

## ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ВПЛИВУ ФУНГІЦИДІВ НА БУЛЬБОЧКОВІ БАКТЕРІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У ЧИСТІЙ КУЛЬТУРІ

Н.А. Воробей, К.П. Кукол, С.Я. Коць

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,  
вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна  
e-mail: n-vorobey@ukr.net

**Мета.** Оцінити ступінь чутливості штампів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* до фунгіцидів контактної-системної дії Максим XL, Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс та Бенорад, що сприятиме вирішенню питання сумісності хімічних засобів захисту рослин з інокуляцією насіння бактеріальними препаратами. **Методи.** Чутливість бульбочкових бактерій до впливу фунгіцидів вивчали методом лунк, висічених у пластинках агаризованого середовища, яке засівали суцільним газonom бульбочкових бактерій згідно з загальноприйнятими мікробіологічними методами. Контролем слугували лунки з 80 мкл стерильної водопровідної води, розміщені в центрі агарової пластинки. **Результати.** Досліджувані штами бульбочкових бактерій *B. japonicum* у різній мірі чутливі до діючих речовин препаратів із фунгіцидним ефектом Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс та Максим XL за використання 1 та 2 виробничих норм. Як малочутливі до 1 норми Бенораду оцінено штами – 6346, 646, 631, 71m, 48, 532C, 191, PC07, PC08, PC09, PC10, PC11 *B. japonicum*, проте для більшості штамів подвійна норма Бенораду є токсичною, за виключенням *B. japonicum* 71m, PC07, PC10 (малочутливі). **Висновки.** Штучне моделювання впливу однієї та двох виробничих норм фунгіцидів Максим XL, Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс та Бенорад на бульбочкові бактерії дало можливість визначити ступінь їх стійкості до вказаних препаратів та виявити найбільш резистентні ризобії з метою подальшого їх застосування у технологіях вирощування сої.

**Ключові слова:** бульбочкові бактерії, *Bradyrhizobium japonicum*, фунгіциди, Максим XL, Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс, Бенорад.

Найбільшим попитом серед зернобобових культур у світовому сільськогосподарському виробництві користується соя. Посівні площі під сою інтенсивно зростають, а продукція використовується у різних галузях народного господарства (харчовій промисловості, тваринництві, фармації, косметології, медицині та інш.) [1]. На сьогоднішній день світове виробництво сої становить майже 352 млн. т. Незмінно лідерами є США, Бразилія, Аргентина, які в 2016/17 рр. зібрали рекордні 286 млн. т сої, що становить 82 % світового виробництва [2]. В Україні у 2017 р. посівні площі під соєю збільшилися до 2 млн. га, а в перспективі до 2020 року сягнуть 2,4 млн. га. Врожаї сої, які отримують вітчизняні аграрії в останні роки, дозволили Україні увійти в десятку найбільших світових виробників і експортерів сої [1].

Як базова культура соя має потужний адаптивний потенціал, у тому числі й за рахунок здатності до симбіотичної азотфіксації. Уже багато років регуляція азотфіксувальних процесів у посівах сої відбувається за рахунок бактеріальних препаратів, а передпосівна нітрагінізація насіння у теперішній час є одним із вагомих елементів технології її вирощування [3, 4]. Особливе місце належить мікробним препаратам на основі ефективних азотфіксувальних бульбочкових бактерій, які у симбіозі з бобовими рослинами набувають здатності фіксувати атмосферний азот у доступній рослинам формі [5]. Ризобії, що входять до складу таких препаратів, здатні не тільки покращувати азотне живлення бобових, але й виступати регуляторами росту рослин завдяки здатності синтезувати широкий спектр біологічно активних речовин – амінокислот, гормонів та ін. [6].

Проте у технологічному процесі вирощування сої використовуються заходи, які можуть не тільки стимулювати, але й пригнічувати формування та функціонування симбіотичної системи рослини. Протруювання насіння здійснюють з метою захисту сої від шкочинних організмів, які локалізовані в насінні, на його поверхні, в ґрунті, на рослинних рештках. Передпосівна обробка препаратами фунгіцидною та інсектицидною дії сприяє одержанню дружних і рівномірних сходів, зниженню ураження рослин сої хворобами та шкідниками і, як наслідок, одержанню високого врожаю її зерна [7]. Проте протруєння насіння сої фунгіцидами нерідко призводить до порушення природної взаємодії ризобій з рослиною-хазяїном і супроводжується істотним зниженням активності симбіотичної азотфіксації, зменшенням частки біологічного азоту в урожаї [7, 8]. Протруйники вступають у безпосередній контакт із бульбочковими бактеріями на поверхні насіння сої, при цьому інгібують інфікування коренів бактеріями, викликають певні зміни у взаємовідносинах макро- та мікросимбіонтів, наслідком яких є порушення вуглецевого та азотного обмінів. Помітно змінюється також активність ферментів, які беруть участь в азотфіксації [9].

