

УДК 581.1:58.557:581.133.1:631.847.1

## РЕАКЦІЯ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У ЧИСТІЙ КУЛЬТУРІ ТА У СИМБІОТИЧНИХ СИСТЕМАХ НА ЗАСТОСУВАННЯ НАНОКАРБОКСИЛАТІВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ

С. Я. Коць, Л. І. Рибаченко, П. П. Пухтаєвич, О. Р. Рибаченко

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

**Мета.** Дослідити вплив різних концентрацій нанокарбоксилатів германію, молібдену, ванадію, кобальту, заліза, міді та цинку на динаміку росту бульбочкових бактерій, відібрати найбільш ефективні з них для вивчення їхньої ролі як компонентів живильного середовища для вирощування ризобій та фактору оптимізації формування і функціонування симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum*. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, спектрофотометрія, газова хроматографія. **Результати.** Виявлено, що додавання більшості досліджуваних мікроелементів до середовища вирощування ризобій мало позитивний ефект на динаміку росту бактеріальної культури. Виключенням був нанокарбоксилат цинку, внесення якого в середовище культивування суттєво знижувало приріст біомаси бактерій. Водночас, незалежно від концентрації, найбільшим стимулювальним впливом на динаміку росту ризобій в умовах чистої культури характеризувалися нанокарбоксилати заліза, германію і молібдену. Максимальна їх дія проявлялася за концентрації 1 : 1000. Дані сполуки є перспективними за додавання у середовище культивування бульбочкових бактерій та для вивчення їх впливу на процеси формування і функціонування бобово-ризобіальних симбіотичних систем. Аналіз результатів вегетаційних дослідів показав, що використання нанокарбоксилатів заліза, германію і молібдену як компонентів середовища вирощування ризобій у концентрації 1 : 1000 позитивно впливало на процеси формування та функціонування симбіотичних систем, сформованих за участі різних за активністю штамів *Bradyrhizobium japonicum* — 634б та 604к, а також на наростання вегетативної маси рослин сої. За такої умови найбільш ефективним був нанокарбоксилат германію. **Висновки.** Експериментально доведено перспективність використання активного штаму *Bradyrhizobium japonicum* 634б у поєднанні з нанокарбоксилатом германію при вирощуванні сої для підвищення ефективності симбіотичних систем.

**Ключові слова:** *Bradyrhizobium japonicum*, бобово-ризобіальний симбіоз, азотфіксувальна активність, нанокарбоксилати мікроелементів.

**Вступ.** Інокуляція насіння сої бульбочковими бактеріями є невід’ємним прийомом технологій її вирощування. Застосування бактеріальних добрив дозволяє покращувати умови азотного живлення цієї культури, підвищувати її врожайність, збільшувати вміст білка в насінні, знижувати кількість мінеральних азотних добрив. Отже, застосування мікробних препаратів є екологічно та економічно вигідним заходом у технологіях вирощування сої. За такої умови значною мірою вирішується питання фіксації атмосферного азоту і додаткового його надходження в агроценози. Слід зазначити, що в результаті

діяльності симбіотичних систем щороку з атмосфери засвоюється від 60 до більш як 300 кг азоту на гектар. Цей азот не забруднює довкілля і не потребує значних енергетичних затрат на виробництво [1; 2]. Про значущість процесу біологічної азотфіксації свідчить і той факт, що у світовій практиці сільського господарства щороку в ґрунт із мінеральними добривами вносять 35 млн т азоту, притому, що за цей же час рослини засвоюють приблизно 75 млн т цього елемента. Різницю між зазначеними величинами компенсує діяльність мікробів-азотфіксаторів, насамперед бульбочкових бактерій, що

трансформують молекулярний азот у легкозасвоювані для рослини форми [1]. Взаємодія бобових рослин із симбіотичними і корисними ризосферними мікроорганізмами дозволяє не лише забезпечувати потреби доступними формами азоту, а також і фітогормонами, амінокислотами, водночас захищаючи їх від патогенних мікроорганізмів [3].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Слід враховувати, що важливою передумовою ефективної азотфіксації є забезпечення бобових мікроелементами. Відомо, що вони впливають на перебіг біохімічних реакцій у рослинному організмі за рахунок впливу на біоколоїди, здатні посилювати регенерацію тканин та ін. [4]. За нестачі мікроелементів у ґрунті засвоювання рослинами азотних, фосфорних та калійних добрив знижується на 10–12 % і більше [5]. Їх дефіцит збільшує ризик ураження хворобами, призводить до зниження врожайності та погіршення якості продукції [6; 7].

Мікроелементи відіграють важливу роль у процесах дихання, живлення, розмноження бульбочкових бактерій, беруть участь у синтезі низки ферментів бактеріальної клітини та активують їх. Вони впливають як на вільноживучі, так і на симбіотичні форми ризобій, підтримуючи каскад складних перетворень та взаємодій. Ці елементи додають у середовище культивування ризобій у мінімальних кількостях, де вони виконують роль активаторів росту чи каталізаторів, які здатні активувати головні ферментативні системи мікроорганізмів: дихання, каталазу і дегідрогеназу активності та ін. [2; 8].

