

**ВПЛИВ СТАБІЛІЗАТОРІВ НА РІСТ,  
ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ І ФУНКЦІОНАЛЬНУ  
АКТИВНІСТЬ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

**<sup>1</sup>Козар С.Ф., <sup>2</sup>Скорик В.В., <sup>1</sup>Усманова Т.О.,  
<sup>1</sup>Євтушенко Т.А.**

<sup>1</sup>Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

<sup>2</sup>Носівська селекційно-дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,  
вул. Миру, 1, с. Дослідне, Носівський район, Чернігівська обл.,  
17131, Україна  
E-mail: ismav@online.ua

*Проведено дослідження впливу окремих речовин як стабілізаторів на ріст, життєздатність, нодуляційну активність і ефективність *Bradyrhizobium japonicum*. Встановлено, що на життєздатність і функціональну активність бактерій позитивно впливає альгінат натрію в концентрації 0,2 %. У польових дослідях із соєю сорту Полтава показано, що за передпосівної бактеризації насіння брадиризовіями, культивованими з цим стабілізатором, збільшується кількість бульбочок на корінні, їх маса, азотфіксувальна активність, площа асиміляційної поверхні листя і врожайність культури.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, стабілізатор, ріст, життєздатність, нодуляційна активність, соя.

Застосування мікробних препаратів на основі бульбочкових бактерій, зокрема *Bradyrhizobium japonicum*, набуває все більшого значення в сільськогосподарському виробництві [1, 2]. У зв'язку з цим актуальним є вивчення особливостей росту брадиризовій, оскільки такі дослідження є базовими для вирішення питань отримання додаткової мікробної біомаси та продуктів метаболізму бактерій, а також для результативної інтродукції останніх у кореневу зону рослини.

При культивуванні бактерій у рідкому живильному середовищі часто спостерігається його хімічна й фізична неоднорідність: утворення та розпад мікро- і макрочастинок, осад нерозчинних сполук тощо [3]. Все це може суттєво вплинути на ріст мікроорганізмів, а також збереження їхньої життєздатності. Існує низка хімічних сполук-стабілізаторів, які при додаванні в середовище зменшують зміни фізичних і хімічних властивостей речовин при їх зберіганні або застосуванні. В основному такі стабілізатори використовують при виробництві харчових продуктів та в хімічній промисловості. Дані щодо впливу цих сполук на ріст і функціональну активність ґрунтових діазотрофів, зокрема бульбочкових бактерій сої, практично відсутні.

Виходячи з вищесказаного, метою нашої роботи було дослідити вплив добавок-стабілізаторів на ріст і збереженість бульбочкових бактерій сої та перевірити у польових дослідах функціональну активність цих діазотрофів після тривалого зберігання у рідкому середовищі.

**Матеріали і методи.** Об'єкти досліджень: штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 (отриманий з колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН), який є біоагентом мікробних препаратів Ризобофіт і Ризогумін, рекомендованих для передпосівної бактеризації сої, стабілізатори поліетиленгліколь (поліконденсовані полімери етиленгліколю), гуміарабік (природний комплекс вільних агрегатів цукрів та геміцелюлози), альгінат натрію (сіль альгінової кислоти), соя сорту Полтава.

Чисельність *B. japonicum* визначали чашковим методом шляхом глибинного висіву в агаризоване середовище на основі горохового відвару [4]. Чашки Петрі поміщали до термостату за температури  $(28,0 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ . Підрахунок колоній проводили на десяту добу. Культуру *B. japonicum*, отриману зі стабілізаторами та без них, зберігали при температурі  $(22,0 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$  до п'яти місяців. Збереженість клітин у бактеріальних суспензіях, отриманих за культивування у живильному середовищі зі стабілізаторами та без них, визначали щомісяця.

Ефективність передпосівної інокуляції насіння сої буль-

бочковими бактеріями, культивованими із стабілізаторами, вивчали в польовому досліді на базі Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН на лучно-чорноземному вилугуваному легкосуглинковому ґрунті, який містить від 2,8 % до 3,4 % гумусу (за Тюрнімом), від 0,27 % до 0,31 % загального азоту, біля 15 мг/100 г ґрунту  $P_2O_5$  (за Кірсановим), від 13 мг/100 г ґрунту до 16 мг/100 г  $K_2O$  (за Масловою),  $pH_{\text{вод}} = 5,9-6,5$ . Схема польового досліді з соєю: 1) без бактеризації – контроль; 2) бактеризація *B. japonicum* (свіжеотримана культура); 3) бактеризація *B. japonicum* із альгінатом натрію (АН) (свіжеотримана культура); 4) бактеризація *B. japonicum* (зберігання культури 4 місяці); 5) бактеризація *B. japonicum* з АН (зберігання культури 4 місяці). Розміщення ділянок у досліді рендомізоване. Повторність варіантів чотирикратна. Площа облікової ділянки становила 25 м<sup>2</sup>.