Одним із механізмів негативного впливу фунгіцидів на бобово-ризобіальний симбіоз є інгібування продукування рослинами фітоестрогенів, які виступають атрактантами для ризобій. Fox et. al. було виявлено, що 45 із 62 досліджених фунгіцидів інгібують флавоноїдний NodD рецептор, а також активізацію генів бульбочкоутворення під час симбіотичного процесу. Інший шлях, яким фунгіциди опосередковано інгібують життєдіяльність ризобій – це зниження синтезу фітогормонів і сидерофорів [10]. Ступінь інгібування та розвитку симбіозу сої з бульбочковими бактеріями залежить від концентрацій хімічних препаратів, їх хімічної природи, кількості опадів, вологості повітря, інших факторів навколишнього середовища та способу внесення. Завчасне протруювання насіння (розведення в часі за 5–20 діб) та інокуляція в день посіву дозволяє зменшити негативне навантаження на біоагенти препаратів, зберегти азотфіксувальну здатність бульбочкових бактерій та підвищити урожайність рослин [11], але пов'язане зі значними витратами [12].

Відомо, що деякі хімічні засоби захисту рослин (ЗЗР), які застосовуються в технологіях вирощування бобових культур, пригнічують

утворення бульбочок, проте не є токсичними для макро- і мікросимбіонтів, оскільки за своїм впливом вони нагадують флавоноїдні сполуки – пригнічувачі бульбочкоутворення [13]. Отже, негативний вплив пестицидів може бути набагато ширшим, ніж токсична післядія ксенобіотиків.

Аналіз даних вітчизняної та зарубіжної літератури показав, що діючі речовини більшості протруйників (у чистому вигляді) визначені дослідниками токсичними в різній мірі по відношенню до ризосферних мікроорганізмів [14], у тому числі і до бульбочкових бактерій. У ряді робіт показана здатність розщеплювати пестициди і активно їх метаболізувати [15], проте це достатньо розповсюджене явище для ризосферних мікроорганізмів [16].

У сучасній літературі значна увага приділяється вивченню впливу фунгіцидів на мікроорганізми-біоагенти мікробних препаратів. Відомі дані, що повільнорослі ризобії сої *Bradyrhizobium japonicum* та швидкорослі ризобії сої *Sinorhizobium fredii* можуть рости на мінерально рослинному агаризованому середовищі (МРС) з соєвим борошном та додаванням виробничої концентрації фунгіциду Максим [12, 17, 18]. При цьому інтенсивність їх росту є аналогічною як у контролі або несуттєво знижується [19].

У лабораторних умовах за впливу зростаючих концентрацій протруйника Фундазол на новий перспективний штам *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4 встановлено, що фунгіцид у концентрації 1 мг/л стримує ріст досліджуваного штаму на 50 %, а в концентрації 625 мг/л повністю його пригнічує. У перерахунку ці концентрації Фундазолу є нижчими порівняно з рекомендованими виробничими дозами препарату, тому можна вважати, що цей фунгіцид є токсичним для штаму *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 5500/4. Тому при сумісній обробці насіння люпину може негативно впливати на його життєздатність [20].

За результатами Mishra et. al. [21] бактерії *B. japonicum* були більш чутливими до Вітаваксу, ніж до тираму. При застосуванні тираму та карбоксину в концентрації 0,5 % чисельність ризобій знижувалась відповідно на 59,7 % та 83,3 % щодо контролю. Вітавакс (як комплекс зазначених діючих речовин) знижував кількість *B. japonicum* на 80,6 %. За результатами Вознюк зі співавт. [22] штами *B. japonicum* УКМ В-6035 і УКМ В-6018 були також чутли-

ві до фунгіциду Вітавакс, діаметр зон затримки росту газонів цих культур становив 14,5 та 25,7 мм відповідно. Аналогічні результати отримані у роботі Ahmed et. al., де зазначено, що збільшення концентрації фунгіциду призводить до зниження чисельності та зменшення діаметру колоній [23].

Стійкість бульбочкових бактерій різних зернобобових культур до пестицидів не є однаковою, а зменшується в послідовності соя > люпин > горох > сочевиця. При цьому токсичність пестицидів збільшується в порядку Максим > Протект > Протект Форте [24]. Перебування ризобій в одному розчині з протруйником негативно впливає на життєздатність бактерій. Зокрема, при збільшенні температури суміші і концентрації пестицидів у розчинах їх токсичність збільшується. Низькі температури (2–5°C) значно підвищують виживання бактерій. Авторами висунуте припущення, що токсичність фунгіцидів для ризобій пов'язана не тільки з діючими речовинами в їх складі, а також з тими додатковими компонентами (полімерами-плівкоутворювачами, поверхнево-активними речовинами, емульгаторами тощо), які виробники додають у протруйники різних марок для покращення їх технологічних властивостей [24].

Наразі пропозиція ЗЗР широко представлена на ринку пестицидів та щорічно збільшується. Дані про їх вплив на бульбочкові бактерії сої та на мікробний біоценоз в цілому є вкрай обмеженими. У той же час активно проводиться пошук та селекція нових високоактивних конкурентоздатних штамів бульбочкових бактерій. На жаль, вивчення сумісності інокуляційних біопрепаратів і протруйників відстає від появи нових потенційно корисних для практики штамів бульбочкових бактерій та форм біопрепаратів [25].