За останні два десятиріччя особливого значення як джерело мікроелементів набули хелатні, тобто органічні форми, у яких мікроелемент (здебільшого метал) зв'язаний із хелатуючим агентом (здебільшого органічною кислотою). Мікроелементи у таких формах не поглинаються ґрунтом, проте засвоюються рослинами і мають кращий ефект, ніж їх мінеральні сполуки. Ефективність хелатів у 10–15 разів вища, ніж відповідних сульфатів мікроелементів [9]. Відомо, що суспензіями порошків металів у нанорозмірах проводять передпосівну обробку насіння. Збільшення врожаю в результаті застосування такого прийому становить 20–35 % [10–12]. Одночасно відзначається підвищення адаптації рослин до стресових умов і поліп-

шення якості сільськогосподарської продукції. Наночастинки впливають на біологічні об'єкти на клітинному рівні, підвищуючи ефективність протікання біохімічних процесів у рослинах, а також беруть участь у формуванні мікроелементного балансу, тобто є біоактивними [13].

Сьогодні перспективним є комбінування мікродобрив із бактеріальними препаратами для передпосівної обробки насіння. Таке поєднання дозволить активізувати розвиток ризобій, підвищити стійкість рослин проти хвороб грибової та бактеріальної етіології, несприятливих кліматичних умов, посилити активність фіксації азоту з повітря та запобігти появі дефіциту мікроелементів.

З огляду на вищесказане особливої актуальності набуває питання оптимізації бактеріальних препаратів, як за складом мікроелементів, так і за їх вмістом, що повною мірою забезпечувало б потреби як рослинного, так і мікробного організмів, у такий спосіб сприяючи підвищенню ефективності бобово-ризобіального симбіозу, а відтак і зростанню врожайності сої.

**Мета досліджень.** Дослідити вплив різних концентрацій нанокарбоксилатів металів на динаміку росту бульбочкових бактерій у живильному середовищі та на формування і функціонування симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum*.

**Матеріали та методи досліджень.** Об'єктами досліджень були чисті культури бульбочкових бактерій високоактивного виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 634б, а також процеси формування і функціонування симбіотичних систем, створених за участю рослин сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Васильківська (селекція Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства і сортовивчення НААН, Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Інституту землеробства НААН) і бульбочкових бактерій *B. japonicum* 634б (активний штам) та 604к (не активний штам) з колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації ІФРГ НАН України.

Культуру повільнорослих бульбочкових ризобій вирощували при 26–28 °С на манітно-дріжджовому середовищі такого складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5,  $\text{MgSO}_4$  — 0,2,  $\text{NaCl}$  — 0,1, дріжджовий екстракт — 1,0, маніт — 10,0 [14].

Для дослідження впливу різних концентрацій нанокарбоксилатів металів на динаміку росту бактерій у манітно-дріжджове середовище вносили хелатовані метали: германій, молібден, ванадій, кобальт, залізо, мідь, цинк. Хелатором виступала лимонна кислота. Використані нами препарати мікроелементів люб'язно надані ТОВ «АВАТАР» (Україна, м. Київ). Розчини мікроелементів використовували у розведенні 1 : 500 та 1 : 1000. Контроль у даному досліді — культивовані на манітно-дріжджовому середовищі без додатково внесених речовин *V. japonicum* 634б. Стерилізацію внесених сполук і живильного середовища здійснювали окремо. Після додавання карбоксилатів мікроелементів у середовище, його перевіряли на наявність спонтанної контамінації шляхом висіву на м'ясопептоний агар. Визначення кількості мікроорганізмів (за показником оптичної густини) проводили за використання стандартної методики із залученням спектрофотометра BIORAD SmartSpecPlus (США) за довжини хвилі 600 нм. Вимірювання оптичної густини проводили на третю та четверту доби культивування.

Для дослідження впливу нанокарбоксилатів мікроелементів на процеси формування і функціонування симбіотичних систем соя – *V. japonicum*, згідно із розробленою схемою досліді у середовище культивування ризобій вносили хелатовані елементи молібден, залізо, германій у розведенні 1 : 1000.

Культивування бактерій здійснювали методом періодичного інкубування на кругових качалках у колбах Ерленмейера, що містили 200 мл живильного середовища із швидкістю обертання качалки 220 об./хв. Чисельність ризобій у суспензії, що вносились, становила  $10^8$  клітин/мл.

Насіння перед посівом стерилізували 70 %-ним розчином етанолу і промивали проточною водою. Інокуляцію проводили протягом 1 години. Схема досліді передбачала такі варіанти: насіння + *V. japonicum* 634б (контроль 1); насіння + *V. japonicum* 634б + Мо; насіння + *V. japonicum* 634б + Fe; насіння + *V. japonicum* 634б + Ge; насіння + *V. japonicum* 604к (контроль 2); насіння + *V. japonicum* 604к + Мо; насіння + *V. japonicum* 604к + Fe; насіння + *V. japonicum* 604к + Ge.

Дослідження проводили на вегетаційному майданчику ІФРГ НАН України. Рослини вирощували у 4-кілограмових посудинах у піщаній культурі із внесенням поживної суміші Гельрігеля з 0,25 норми азоту за природного освітлення та оптимального (60 % ПВ) водозабезпечення.

Відбори зразків для аналізу здійснювали у фази: трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння. Визначали нодуляційну активність ризобій за кількістю бульбочок на коренях рослин та масу сформованих бульбочок. Вимірювання азотфіксувальної активності (АФА) кореневих бульбочок проводили ацетиленовим методом [15]. Ростові показники рослин сої оцінювали за надземною масою та масою кореня.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили згідно зі стандартною методикою [16] та з використанням програми Microsoft Excel 2010.