Сою сорту Полтава висівали в кінці квітня. Агротехніка вирощування сої – загальноприйнята для зони Полісся. Заплановані види аналізів проводили у фазі стеблуння, цвітіння та наливу бобів. Визначення активності азотфіксації бактерій у симбіозі проводили ацетиленовим методом [5, 6] на газовому хроматографі Chrom-4 з полум'яно-іонізаційним детектором на колонці з  $\beta$ - $\beta$ -диоксипропіонітрилом. Площу листя рослин сої, кількість та масу бульбочок на корінні визначали за загальноприйнятими методами [7].

Планування і проведення польових дослідів та облік урожаю проводили за Доспеховим [8]. Статистичну обробку експериментальних даних виконували за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0.

**Результати та обговорення.** Вивчено вплив поліетиленгліколю (ПГ), гуміарабіку (ГА) та альгінату натрію (АН) на ростову активність *B. japonicum* при глибинному культивуванні у напівсинтетичному середовищі. Виявлено, що жодна з досліджуваних добавок не стимулювала ріст ризобій. Відмічено інгібуючий вплив стабілізатора ПГ на ростову активність *B. japonicum*: при цьому виявлено зниження щільності бактеріальної популяції при збільшенні концентрації цієї добавки (рис. 1).

При додаванні стабілізатора ГА спостерігали вищу чисельність діазотрофів, але й вона була меншою відносно контролю на 33-44 %. Найбільшу щільність популяції *B. japonicum* виявлено за вмісту цього стабілізатора на рівні 0,3 % від об'єму середовища. Найвищі показники росту бульбочкових бактерій сої отримано у варіантах із АН. При додаванні 0,1 % і 0,3 % цього стабілізатора від об'єму середовища спостерігали лише тенденцію зниження чисельності бульбочкових бактерій. У варіанті з вмістом 0,5 % АН у середовищі відмічено істотне зменшення щільності популяції *B. japonicum*, а найвищу чисельність цих діазотрофів відмічено у варіанті з середовищем, яке містило 0,2 % стабілізатора.

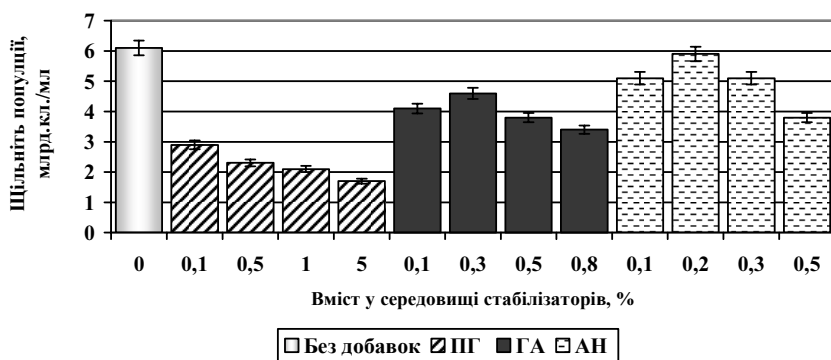


Рис. 1. Щільність популяції *B. japonicum* М-8 при глибинному вирощуванні у середовищі з додаванням стабілізаторів

На наступному етапі досліджень у динаміці протягом 2 місяців вивчали щільність популяції *B. japonicum* при зберіганні у рідкому середовищі зі стабілізаторами у визначених оптимальних концентраціях для кожного з них. Виявлено зниження цього показника в усіх варіантах, як із стабілізаторами, так і без них (рис. 2). При цьому в контролі зниження чисельності бульбочкових бактерій відбувалось інтенсивніше. Так, не зважаючи на те, що в середовищі без стабілізаторів вихідна чисельність життєздатних клітин ризобій була вищою, через 2 місяці вона не перевищувала 1 млрд кл./мл середовища. У варіантах зі стабілізаторами, крім ПГ з процентним вмістом 1 % і 5 %, щільність популяції була більше

1 млрд клітин на мл. Найвищим цей показник був через 2 місяці у варіанті з 0,2 % АН – у 11,5 раза більше в порівнянні з контролем.