**Метою** наших досліджень було в лабораторних умовах провести оцінювання чутливості штамів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* аналітичної селекції до сучасних фунгіцидів, що сприятиме вирішенню питання сумісності протруювання з обробкою насіння досліджуваними штамми-інокулянтами.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були штами бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* з колекції азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (634б, 64б, 614, 631, 71m, M8, 48, AC15, 532С, PC07, PC08, PC10,

PC11), які характеризуються господарсько-цінними властивостями (підвищеною інтенсивністю фіксації молекулярного азоту, стійкістю до стресових факторів довкілля, ефективністю симбіозу з різними сортами сої). Бульбочкові бактерії *B. japonicum* вирощували на мінеральному середовищі манітно-дріжджовий агар (МДА) г/л:  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2; NaCl – 0,1; маніт – 10,0; дріжджовий екстракт – 0,5; агар – 15,0–17,0, дист. вода, рН 6,8–7,0 при 28° С протягом 5–7 діб.

У дослідженнях використовували стандартні мікробіологічні методи [26]. Стійкість бульбочкових бактерій до впливу фунгіцидів вивчали методом лунок, висічених у пластинках агаризованого середовища в чашках Петрі стерильним металевим циліндром діаметром 10 мм [27]. Поверхню МДА засівали суцільним газоном бульбочкових бактерій згідно загальноприйнятих мікробіологічних методів [26]. В лунки вносили по 80 мкл розчину фунгіциду та інкубували в термостаті 5 діб при 28° С. Контролем слугували лунки з 80 мкл стерильної водопровідної води, розміщені в центрі агарової пластинки. Повторюваність у варіантах досліду триразова.

Штами *B. japonicum* досліджували за чутливістю до впливу фунгіцидів контактної-системної та системної дії (Бенорад, Максим XL, Стандак Топ, Февер та Аканто Плюс, яким обприскують посіви під час вегетації) [28] з різними діючими речовинами:

1) Максим XL 035 FS, т. к. с. («Syngenta», Швейцарія) – протруйник контактної і проникаючої дії проти широкого спектру найпоширеніших хвороб. Діючі речовини флудіоксоніл (25 г/л, клас фенілпіроли) та металаксил–М (10 г/л, клас феніламід) поширюються в ґрунті під час проростання, адсорбуються корінням та розносяться по всій рослині. Норма витрати препарату для обробки насіння сої становить 1,0 л/1 т, використання робочого розчину – 10 л/т насіння;

2) Февер т. к. с. («Bayer CropScience AG», Німеччина) – протруйник контактної-системної дії з активною діючою речовиною протіокназол (300 г/л, підклас триазолінтіонів); норма витрати препарату для обробки насіння сої становить 0,2–0,4 л/1 т, використання робочого розчину – 10 л/т насіння;

3) Стандак Топ т. к. («BASF», Німеччина) – інноваційний протруйник для контролю основних хвороб та шкідників сої з діючими речо-

винами фіпроніл (250 г/л, клас фенілпіразоли) + тіофанат-метил (225 г/л, клас бензimidазоли) + піраклостробін (25 г/л, клас стробілурини); норма витрати становить 1–2 л/1 т, робочого розчину – 10 л/т насіння;

4) Бенорад – системний фунгіцид та протруйник посівного і посадкового матеріалу сільськогосподарських культур. Діюча речовина – беноміл (500 г/кг, клас бензimidазоли). Норма витрати препарату становить 2–3 кг/1 т насіння.

5) Аканто Плюс к. с. («DuPont», США) – двохкомпонентний фунгіцид на основі пікоксістробіну (200 г/л, клас стробілурини) + ципроконазолу (80 г/л, клас триазоли). Препаратом здійснюють обприскування рослин у період вегетації для захисту від широкого спектру хвороб листового апарату з нормою витрати 0,5–0,75 л/га.

Робочі розчини фунгіцидів готували, виходячи з концентрації препарату, рекомендованої виробником для протруювання насіння сої та обприскування посівів культури в період вегетації. Числовим показником зазначали розмір зон затримки росту бактеріального «газону» навколо лунок із вмістом препаратів фунгіцидної дії. Зони пригнічення росту бактерій навколо лунок, розмір яких не перевищує 15 мм, свідчить про слабку чутливість до препарату. Зона затримки росту від 15 до 25 мм фіксується у чутливих мікроорганізмів. Зона, що характеризується високою чутливістю до препарату становить більш, ніж 25 мм [27]. Інтенсивне розмноження та відсутність зон затримки росту навколо лунок з фунгіцидами свідчила про резистентність досліджуваних ризобій до рекомендованої виробником норми застосування препаратів. У лабораторних дослідках із метою відбору штамів *B. japonicum* із високим порогом стійкості до фунгіцидів використовували також подвійну виробничу норму зазначених ЗЗР.

**Результати.** Проведено серію лабораторних дослідів з метою оцінки чутливості штамів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* до ряду фунгіцидів, які використовуються у теперішній час для протруювання насіння сої. Згідно отриманих результатів усі досліджувані штам *B. japonicum* були стійкі до рекомендованої виробником однієї норми фунгіциду Аканто Плюс та Стандак Топ. Лише у штамів *B. japonicum* 631, 71m, 48 та AC15 за дії Стандак Топу зони послаблення репродукції клітин ризобій становили 2,0–3,0 мм, проте на морфологію колоній впливу не виявлено (табл. 1).