**Результати та їх обговорення.** За результатами проведених досліджень показано, що більшість використаних нанокарбоксилатів мікроелементів, незалежно від їх концентрації, виявляли стимулювальний вплив на ріст бактеріальної культури (табл. 1). Інгибуючий ефект на приріст біомаси клітин *V. japonicum* 634б спостерігали лише за додавання в середовище росту нанокарбоксилату цинку. При цьому можна прослідкувати чітку закономірність у впливі різних концентрацій цього мікроелементу. Негативна дія нанокарбоксилату цинку була прямо пропорційною його вмісту в середовищі культивування. Чим вищою була його концентрація, тим сильніше він пригнічував наростання біомаси бактерій.

Відомо, що за відношенням до цинку соя належить до середньочутливих культур, його значення для росту рослин тісно пов'язане з участю в різноманітних метаболічних процесах у складі Zn-вмісних ферментів і білків. Білки, так звані «цинкові пальці», необхідні рослинам для захисту від стресових впливів. Даний елемент також позитивно впливає на посухостійкість рослин. Оскільки цей елемент є одним із важливих мікроелементів, що забезпечують функціонування бобово-ризобіальних структур [6; 17], можна припустити, що така негативна його дія на мікроорганізми в чистій культурі нівелюється за формування ними симбіотичних утворень. Імо-

Таблиця 1. Вплив нанокарбоксилатів мікроелементів на ріст *V. jirovecii* 6346

Нанокарбоксилати мікроелементів	Чисельність бактеріальних клітин											
	за концентрації нанокарбоксилатів металів 1 : 1000						за концентрації нанокарбоксилатів металів 1 : 500					
	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (третя доба культивування)	% до контролю	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (четверта доба культивування)	% до контролю	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (третя доба культивування)	% до контролю	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (четверта доба культивування)	% до контролю	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (третя доба культивування)	% до контролю	кл. × 10 <sup>8</sup> /мл, (четверта доба культивування)	% до контролю
Контроль	3,99 ± 0,01	–	6,84 ± 0,07	–	3,99 ± 0,01	–	6,84 ± 0,07	–	3,99 ± 0,01	–	6,84 ± 0,07	–
Mo	4,65 ± 0,14	+17	8,42 ± 0,27	+24	4,55 ± 0,40	+14	8,33 ± 0,41	+14	4,55 ± 0,40	+14	8,33 ± 0,41	+22
V	4,40 ± 0,31	+10	7,78 ± 0,4	+14	4,42 ± 0,26	+11	7,99 ± 0,52	+11	4,42 ± 0,26	+11	7,99 ± 0,52	+17
Zn	2,76 ± 0,07	–31	4,70 ± 0,38	–31	2,29 ± 0,13	–43	3,85 ± 0,08	–43	2,29 ± 0,13	–43	3,85 ± 0,08	–44
Co	4,51 ± 0,09	+13	8,30 ± 0,16	+21	4,48 ± 0,18	+12	8,16 ± 0,37	+12	4,48 ± 0,18	+12	8,16 ± 0,37	+19
Fe	5,43 ± 0,23	+36	10,55 ± 0,63	+54	4,48 ± 0,20	+12	9,49 ± 0,50	+12	4,48 ± 0,20	+12	9,49 ± 0,50	+39
Cu	4,80 ± 0,05	+20	8,37 ± 0,63	+22	4,39 ± 0,48	+10	8,18 ± 0,60	+10	4,39 ± 0,48	+10	8,18 ± 0,60	+20
Ge	5,84 ± 1,06	+46	9,52 ± 0,96	+39	4,79 ± 0,32	+20	8,26 ± 0,54	+20	4,79 ± 0,32	+20	8,26 ± 0,54	+21
НІР <sub>0,5</sub>		8		11		9		9		9		12

вірно, організм рослини-хазяїна забезпечує протекторну дію бактеріодам до високих доз цього мікроелемента. Групою індійських вчених із кореневих бульбочок *Trifolium alexandrinum* було виділено бактерії *Rhizobium* sp., які здатні витримувати високі концентрації цього мікроелемента [18]. Слід зазначити, що всі толерантні до сполук цинку ізоляти вирізнялися здатністю до синтезу великої кількості екзополісахаридів. Використані нами в досліді бульбочкові бактерії *B. japonicum* 634б, на відміну від виділених індійськими вченими *Rhizobium* sp., є повільнорослими та, відповідно, повільніше синтезують екзополісахариди, що, ймовірно, не дає їм змоги краще переносити вплив цинку, навіть у хелатованій його формі.

Як вже зазначалося вище, всі залучені до досліді мікроелементи, окрім цинку, мали позитивний вплив на приріст біомаси *B. japonicum* 634б. Проте найбільший стимулювальний ефект відзначено за впливу нанокарбоксилатів заліза та германію. Водночас показано, що найбільший приріст біомаси досягається за застосування меншої дози нанокарбоксилатів цих хімічних елементів (див. табл. 1).

Ключовим мікроелементом для активного функціонування бобово-ризобіального симбіозу, який забезпечує дію ферментів симбіотичної азотфіксації, є молібден [19]. Наявні літературні дані досить суперечливі стосовно впливу цього мікроелемента на ризобії та подальше утворення симбіозу. Так, наприклад, Ю. Альбіно і Р. Кампо встановили, що сполуки молібдену зменшують виживання бактерій *Bradyrhizobium* та негативно впливають на утворення бульбочок і процес асиміляції N<sub>2</sub> [20]. Водночас групою інших учених отримано абсолютно протилежні дані [21]. Результати наших досліджень щодо впливу молібдену на ріст *B. japonicum* 634б показали, що наявність його у середовищі культивування ризобій сприяла кращому росту даних мікроорганізмів (див. табл. 1). Проте ефект від застосування молібдену був слабшим, аніж за використання нанокарбоксилатів заліза та германію.