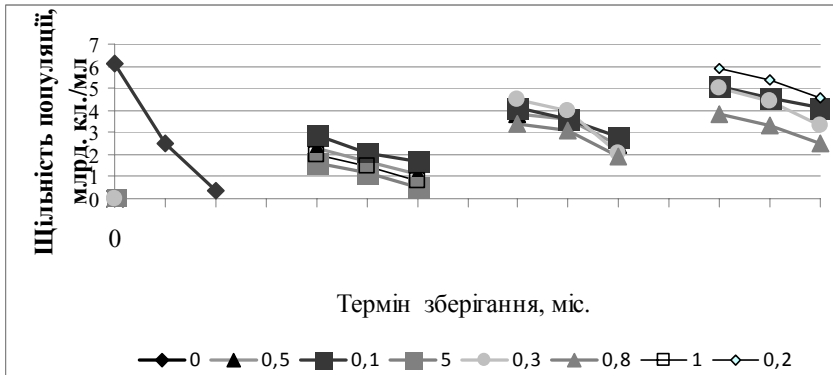


Рис. 2. Щільність популяції *V. japonicum* М-8 при зберіганні у рідкому середовищі зі стабілізаторами

Вищенаведені дані свідчать про доцільність використання АН у технології виробництва мікробних препаратів для сої на основі *V. japonicum*, оскільки даний стабілізатор сприяє подовженню терміну зберігання бактеріальної культури. Саме тому подальші роботи проводили з АН у концентрації 0,2 %.

У дослідно-промислових умовах нами відпрацьовано технологію культивування *V. japonicum* у реакторі біологічному БИОР-0,25. У результаті досягнуто титру ризобій, культивованих із альгінатом натрію, на рівні 4,0 млрд кл./мл. В подальших дослідженнях перевіряли життєздатність цих бактерій протягом п'яти місяців. Встановлено, що навіть через чотири місяці зберігання культура *V. japonicum* є придатною для передпосівної бактеризації сої, оскільки титр становив 2,1 млрд кл./мл (рис. 3). Слід зазначити, що титр бульбочкових бактерій сої, культивованих без альгінату натрію, вже через 2 місяці був нижче 1,0 млрд кл./мл.

Вплив АН на нодуляційну активність і ефективність *V. japonicum* вивчали в польових дослідах протягом 2008–2010 рр. Результати досліджень впливу бактеризації на утворення бульбочок на коренях рослин сої свідчать про те, що у фазу стеблуння найбільша їх кількість сформувалась у варіантах із бактеризацією *V. japonicum*, культивованих із АН (табл. 1), у фазу

цвітіння – у варіанті з бактеризацією свіжеотриманою культурою ризобій, вирощеною без стабілізатора (але цей показник істотно не відрізнявся від варіантів з АН), у фазу наливу бобів – у варіанті з бульбочковими бактеріями, культивованими з АН (зберігання 4 місяці).

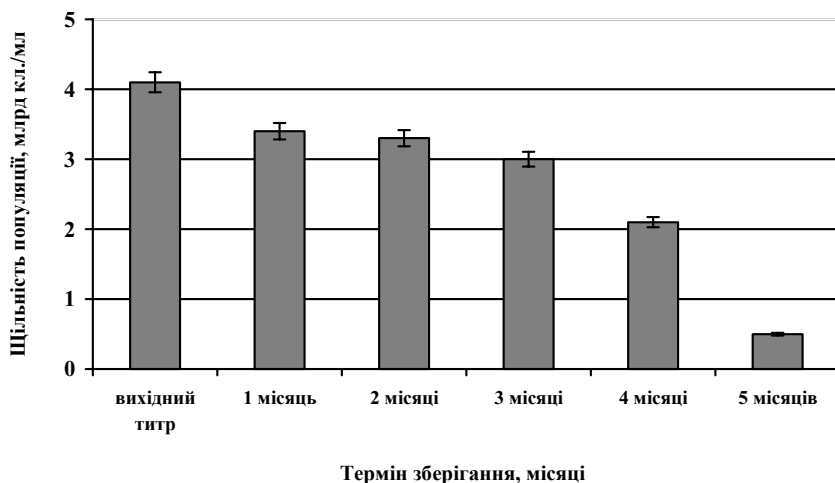


Рис. 3. Щільність популяції *B. japonicum* М-8 при зберіганні у рідкому середовищі з альгінатом натрію

Маса бульбочок у фази стеблуння, цвітіння і наливу бобів була найвищою у варіанті з бактеризацією свіжеотриманою культурою *B. japonicum*, вирощеною за додавання АН. У всі фази розвитку рослин варіант із бактеризацією бульбочковими бактеріями через 4 місяці їх зберігання не поступався за кількістю утворених бульбочок ефекту свіжеотриманої культури без стабілізатора (табл. 2).