У результаті досліджень встановлено, що найбільш резистентними до однієї виробничої норми Феверу з діючою речовиною протіоконзол є штами 6346, 646, 614, 71m, M8, 631, 532C, PC07, PC08, PC10, PC11, оскільки по всій поверхні пластинки МДА був наявний ріст колоній типових для виду *Bradyrhizobium*.

Слабка чутливість до фунгіциду Феверу притаманна чотирьом штамам *B. japonicum* – 631, 48, AC15, PC09 (зони затримки бактеріального росту становлять 2,0–4,0 мм). Також навколо лунок з вмістом Феверу відмічено присутність колоній бульбочкових бактерій меншого розміру порівняно з більш віддаленими від них. Ймовірно, у популяції ризобій цих штамів наявні клітини, стійкіші до більшої концентрації Феверу.

Слабка чутливість до фунгіциду Максим XL притаманна штамам 646, 614, 631, 71m, 48, AC15, 532C, PC08, PC09, PC11 (зони затримки бактеріального росту навколо лунок 4,0–7,0 мм). Всі досліджувані штам *B. japonicum* можна рекомендувати як перспективні для подальших досліджень з метою встановлення сумісного їх використання (в одній баковій суміші) або послідовного (розведеного в часі) з передпосівною обробкою насіння сої фунгіцидом Максим XL або препаратів-аналогів з такими ж діючими речовинами.

З-поміж інших найбільш толерантними до впливу 1 норми фунгіциду Максим XL відзначено штам бульбочкових бактерій *B. japonicum* 6346, PC07, PC10 та M8. Слід додати, що у дослідженнях Токмакової Л.М. зі співавт. показано, що Альфа-Протруйник також не проявляє негативного впливу на ріст клітин *B. japonicum* M-8. У той же час виявлено, що Альфа-Епоксил чинить негативний вплив на ріст клітин *B. japonicum* M-8 (навколо паперового диску, просоченого протруйником утворюється зона затримки росту радіусом 11 мм) [29].

Оскільки аналітично-селекціоновані штам мають підвищену сапрофітну компетентність, а отже – більшу толерантність до різних негативних абіотичних чинників, що потрапляють в ґрунт, вірогідно прогнозувати їх потенційну толерантність і до впливу пестицидів. Проте бульбочкові бактерії – живі організми. Їх стійкість до фунгіцидів визначається хімічними властивостями останніх і фізіологічними особливостями бактерій, а отже – і індивідуальною толерантністю або чутливістю до різних протруйників.

**Таблиця 1**  
**Чутливість бульбачкових бактерій *Bradyniobium jaropisum* до виробничої та подвійної виробничої норм фунгіцидів Февер, Стандак Топ, Аканто Плюс, Максим XL та Бенорад**

Штам	Фунгіцид																			
	Февер				Стандак Топ				Аканто Плюс				Максим XL				Бенорад			
	1н		2н		1н		2н		1н		2н		1н		2н		1н	2н		
	розмір зон пригнічення бактеріального росту, мм														1н	2н				
634б	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	≥25
64б	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10,0	0	0	12	≥25	12	≥25
614	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	10,5	0	0	≥25	≥25	≥25	≥25
631	4	4	0	0	3	2,5	0	0	0	0	0	0	5	10,6	0	0	11	16	11	16
71m	0	0	0	0	2	3,3	0	0	0	0	0	0	5	9,9	0	0	11	11,3	11	11,3
M8	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0	0	≥25	≥25	≥25	≥25
48	4	4	4	4	2	4	0	0	0	0	0	0	5	9,3	0	0	11	≥25	11	≥25
AC15	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4	10,6	0	0	7	≥25	7	≥25
532C	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8,0	0	0	9	≥25	9	≥25
PC07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,9	0	0	4	13	4	13
PC08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	7,3	0	0	14	≥25	14	≥25
PC09	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8,6	0	0	12	20	12	20
PC10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,8	0	0	11	13	11	13
PC11	0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0	0	0	4	8,5	0	0	10	20	10	20

У ході досліджень відмічено більшу чутливість ризобій до Бенораду, ніж до фунгіциду Максим XL. Зони пригнічення росту та розмноження у 12 штамів *B. japonicum* (6346, 646, 631, 71m, 48, 532С, АС15, РС07, РС08, РС09, РС10, РС11) навколо лунок з фунгіцидом Бенорад коливалися від 4 до 14 мм. Оскільки застосування цього фунгіциду призводило до незначного сповільнення репродукції їх клітин, ці штами віднесені до групи штамів малочутливих до 1 виробничої норми Бенораду.