Внесення у середовище культивування мікроорганізмів нанокарбоксилатів ванадію, кобальту та міді мало незначний стимулювальний ефект на ріст *B. japonicum* 634б.

Отже, виявлено, що найбільший позити-

вний вплив на ріст бактерій здійснювали нанокарбоксилати заліза, германію та молібдену. Ці сполуки, на нашу думку, можуть бути перспективними за умови додавання у середовище культивування бульбочкових бактерій у концентрації 1 : 1000 для отримання інокулюму, здатного оптимізувати формування і функціонування бобово-ризобіальних симбіотичних систем. Враховуючи вищезазначене, нами проведено визначення ефективності ініційованих нанокарбоксилатами ризобій в умовах вегетаційного досліді.

Оцінка впливу нанокарбоксилатів заліза, германію та молібдену на азотфіксувальну активність соєво-ризобіальних систем показала, що усі досліджувані нами мікроелементи (Mo, Fe, Ge) сприяли підвищенню цього показника у порівнянні з рослинами сої контрольного варіанту 1 протягом усього вегетаційного періоду. Такий позитивний ефект від застосування нанокарбоксилатів мікроелементів може бути пов'язаним з модифікацією метаболізму бактеріальних клітин, що й обумовило посилення азотфіксувальної активності корневих бульбочок. Адже наночастинки є біоактивними, тобто впливають на біологічні об'єкти на клітинному рівні, підвищуючи ефективність протікання біохімічних процесів у живих організмах та беруть участь у формуванні мікроелементного балансу [11–13; 22]. Окрім цього, частина нанокарбоксилатів металів разом із бактеріальною суспензією потрапила на насіння сої, а тому мала місце і стимуляція безпосередньо рослини. Відомо, що наночастинки, беручи участь у процесах переносу електронів, посилюють дію ферментів, інтенсифікують дихання клітин, фотосинтез, синтез ферментів та амінокислот, вуглеводний і азотний обмін і, як наслідок, безпосередньо впливають на мінеральне живлення рослин [23]. Не менш важливу роль може відігравати і забезпечення рослин необхідними для їх розвитку мікроелементами. Оскільки мікроелементи у наноформі засвоюються поступово, їх іонні форми швидко включаються в біохімічні реакції. Отже, може досягатися пролонгований ефект живлення рослин [13].

У фазі трьох справжніх листків максимальним зростанням (на 42 %) АФА характеризувалися рослини варіанту із застосуванням нанокарбоксилату заліза, що цілком закономірно з огляду на те, що залізо бере

участь у відновленні молекулярного азоту і нітратів до аміаку. Як компонент ферредоксину (Fe-S-кластера) цей елемент включається в роботу азотфіксуючого комплексу нітрогенази та нітратредуктази [24]. Інокуляція ризобіями, вирощеними на середовищі з молібденом та германієм, сприяла збільшенню АФА, порівнюючи з рослинами контролю на 29 та 33 % відповідно (рис. 1). Як відомо, завдяки молібдену підвищується життєдіяльність бульбочкових бактерій та інтенсифікується фіксація атмосферного азоту. Очевидно стимулювальний вплив цього елемента на АФА пов'язаний із тим, що він входить до складу азотфіксуючого ферментного комплексу — нітрогенази. Поряд із залізом молібден є посередником при перенесенні електронів в окислювально-відновних ферментних реакціях. До того ж він стимулює ріст коренів у рослин сої. За такої умови найбільш ефективною і економічно вигідною є саме передпосівна обробка насіння молібденом [7; 19; 25].

Симбіотичні системи, що зазнали впливу нанокарбоксилату германію, відзначалися суттєвим зростанням АФА і у фазу бутонізації. Азотфіксуюча активність бульбочок, сформованих на коренях рослин цього варіанту, перевищувала контрольні (контроль 1) на 76 % (рис. 1). Можливо, такий ефект від використання германію пов'язаний із його антиоксидантними та антигіпоксантними

властивостями [26]. Застосування нанокарбоксилату заліза як компонента середовища культивування ризобій сприяло збільшенню досліджуваного показника на 27 % проти контролю. У варіанті з використанням молібдену відзначено лише тенденцію до зростання азотфіксуючої активності.

У фазу цвітіння нами зафіксовано різке зниження азотфіксуючої активності відносно попередніх фаз розвитку рослин в усіх досліджуваних варіантах. На нашу думку, до такого негативного ефекту призвело аномальне підвищення температури повітря, яке збіглося з даною фазою розвитку рослин. Водночас навіть за таких стресових умов рослини у варіантах із застосуванням нанокарбоксилатів металів характеризувалися вищими показниками АФА щодо рослин контролю 1. Так, симбіотичні системи, що зазнали впливу нанокарбоксилату молібдену, перевищували контрольні на 36 %, за використання нанокарбоксилату заліза — 21 % та нанокарбоксилату германію — 40 %.

У симбіотичних системах, утворених за участю неактивного штаму ризобій 604к, азотфіксуюча активність була відсутня в усі досліджені фази розвитку рослин сої.

