 (doi: 10.1016/B978-0-12-822098-6.00001-X).
 29. Korshikov A.V. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2005, 1(5-1): 83-84 (in Russ.).
 30. Mohammadi A.T., Amini Y.S. The influence of pesticides and herbicides on the growth and

- spore germination of *Trichoderma harzianum*. *Agriculture Science Developments*, 2015, 4(3): 41-44.
31. Constantinescu F., Siciua O.-A., Tu C.F, Dinu M.M., Andrei A.-M., Mincea C. In vitro compatibility between chemical and biological products used for seed treatment. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 2014, LVII: 146-151.