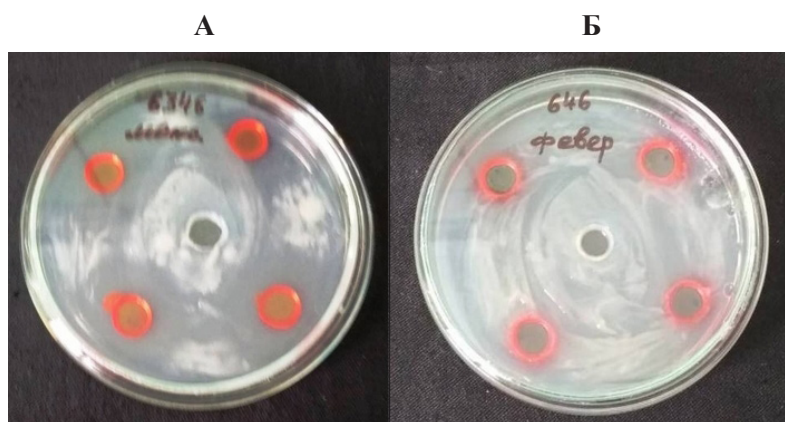
Високочутливими до 1 норми Бенораду є штами 614, М8 *B. japonicum* (зона затримки росту – понад 25 мм, відсутність росту колоній ризобій на МДА в чашках Петрі). Оскільки штами-інокулянти *B. japonicum* 614 та М8 високочутливі до 1 виробничої норми Бенораду, їх недоцільно використовувати одночасно з протруюванням насіння сої зазначеним фунгіцидом.

Отже, застосування виробничої норми широкоспівних фунгіцидів Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс та Максим XL не має істотного токсичного впливу на бактеріальний ріст досліджуваних активних штамів бульбочкових бактерій *B. japonicum* аналітичної селекції. Для визначення можливості комплексного застосування передпосівної бактеризації насіння сої з обробкою фунгіцидами Максим XL, Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс або препаратами з такими ж діючими речовинами всі досліджувані культури *B. japonicum* потребують подальшого вивчення в «баковій суміші з протруйниками». Відібрані також найбільш стійкі до 1 виробничої норми фунгіциду Бенорад в умовах чистої культури штами *B. japonicum* 6346, 646, 631, 71m, 48, 532С, АС15, РС07, РС08, РС09, РС10, РС11 для наступних досліджень з метою вико-

ристання в технологіях вирощування сої.

Інокуляція насіння разом з протруюванням може бути доцільною, оскільки суміщення цих прийомів в одну операцію дозволить зекономити часові і трудові ресурси, а також зменшити втрати насіння у зв'язку зі зменшенням кількості обробок. За цих умов бажано використовувати стійкі до протруйників штами ризобій або компенсувати часткову загибель бактерій завдяки збільшенню норми витрат інокулянту. Таким чином, необхідно враховувати, що суміщення процесів інокуляції і протруювання потребує чітких регламентів застосування, оскільки один і той же штам-інокулянт може по різному реагувати на різні хімічні ЗЗР [12].

Відомо, що подвійна норма протруйника у виробничих умовах не використовується у зв'язку з можливістю негативного впливу на ріст і розвиток рослин на початкових етапах органогенезу та ймовірністю негативної дії на корисну мікробіоту ґрунту. Проте однією з причин можливого надходження надмірної кількості хімічних ЗЗР у агробіоценози є порушення регламентів їх застосування. Відхилення від рекомендованої виробником норми (з різних причин) застосування фунгіциду може призвести до зміни впливу на цільові об'єкти, природні популяції мікроорганізмів та інтродуковані штами азотфіксувальних бактерій. Тому актуальними є дослідження впливу підвищених норм препаратів фунгіцидної дії на корисну мікробіоту, в тому числі й на перспективні за господарсько-корисними ознаками штами бульбочкових бактерій, які можуть використовуватися як бактеріальна основа біологічних препаратів. На основі отриманих попередніх результатів було продовжено роботу в даному напрямку.



**Рис. 1. Зони пригнічення росту бактеріального газону бульбочкових бактерій *B. japonicum* за дії подвійної виробничої норми фунгіцидів: А – Максим XL (штам 6346); Б – Февер (штам 646)**

У результаті досліджень виявлено різну чутливість штамів *B. japonicum* до негативного впливу подвійної виробничої норми пестицидів у залежності від культури та діючих речовин у їх складі. Бульбочкові бактерії сої в різній мірі були малочутливі до 2 норм Максиму XL, зони затримки росту навколо лунок коливались в межах 5,6–10,6 мм (табл. 1, рис. 1А).

З літературних даних відомо, що застосування для бактеризації насіння штамів бульбочкових бактерій зі слабкою чутливістю до дії фунгіцидів не тільки стимулює нодуляційний процес та азотфіксувальну активність, а й значно підвищує урожайність бобових рослин [30]. Отже, у технологіях вирощування сої можливе одночасне використання досліджуваних штамів із протруйником насіння Максим XL.

Внаслідок порівняння росту бактеріально-го газону ризобій за дії 1 та 2 норм Максиму XL з'ясовано, що штамми 6346, PC07, PC10 та M8, які були нечутливі до 1 норми, проявили слабку чутливість до 2 н Максиму XL (зони пригнічення в межах 5,6–8,0 мм). У інших ризобій, які були малочутливими до 1 норми, за дії 2 норм Максиму XL зони пригнічення збільшилися, проте їх розмір зберігався в межах слабкої чутливості (до 15,0 мм).

З'ясовано, що стійкими до подвійної виробничої норми Феверу були всі досліджувані чисті культури *B. japonicum*, слабке пригнічення росту колоній відмічено у штамів бульбочкових бактерій 631, 48, 532С та PC09 (зона затримки росту – від 1 до 7 мм).