Аналіз нодуляційної активності ризобій активного штаму дозволив виявити, що лише нанокарбоксилат германію стимулював процеси бульбочкоутворення на коренях сої протягом усього вегетаційного періоду. Зок-

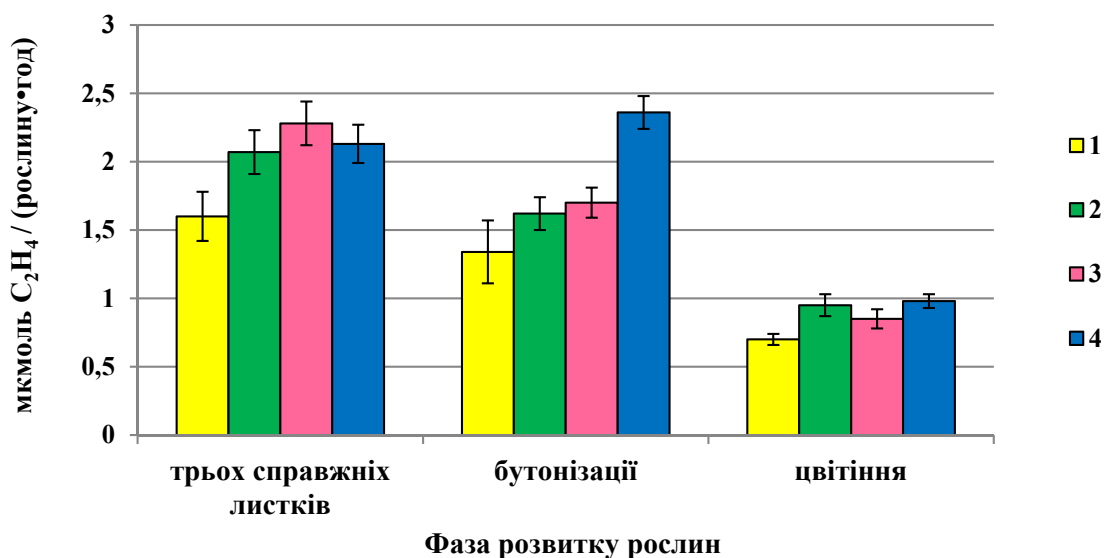


Рис. 1. Вплив карбоксилатів Mo, Fe, Ge на азотфіксуючу активність (АФА) корневих бульбочок сої, інокульованої *V. japonicum* 634б.

Примітка: 1 — *V. japonicum* 634б (контроль 1); 2 — *V. japonicum* 634б + Mo; 3 — *V. japonicum* 634б + Fe; 4 — *V. japonicum* 634б + Ge.

рема, за кількістю та масою сформованих корневих бульбочок рослини цього варіанту перевищували контрольні (К. 1) у фазу трьох справжніх листків на 38 та 28 %, у фазу бутонізації — на 50 та 28 %, у фазу цвітіння — на 33 та 14 % відповідно (рис. 2).

Відомо, що залізо бере участь у формуванні леггемоглобіну у корневих бульбочках, а його нестача уповільнює їх закладання і розвиток [27]. Наші дослідження показали, що поєднання ризобій із нанокарбоксилатом заліза сприяло зростанню досліджуваних показників у рослин сої відносно контрольних (контроль 1) лише у фазу трьох справжніх листків, а саме: кількість бульбочок на 40 % та їх маса на 34 % (рис. 2). У фазах бутонізації та цвітіння нодуляційна активність ризобій була на рівні рослин контрольного варіанту 1.

Що стосується варіантів, де насіння інокулювали *V. jarrowii* 634б, вирощеними на середовищі з додаванням нанокарбоксилату молібдену, то всі зміни кількості та маси корневих бульбочок були в межах похибки, за винятком маси бульбочок у фазу бутонізації, яка зросла на 24 % проти рослин контролю 1.

Оцінка нодуляційної активності ризобій неактивного штаму 604к показала, що використання нанокарбоксилату молібдену підвищувало кількість (45 %) та масу (54 %) ко-

рневих бульбочок у рослин сої проти рослин контролю 2 у фазу трьох справжніх листків і не впливало на ці показники у фазу бутонізації (рис. 2). У фазу цвітіння ці сполуки викликали зниження кількості бульбочок на 29 % проти з показників контролю.

Застосування нанокарбоксилату заліза сприяло збільшенню кількості та маси корневих бульбочок у фазу трьох справжніх листків порівняно з рослинами сої контролю 2 на 35 і 46 % відповідно. У фазу бутонізації у рослин цього варіанту зафіксовано зниження кількості (13 %) та маси (46 %) бульбочок щодо того ж контролю. Також виявлено зростання кількості бульбочок (на 19 %) у фазу цвітіння.

Нанокарбоксилат германію у фазу цвітіння сприяв зростанню кількості бульбочок на 12 % порівняно з контролем 2 (рис. 2). У фазу бутонізації зростала як кількість, так і маса корневих бульбочок щодо того ж контролю на 13 та 25 % відповідно. У період цвітіння відзначено зниження кількості бульбочок на 19 %.

Інтенсивність росту є одним із важливих показників саморегуляції рослинного організму, адже від розвитку надземної маси залежить запас пластичних речовин, необхідний для створення репродуктивних органів і формування врожаю [5].