У польових дослідах протягом трьох років вивчали нітрогеназну активність досліджуваних діазотрофів. Найвищу активність азотфіксації бульбочкових бактерій сої у симбіозі з рослиною виявлено у фазу цвітіння (рис. 4). У всі фази розвитку сої нітрогеназна активність рослин бактеризованих ризобіями, культивованими з АН, навіть через 4 місяці зберігання, була вищою, не тільки відносно контролю, але й у порівнянні з іншими варіантами з бактеризацією (хоча висока активність азотфіксації

спостерігається також і у варіантах зі свіжеотриманою культурою *V. jaronicum*).

**Таблиця 1. Вплив бактеризації на кількість бульбочок на коренях рослин сої сорту Полтава, од./рослину**

Варіанти дослідів	2008 р.			2009 р.			2010 р.			Середнє		
	фази вегетації рослин											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Без бактеризації – контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бактеризація <i>V. jaronicum</i> (свіжеотримана культура)	6,1	62,7	70,0	2,2	53,0	53,1	8,8	64,7	91,3	5,7	60,1	71,5
Бактеризація <i>V. jaronicum</i> із АН (свіжеотримана культура)	10,8	60,7	63,4	2,3	63,1	67,0	7,8	74,5	111,5	7,0	66,1	80,6
Бактеризація <i>V. jaronicum</i> (зберігання 4 місяці)	2,8	20,5	22,6	1,1	45,7	46,1	4,6	59,6	60,6	2,8	41,9	43,1
Бактеризація <i>V. jaronicum</i> із АН (зберігання 4 місяці)	9,3	60,0	82,5	3,0	55,4	59,5	8,3	86,2	95,3	6,9	67,2	79,1
НІР <sub>05</sub>	1,07	2,57	6,93	0,99	4,10	7,12	1,7	8,3	9,0			

Примітка: 1 – фаза стеблуння; 2 – фаза цвітіння; 3 – фаза наливу бобів.

Виявлено, що у варіанті бактеризації насіння сої *V. jaronicum*, культивованим із АН, показник кількості листків на рослині достовірно перевищував контроль (рис. 5). У результаті визначення площі асиміляційної поверхні листя рослин сої відмічено істотне збільшення цього показника в усіх варіантах у порівнянні з контролем (рис. 5). Слід відмітити, що за передпосівної бактеризації насіння сої брадиризобіями, культивованими з АН (як свіжеотри-

мана культура, так і після чотирьох місяців її зберігання), відмічено тенденцію збільшення площі асиміляційної поверхні листя рослин у порівнянні з варіантами, в яких насіння було оброблене бактеріями, культивованими без стабілізаторів.

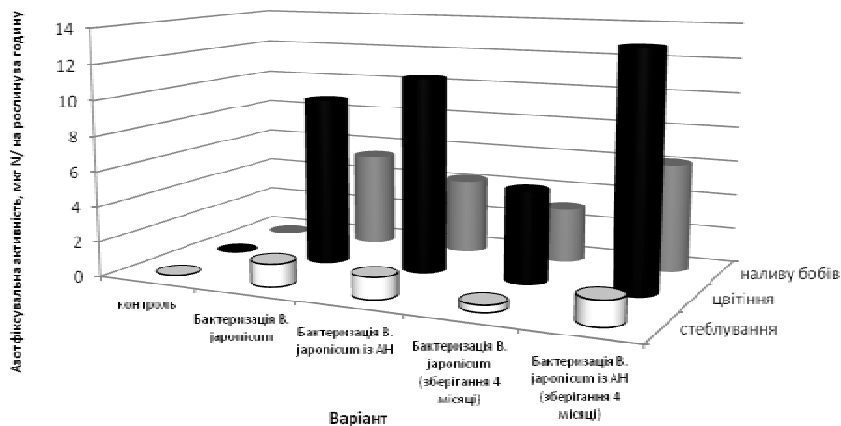


Рис. 4. Нітрогеназна активність бульбочкових бактерій у симбіозі з соєю, 2008-2010 рр