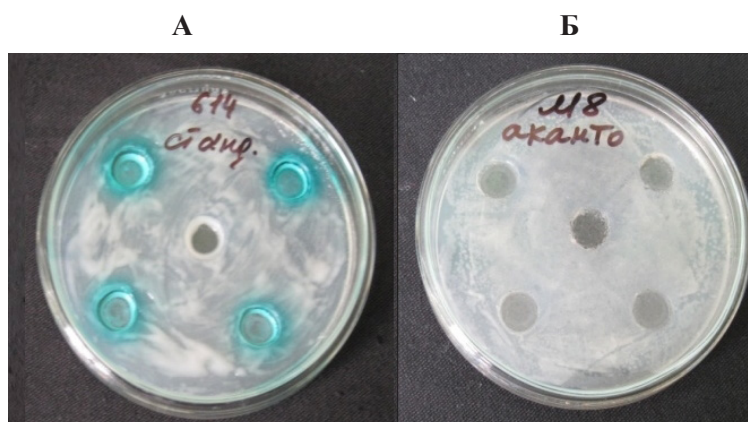
Фунгіцид Стандак Топ, який характеризується фунгіцидною та інсектицидною активністю та має у своєму складі три діючі речовини, застосований у подвійній виробничій нормі, та-

кож не мав токсичного впливу на бактеріальний ріст досліджуваних аналітично селекціонованих штамів *B. japonicum*. Штами оцінено як нечутливі до дії 2 норм зазначеного протруйника (рис. 2А). Серед них лише кілька штамів ризобій, зокрема – 631, 71m, 48, M8 та PC11 мали слабку зону пригнічення росту розміром 1,0–3,0 мм, що вказує на стійкість останніх до негативного впливу подвійної виробничої норми цього препарату.

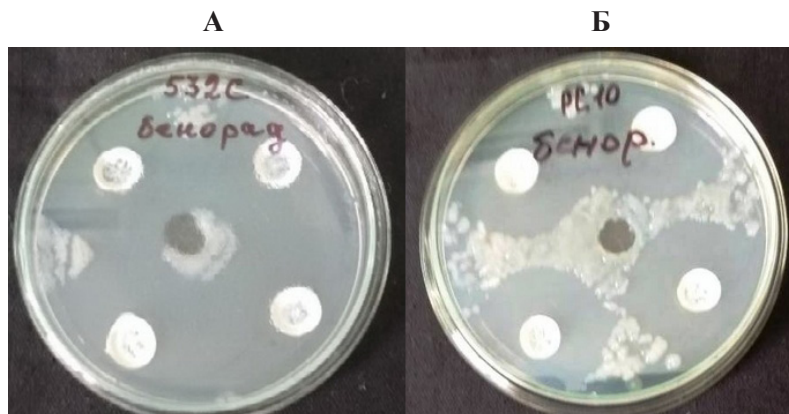
У варіантах досліді при вивченні впливу на ризобії 2 норм фунгіциду Аканто Плюс (на основі пікоксістробіну та ципроконазолу) спростерігали інтенсивний ріст у всіх досліджуваних штамів. При цьому зафіксовано також відсутність змін у морфології їх колоній, що свідчить про їх стійкість до подвійної норми Аканто Плюс (рис. 2Б).

З-поміж використаних хімічних ЗЗР найбільш токсичний вплив, порівняно з дією інших фунгіцидів на досліджувані штамми ризобій, чинив Бенорад за використання подвійної виробничої норми. Вплив 1 норми фунгіциду Бенорад від нейтрального та слабкого пригнічення росту ризобій навколо лунок досягнув токсичного бактерицидного ефекту при застосуванні 2 норм, що підтверджується зонами затримки росту понад 25 мм (табл. 1, рис. 3А).

У більшості досліджуваних штамів за впливу 2 норм Бенораду відсутній ріст колоній в межах агаризованого середовища в чашках Петрі, а штамми *B. japonicum* PC08, AC15, 614, 6346, 646, M8, 48, 532С оцінено як високочутливі до вказаного препарату. Зазначені культури ризобій не рекомендовані для сумісного застосування з передпосівною обробкою насіння сої високими дозами (2 норми та більше) фунгіциду Бенорад



**Рис. 2.** Стійкість бульбочкових бактерій *B. japonicum* до подвійної виробничої норми фунгіцидів: А – Стандак Топ (штам 614), Б – Аканто Плюс (штам M8)



**Рис. 3. Зони пригнічення росту бульбочкових бактерій *B. japonicum* за впливу 2 норм Бенораду: А – високочутливий до Бенораду штам (532С), Б – малочутливий до Бенораду штам (PC10)**

або препаратами з такою ж діючою речовиною.

Як приклад, на рисунку 3А представлено бактерицидний ефект дії (повне пригнічення росту колоній) на штами *B. japonicum* 532С. При цьому зона пригнічення була досить значною, про що зазначено в таблиці 2, тому як наслідок – ріст ризобій навколо контрольних лунок відсутній або суттєво також пригнічений в залежності від досліджуваного штаму. До групи чутливих до 2 норм Бенораду віднесено штами – PC09, PC11, 631 (зона пригнічення 16,0–21,0 мм). Три штами *B. japonicum* – 71m, PC07 та PC10 відзначені як малочутливі до 2 норм Бенораду (зона пригнічення – 11,3–13,0 мм відповідно) (табл. 2, рис. 3Б).