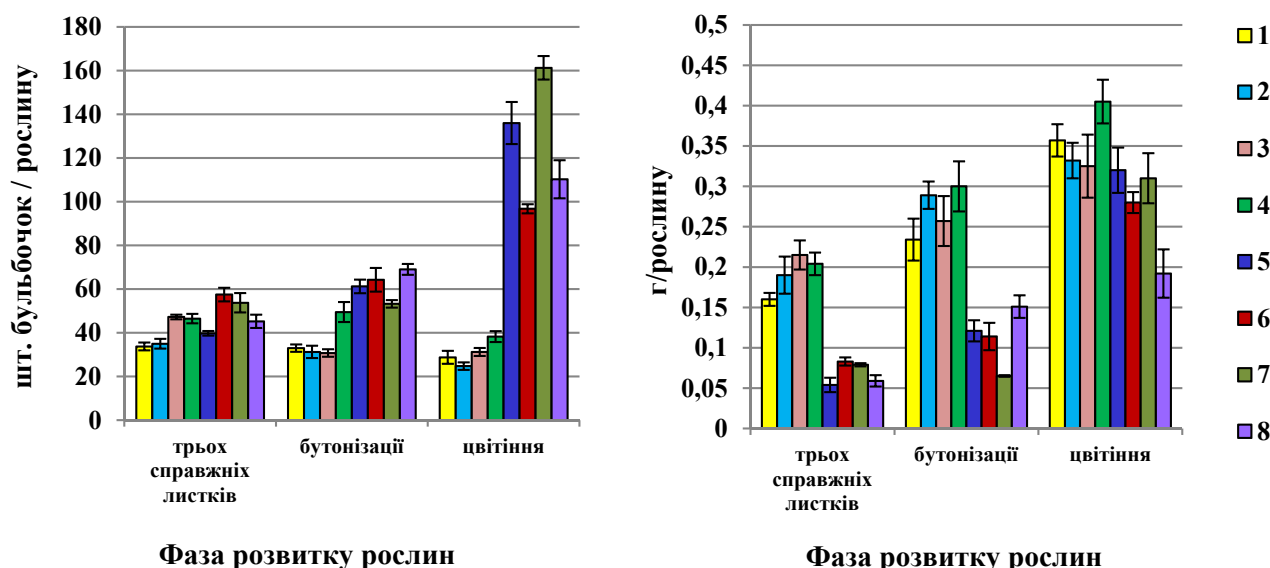


Рис. 2. Вплив карбоксилатів Mo, Fe, Ge на кількість та масу корневих бульбочок сої, інокульованої контрастними за активністю штамами *V. jarrowii*.

Примітка: 1 — *V. jarrowii* 634б (контроль 1); 2 — *V. jarrowii* 634б + Mo; 3 — *V. jarrowii* 634б + Fe; 4 — *V. jarrowii* 634б + Ge; 5 — *V. jarrowii* 604к (контроль 2); 6 — *V. jarrowii* 604к + Mo; 7 — *V. jarrowii* 604к + Fe; 8 — *V. jarrowii* 604к + Ge.

Результати наших досліджень показали, що максимальними ростовими показниками відзначалися рослини, інокульовані активним штамом ризобій, вирощеним на середовищі з додаванням нанокарбоксилату германію (табл. 2). Так, у фазу трьох справжніх листків маса кореня у рослин цього варіанту перевищувала показники контролю 1 на 50 %. У фазу бутонізації нанокарбоксилат германію стимулював наростання як надземної, так і маси кореня сої проти рослин контролю 1 на 23 та 85 %. У фазу цвітіння відзначено лише тенденцію до зростання досліджуваних показників.

Що стосується варіанту з використанням нанокарбоксилату заліза, то сумісно з активним штамом ризобій зафіксовано зростання лише маси кореня щодо рослин контролю 1 у фазу трьох справжніх листків (на 44 %) та бутонізації (на 39 %). У фазу цвітіння спостерігали лише тенденцію до зростання цього показника (табл. 2).

Нанокарбоксилат молібдену суттєво не впливав на масу рослин, інокульованих активним штамом бульбочкових бактерій, протягом їх вегетаційного періоду, за виключенням фази трьох справжніх лист-

ків, де зафіксовано зниження надземної маси проти рослин контролю 1 на 29 % (табл. 2).

Аналіз результатів, одержаних у варіантах, де рослини були інокульовані неактивним штамом 604к, показав, що германій хоч і впливав на ростові показники сої, проте його дія була не настільки вираженою, як у випадку поєднання з активним штамом 634б (див. табл. 2). Зокрема, застосування нанокарбоксилату германію як компонента інокуляційної суспензії сприяло підвищенню маси кореня сої у фазу трьох справжніх листків на 40 % проти рослин контролю 2. У фазу бутонізації спостерігали зростання надземної маси на 15 % та маси кореня на 12 % щодо рослин того ж контролю. У фазу цвітіння у рослин цього варіанту відзначено зниження маси кореня на 18 %.

У варіанті з інокуляцією рослин неактивним штамом, вирощеним на середовищі з нанокарбоксилатом заліза, не зафіксовано змін ростових показників сої щодо рослин контрольного варіанту 2, за виключенням надземної маси рослин у фазу трьох справжніх листків, де відбулося зниження показників на 23 % (див. табл. 2).