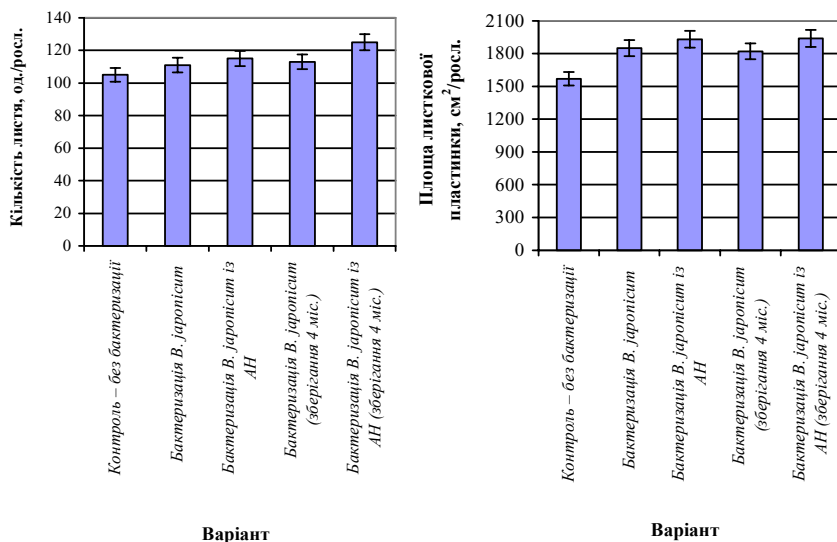


Рис. 5. Вплив бактеризації на кількість листя сої і площу їх асиміляційної поверхні



Таблиця 2. Вплив бактеризації на масу бульбочок на коренях рослин сої сорту Полтава, мг/рослину

Варіанти дослідів	2008 р.			2009 р.			2010 р.			Середнє		
	фази вегетації рослин									1	2	3
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Без бактеризації – контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бактеризація <i>B. japonicum</i> (свіжеотримана культура)	113,4	831,7	2086,7	385,0	772,0	7193,0	375,0	3247,0	11255,0	291,1	1616,9	6844,9
Бактеризація <i>B. japonicum</i> із АН (свіжеотримана культура)	190,3	698,3	1748,3	531,0	1320,0	7780,0	225,0	3762,5	9332,5	315,4	1926,9	6286,9
Бактеризація <i>B. japonicum</i> (зберігання 4 місяці)	82,4	186,7	1010,8	275,0	494,0	6491,0	120,0	1865,0	5097,5	159,1	848,6	4199,8
Бактеризація <i>B. japonicum</i> із АН (зберігання 4 місяці)	197,3	759,2	2354,2	450,0	683,0	7235,0	217,5	3880,0	11852,7	288,3	1774,1	7147,3
НІР <sub>05</sub>	41,4	96,3	601,0	101,7	138,4	308,2	97,4	212,0	706,8			

Примітка: 1 – фаза стеблуння; 2 – фаза цвітіння; 3 – фаза наливу бобів

Проведені нами дослідження свідчать про позитивний вплив передпосівної обробки насіння на врожайність культури. Так, бактеризація насіння культурою *V. jarrowicum* зі стабілізатором сприяла збільшенню врожайності рослин не менше, ніж на 33 % (рис. 6).

Не виявлено істотної різниці щодо контролю у варіанті з бактеризацією бульбочковими бактеріями, вирощеними без АН (зберігання 4 місяці).

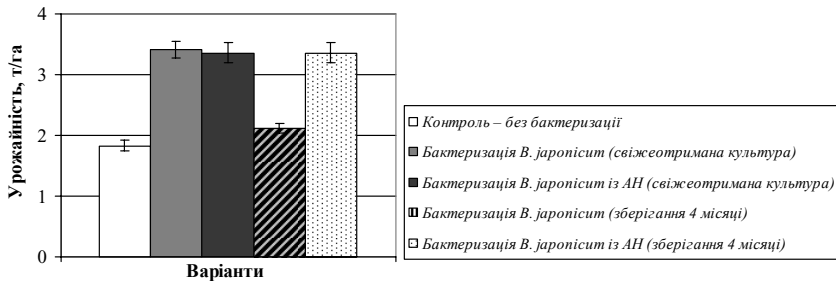


Рис. 6. Вплив передпосівної бактеризації на урожайність сої сорту Полтава, польові дослідження 2008–2010 рр

Таким чином, у результаті проведених досліджень не виявлено позитивного впливу стабілізаторів на ріст *V. jarrowicum*. Проте, при збереженні культури ризобій титр бактерій, вирощених зі стабілізаторами, зменшувався повільніше, що свідчить про доцільність використання даних сполук для подовження терміну зберігання культури *V. jarrowicum*.