Отже, резистентність бульбочкових бактерій *B. japonicum* до фунгіцидів контактно-системної дії Максим XL, Бенорад, Аканто Плюс, Стандак Топ, Февер *in vitro* визначається хімічними властивостями діючих речовин останніх і фізіологічними особливостями культур бульбочкових бактерій.

З'ясовано, що всі досліджувані нами штами ризобій *B. japonicum* малочутливі або не чутливі до токсичної дії рекомендованої виробником норми фунгіцидів Стандак Топ, Февер, Аканто Плюс та Максим XL у лабораторних умовах, оскільки зони пригнічення росту бактерій на МДА навколо лунок з вмістом хімічних ЗЗР відсутні або дорівнюють 2,0–7,0 мм. За впливу подвійних виробничих норм зберігається толерантність штамів до цих фунгіцидів, однак за дії 2 норм Максиму XL ряд штамів проявили слабку чутливість. Подвійна норма Бенораду є токсичною для більшості досліджуваних шта-

мів *B. japonicum*, проте за дії 1 норми, рекомендованої виробником, стійкість досліджуваних штамів є вищою.

### FUNGICIDES TOXICITY ASSESSMENT ON *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* NODULE BACTERIA IN PURE CULTURE

*N.A. Vorobey, K.P. Kukol, S.Ya. Kots*

*Institute of Plant Physiology and Genetics,  
NAS of Ukraine,  
31/17 Vasylykivska str., 03022, Kyiv, Ukraine*

**Aim.** To estimate the degree of *Bradyrhizobium japonicum* nodule bacteria strains sensitivity to systemic-contact fungicides Maxim XL, Standak Top, Fever, Akanto Plus and Benorad, which will help to resolve the issue of compatibility of plant protection chemicals with inoculation of seeds with bacterial preparations. **Methods.** Nodule bacteria sensitivity to the fungicides was studied by the method of wells in the agar medium plates with lawn seed nodule bacteria according to conventional microbiological methods. 80 µl of sterile tap water were placed into the center well of agar plate and used as control. **Results.** The studied *B. japonicum* nodule bacteria strains have different sensitivity to the single and double recommended norm of active substances of Standak Top, Fever, Akanto Plus and Maxim XL preparations with fungicidal effect. *B. japonicum* 634b, 646, 631, 71m, 48, 532C, 191, PC07, PC08, PC09, PC10, PC11 strains were evaluated as low-



sensitive to single recommended dose of Benorad, however, the double dose of Benorad is toxic for most of the strains, except *B. japonicum* 71m, PC07, PC10 (low-sensitive). **Conclusions.** The artificial simulation of the effects of single and double recommended norm of Maxim XL, Standak Top, Fever, Akanto Plus and Benorad fungicides on nodule bacteria made it pos-

sible to determine their degree of resistance to these preparation and to identify the most resistant rhizobia in order to further use them in technology of soybean growing.

*Keywords:* nodule bacteria, *Bradyrhizobium japonicum*, fungicides, Maxim XL, Standack Top, Fever, Acanto Plus, Benorad.

- Berbenets OV. [World-wide production of soya as an inexhaustible source of vegetable proteins and Ukraine's place in the global trading market]. *Agrosvit*. 2019; 10: 41–45. Ukrainian. doi: 10.32702/2306-6792.2019.10.41.
- Ukrainian Agrarian Confederation. UAC research [An inexhaustible source of vegetable proteins – soybeans], 2017. [Electronic resource]. available at: <http://agroconf.org/content/nevicherpnedzherelo-roslinnih-bilkiv-soya>.
- Sichkar VI. [Pesticides and nitrogen fixation of legume crops]. *Propozytsiya. Modern agro technologies for the use of biological products and growth regulators*. 2015; 32–34. Ukrainian.
- Chabanyuk Ya, Brovko IY. [Factors of existence symbiosis of *B. japonicum*-soybean]. *Propozytsiya*. 2017; 3: 36–37. Ukrainian.
- Kots SYa, Vorobey NA, Kyrychenko OV, Melnykova NN, Mykhalkiv LM, Pukhtayevych PP. [Microbiological preparations for agriculture]. Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine. Kyiv: Logos, 2016; 48. Ukrainian.
- Gryshchuk OO, Kots SYa, Volkogon MV. [The dynamics of cytokinins content in roots and on the early stages of legume-rhizobium symbiosis forming]. *Plant Physiology and biochemistry of cultivated plants genetics*. 2013; 45(1): 20–28. Ukrainian.
- Sichkar VI, Khukhlayev II, Bushulyan OV, Didovich SV, Koblay SV, Lavrova GD, Ganzhe-  
lo OI. [The intensification of nitrogen fixation potential in legume crops via complementary selection of hosts and microsymbionts]. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Gnatiuk National Pedagogical University. Series: Biology*. 2014; 3(60):165–169. Ukrainian.
- Volkogon VV, Nadkernychna OV, Kovalevska TM. [Microbial preparations in agriculture. The-  
ory and Practice]. Kyiv: Agrarna nauka, 2006; 312. Ukrainian.
- Kots SYa, Mamenko TP, Khomenko YuO. The content of hydrogen peroxide and catalase activity in different on effectiveness of symbiotic systems *Glycine max – Bradyrhizobium japonicum* under drought conditions. *Microbiol Z*. 2019; 81(4): 62–75. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.062>
- Fox JE, Gullledge J, Engelhaupt E, Burow ME, McLachlan JA. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(24): 10282–10287. doi: 10.1073/pnas.0611710104
- Pavlyshche AV, Yakimchyk RA, Omelchuk SV, Zhemioda AV, Kots SYa. [Symbiotic properties and seed productivity of soybean in field conditions under various methods of seed treatment with fungicides]. *Plant physiology and genetics*, 50 (4):358–368. Ukrainian. doi: 10.15407/frg2018.04.358
- Saenko GM, Bushneva NA. [Compatibility of fungicidal dressers of soybean with inoculants]. *Oil crops. Scientific and technical bulletin of VNIIMK*. 2018; 3(175): 124–127. Russian. doi: 10.25230/2412-608X-2018-3-175-124-127
- Tikhonovich IA. [Meaning of symbiogenetics for biological education]. *Ecological genetics*. 2007; 5 (1): 8–17. Russian. doi: 10.17816/ecogen518-17
- Alam S, Kumar A, Kumar A, Prasad S, Tiwari A, Srivastava D, Srivastava S, Tiwari P, Singh J, Mathur B. Isolation and characterization of pesticide tolerant bacteria from brinjal rhizosphere. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2018; 7:4849–4859.