**Таблиця 2. Надземна маса та маса кореня (з/рослину) сої сорту Васильківська, інокульованої контрастними за активністю штамми ризобій**

Варіанти досліджу	Фази розвитку рослин					
	трьох справжніх листків		бутонізації		цвітіння	
	надземна маса рослин	маса кореня	надземна маса рослин	маса кореня	надземна маса рослин	маса кореня
<i>V. japonicum</i> 634б (к 1)	4,72 ± 0,46	2,58 ± 0,46	4,30 ± 0,37	2,78 ± 0,20	6,37 ± 0,50	5,12 ± 0,11
<i>V. japonicum</i> 634б + Мо	3,35 ± 0,33	3,23 ± 0,37	3,67 ± 0,38	3,04 ± 0,32	6,51 ± 0,58	4,76 ± 0,22
<i>V. japonicum</i> 634б + Fe	4,75 ± 0,48	3,72 ± 0,33	4,78 ± 0,37	3,86 ± 0,46	6,26 ± 0,39	5,39 ± 0,28
<i>V. japonicum</i> 634б + Ge	4,90 ± 0,35	3,88 ± 0,34	5,28 ± 0,41	5,13 ± 0,40	6,84 ± 0,20	5,67 ± 0,73
<i>V. japonicum</i> 604к (к 2)	4,46 ± 0,39	2,27 ± 0,28	4,44 ± 0,38	2,96 ± 0,24	5,20 ± 0,50	5,35 ± 0,33
<i>V. japonicum</i> 604к + Мо	4,51 ± 0,26	3,55 ± 0,29	4,51 ± 0,39	3,96 ± 0,34	5,26 ± 0,38	4,64 ± 0,38
<i>V. japonicum</i> 604к + Fe	3,42 ± 0,33	2,75 ± 0,31	4,32 ± 0,45	3,02 ± 0,14	5,34 ± 0,42	5,05 ± 0,51
<i>V. japonicum</i> 604к + Ge	4,37 ± 0,46	3,18 ± 0,42	5,10 ± 0,26	3,32 ± 0,11	5,47 ± 0,27	4,41 ± 0,47



Нанокарбоксилат молібдену стимулював наростання маси кореня сої щодо контролю 2 у фазі трьох справжніх листків та бутонізації на 56 та 34 % відповідно. У фазу цвітіння відзначено зниження даного показника на 13 %, порівнюючи з рослинами того ж контролю.

**Висновки.** В умовах чистої культури найбільшу стимулювальну дію на динаміку росту ризобій здійснювали нанокарбоксилати заліза, германію і молібдену в обох досліджуваних концентраціях. За такої умови максимальний їх вплив зафіксовано у концентрації 1 : 1000. За додавання інших мікроелементів виявлено менш виражений позитивний ефект. Внесення досліджених концентрацій цинку в середовище вирощування суттєво знижувало приріст біомаси бактерій.

У контрольованих умовах вегетаційних дослідів встановлено, що використання нанокарбоксилатів заліза, германію і молібдену як компонентів середовища вирощування ризобій у концентрації 1 : 1000 позитивно впливає як на симбіотичні системи, так і на розвиток рослин сої. За такої умови найбільш ефективним виявився нанокарбоксилат германію. Експериментально доведено перспективність використання активного штаму *V. japonicum* 6346 у поєднанні з нанокарбоксилатом германію при вирощуванні сої для підвищення ефективності симбіотичної системи.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Петриченко В. Ф., Коць С. Я. Симбіотичні системи у сучасному сільськогосподарському виробництві. *Вісн. НАН України*. 2014. № 3. С. 57–66.
2. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф., Даценко В. К., Кругова Е. Д., Кириченко Е. В. ... Михалкив Л. М. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз. К. : Логос, 2010. Т. 1. 508 с.
3. Волобуева О. Г. Влияние корневины на бобово-ризобиальный симбиоз растений фасоли. *Ученые записки Орловского государственного ун-та*. 2011. № 3. С. 124–129.
4. Пройда Ю. О. Эффективность применения микроэлементов при возделывании сои в условиях Юго-Запада ЦЧР : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И. И. Иванова. Курск, 1999. 21 с.
5. Петриченко В. Ф., Лихочвор В. В., Іванюк С. В., Корнійчук О. В., Колісник С. І., Ко-

бак С. Я. ... Захарова О. М. Соя. Вінниця : Діло, 2016. 400 с.

6. Тимофеева Я. О., Голов В. И. Микроэлементы в растениях сои и пшеницы дальневосточного региона. *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*. 2012. № 2. С. 151–152.

7. Mottaghian A., Pirdashti H., Bahmanyar M. A., Abbasian A. Leaf seed micronutrient accumulation in soybean cultivars in response to integrated organic and chemical fertilizers application. *Pakistan journal of biological sciences*. 2008. Vol. 11, № 9. P. 1227–1233. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1227.1233>

8. Rhizobiaceae. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондороши, П. Хукаса; рус. перевод под ред. И. А. Тихоновича, Н. А. Проворова. Санкт-Петербург, 2002. 567 с.

9. Авдошина К. А., Табарова К. П., Рязанова Г. Е. Нанотехнологии в сельском хозяйстве. Микроудобрения: Справочная книга. Ленинград : Колос, 1978. 272 с.

10. Sekhon B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2014. Vol. 7, № 2. P. 31–53. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>

11. Scott N., Chen H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*. 2013. Vol. 9. P. 17–18. <http://doi.org/10.1089/ind.2013.1555>

12. Khot L. R., Sankaran S., Maja J. M., Ehsani R., Schuster E. W. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection*. 2012. Vol. 35. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>

13. Ситар О. В., Новицька Н. В., Таран Н. Ю., Каленська С. М., Ганчурін В. В. Нанотехнології в сучасному сільському господарстві. *Фізика живого*. 2010. Т. 18, № 3. С. 113–116.