За результатами досліджень підібрано стабілізатор та його оптимальну концентрацію, яка сприяє підтриманню життєздатності і функціональної активності бульбочкових бактерій сої у рідкому середовищі протягом 4 місяців. Показано, що передпосівна бактеризація насіння сої *V. jarrowicum*, культивованими з альгінатом натрію забезпечує утворення найбільшої кількості бульбочок на коренях рослин і, відповідно, найвищу нітрогеназну активність, а також сприяє збільшенню асиміляційної площі листків. За використання для інокуляції бактерій, культивованих з альгінатом натрію після зберігання інокулянту протягом чотирьох місяців, урожайність сої сорту Полтава знаходилася на рівні показників,

отриманих за використання свіжеотриманої бактеріальної культури.

1. Біологічний азот // [Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.]; за ред. В.П. Патики. – К. : СВІТ, 2003. – 422 с.

2. Експериментальна ґрунтова мікробіологія / [В.В. Волкогон, О.В. Наджернична та ін.]; за наук. ред. В.В. Волкогона. – К. : Аграрна наука, 2010. – 464 с.

3. Виестур У.Е. Культивирование микроорганизмов / У.Е. Виестур, М.Ж. Кристаксонс, Е.С. Былинкина. – Л. : Пищевая промышленность, 1980. – 231 с.

4. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии / Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзьева Г.И.; ред. В.К. Шильниковой. – [6-е изд. перераб. и доп.]. – М. : Дрофа, 2005. – 256 с.

5. Умаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М.М. Умаров // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.

6. Hardy R.W.F. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation / Hardy R.W.F., Hotsren R.D., Jackson E.K., Burns R.C. // Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, № 8. – P. 1185–1207.

7. Большой практикум по физиологии растений / [Чернавина И.А., Потапов Н.Г., Косулина Л.Г., Кренделева Т.Е.]; ред. Б.А. Рубина. – М. : Высш. школа, 1978. – 408 с.

8. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М. : Колос, 1985. – 376 с.

## **ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗАТОРОВ НА РОСТ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

**<sup>1</sup>Козар С.Ф., <sup>2</sup>Скорик В.В., <sup>1</sup>Усманова Т.О.,  
<sup>1</sup>Евтушенко Т.А.**

<sup>1</sup>Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов  
<sup>2</sup>Носовская селекционно-опытная станция  
Института сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН

*Проведены исследования влияния отдельных веществ как стабилизаторов на рост, жизнеспособность, нодуляционную активность и эффективность *Bradyrhizobium japonicum*. На жизнеспособность и функциональную активность бактерий положительно влияет альгинат натрия в концентрации 0,2 %. В полевых опытах с соей сорта Полтава показано, что применение для предпосевной бактеризации семян брадиризовий, культивированных с этим стабилизатором, увеличивается количество клубеньков на корнях, их масса, азотфиксирующая активность, площадь ассимиляционной поверхности листьев и урожайность культуры.*

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, стабилизатор, рост, жизнеспособность, нодуляционная активность, соя.

# **THE INFLUENCE OF STABILIZATORS ON THE GROWTH, VIABILITY AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

**<sup>1</sup>Kozar S.F., <sup>2</sup>Skorik V.V., <sup>1</sup>Usmanova T.O., <sup>1</sup>Evtushenko T.A.**

<sup>1</sup>Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

<sup>2</sup>Nosivka Breeding Research Station of Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS

*The research of stabilizators influence on the growth, viability, nodulation activity and efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* was conducted. It was found, that sodium alginate in a concentration of 0,2 % has a positive influence on a growth and functional activity of rhizobia. It was established in field experiments with soybean of Poltava cultivar that presowing seed bacterization with *Bradyrhizobium japonicum*, that were cultivated with given stabilizator, the area of assimilatory surface of leaves, number of nodules, their mass and nitrogen-fixing activity as well as plants productivity, were increasing.*

*Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, stabilizator, growth, viability, nodulation activity, soybean.*