15. Drouin P, Sellami M, Prevost D, Fortin J, Antoun H. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health. Part B.* 2010; 45(8):780–788. doi: 10.1080/03601234.2010.515168
16. Deshmukh VV, Raut BT, Mane SS, Ingle RW, Josh MS. Compatibility of *Bradyrhizobium japonicum* isolates with agrochemicals. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences.* 2014; 6(1):55–62.
17. Moawad H, Abd El-Rahim WM, Shawky H, Higazy AM, Daw ZY. Evidence of fungicides degradation by rhizobia. *Agricultural Sciences.* 2014; 5(7):618–624. doi: 10.4236/as.2014.57065
18. McGuinness M, Dowling D. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *Int J Environ Res Public Health.* 2009; 6(8):2226–2247. doi: 10.3390/ijerph6082226
19. Yakimenko MV, Begun SA, Sorokina AI. [Compatibility of collection strains of soybean rhizobia with fungicides and growth stimulants]. *Far East Agrarian Bulletin.* 2016; 2(38):38–41. Russian.
20. Kovalevskaya TM, Gorban VP, Nadkernichnaya EV, Bardakov AG. [The effect of fundazol and rhizotorfin on efficiency of symbiosis of nodule bacteria with lupine]. *Agricultural Microbiology.* 2005; 1–2:52–59. Ukrainian.
21. Mishra G, Kumar N, Giri K, Pandey S. In vitro interaction between fungicides and beneficial plant growth promoting *Rhizobacteria*. *Afr J Agric Res.* 2013; 8(45):5630–5633. doi: 10.5897/AJAR11.1526
22. Vozniuk SV, Tytova LV, Ratushinska OV, Iutynska GO. [Formation and functioning of symbiotic system and rhizosphere microbiocenosis of soybean under various fungicides application]. *Mikrobiol Z.* 2016; 78(4):90–101. Ukrainian.
23. Ahmed M, Elesheikh EAE, Mahdi AA. The in vitro compatibility of some *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains with fungicides. *Arr Crop Sci Conf Proc.* 2007; 8:1171–1178.
24. Kosulnikov YuV, Laktionov YuV. [Factors which influence toxicity of legume seed disinfectants towards biological based on symbiotic nitrogen fixers]. *Agricultural biology.* 2018; 53(5):1037–1044. Russian. doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1037rus
25. Kozhemyakov AP, Laktionov YuV, Popova TA, Orlova AG, Kokorina AL, Vaishlya OB, Agafonov EV, Guzhvin SA, Churakov AA, Yakovleva MT. The scientific basis for the creation of new forms of microbial biochemicals. *Agricultural biology.* 2015; 50(3):369–376. Russian. doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.369rus
26. Netrusov AI, Egorova MA, Zakharchuk LM, et al. [Practice on microbiology]. In: Netrusov AI, editor. *Moskva: Akademiya,* 2005; 608. Russian.
27. Alekseyev OO, Patyka VP, Gnatiuk TT. [The relationship between *Bradyrhizobium japonicum* and soybean bacteriosis pathogens and their sensitivity to pesticides]. *Young scientist.* 2016; 12.1(40):50–63. Ukrainian.
28. Yaschuk VU, Ivanov DV, Krivosheya RM, Tsibulnyak YuO, Koretskiy AP. [The list of pesticides and agrochemicals permitted for use in Ukraine]. *Kyiv: Yunivest Media,* 2018; 1040. Ukrainian.
29. Tokmakova LM, Tararyko YuO, Trepach AO, Lepekha O P, Larchenko IV. [The influence of modern seed protectants of agricultural crops on viability and functional activity of biological agents of microbial preparations]. *Agricultural Microbiology.* 2013; 18:120–131. Ukrainian.
30. Ahemad M, Khan MS. Productivity of green gram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. *Acta physiol plant.* 2012; 34(1):245–254. doi: 10.1007/s11738-011-0823-8

Отримано 24.12.2019