14. Child J. J. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. child association with nonleguminous plant cells. *Nature*. 1975. Vol. 253. P. 350–351.

15. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*. 1968. № 43. С. 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>

16. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва : Колос, 1979. 376 с.

17. Knight R. D., Shimeld S. M. Identification of conserved C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biology*. 2001. Vol. 2, № 5. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-research0016>

18. Singh G., Singh A. K., Bhatt R. P., Pant S. Effects of zinc on cell viability and cell surface components of *Rhizobium* sp. isolated from root

nodules of *Trifolium alexandrinum*. *Journal of Agricultural Technology*. 2012. Vol. 8, № 3. P. 941–959.

19. Rahman M. M., Bhuiyan M. M. H., Sutradhar G. N. C., Rahman M. M., Paul A. K. Effect of phosphorus, molybdenum and rhizobium inoculation on yield and yield attributes of mungbean. *International journal of Sustainable Crop Prod.* 2008. Vol. 3, № 6. P. 26–33.

20. Albino U. B., Campo R. J. Effect of sources and levels of molybdenum on Bradyrhizobium survival and on biological nitrogen fixation in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2001. Vol. 36. № 3. P. 527–534. <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000300018>

21. Goudar G., Mudenoor M.G., Savalgi V. P. Effect of micronutrient supplemented Bradyrhizobium biofertilizers on nodulation, dry matter production and yield of soybean (*Glycine max* (L.) merrill). *Legume Res.* 2008. Vol. 31, № 1. P. 20–25.

22. Prasad R., Bhattacharyya A., Nguyen Q. D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Frontier of Microbiology*. 2017. Vol. 8. P. 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01014>

23. Mukhopadhyay S. Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints Nanotechnology. *Science and Applications*. 2014. Vol. 7. P. 63–71. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>

24. Коць С. Я., Петерсон Н. В. Мінеральні елементи і добрива в живленні рослин. К. : Логос, 2009. 182 с.

25. Ndakidemi P. A., Bambara S., Makoi J. H. J. R. Micronutrient uptake in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by rhizobium inoculation, and supply of molybdenum and lime. *Plant Omics Journal*. 2011. Vol. 4. №. 1. P 40–52.

26. Лукевич Э. Я., Гар Т. К., Игнатович Л. М., Миронов В. Ф Биологическая активность соединений германия. Рига : Зинатне, 1990. 191 с.

27. Brear E. M., Day D. A., Smith P. M. C. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Frontiers in plant science*. 2013. № 4. P. 359–374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00359>

Отримано 24.10.2018

UDC 581.1:58.557:581.133.1:631.847.1

## **BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM REACTION IN PURE CULTURE AND SYMBIOTIC SYSTEMS TO THE USE OF NANOCARBOXYLATES OF MICROELEMENTS**

**S. Ya. Kots, L. I. Rybachenko, P. P. Pukhtaievych, O. R. Rybachenko**

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine  
e-mail: veselika@ukr.net

**Objective.** Study the influence of various concentrations of germanium, molybdenum, vanadium, cobalt, iron, copper and zinc on the growth dynamics of rhizobia, to select the most effective ones for studying their role as components of the digest medium in growing rhizobia and optimizing the formation and functioning of symbiotic soybean – *Bradyrhizobium japonicum* systems. **Methods.** Microbiological, physiological, spectrophotometry, gas chromatography. **Results.** It was found that the addition of most of the studied trace elements to the rhizobia growth medium had a positive effect on the growth dynamics of the bacterial culture. The exception was zinc nanocarboxylate, the introduction of which in the digest medium significantly reduced the growth of biomass bacteria. At the same time, irrespective of concentration, the most stimulating effect on the dynamics of growth of rhizobia in a pure culture was typical for the nanocarboxylates of iron, germanium and molybdenum. Their maximum action was developed at a concentration of 1 : 1000. These compounds are promising when adding rhizobia cultivating medium and studying their effect on the processes of forming and functioning of legume-rhizobial symbiotic systems. Analysis of the results of vegetation experiments showed that the use of iron, germanium and molybdenum nanocarboxylates as components of the rice growing medium at a concentration of 1 : 1000 positively influenced the processes of formation and functioning of symbiotic systems formed with the participation of various *Bradyrhizobium japonicum* strains — 634b and 604k, as well as on the growth of the vegetative mass of

soybean plants. In this case, the most effective was germanium nanocarboxylate. **Conclusion.** The promising use of the active strain *Bradyrhizobium japonicum* 634b in combination with germanium nanocarboxylate in soybean cultivation has been experimentally proven to enhance the effectiveness of symbiotic systems.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, legume-rhizobial symbiosis, nitrogen-fixing activity, nanocarboxylates of trace elements.

#### REFERENCES

1. Petrychenko, V. F., & Kots, S. Ya. (2014). Symbiotychni systemy u suchasnomu sil'skogospodars'komu vyrobnytvi [Symbiotic systems in modern agricultural production]. *Visnyk of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 3, 57–66 [in Ukrainian].
2. Kots, S. Ya., Morgun, V. V., Patyika, V. F., Datsenko, V. K., Krugova, E. D., Kirichenko, E. V., ... Mihalkiv, L. M. (2010). *Biologicheskaya fikstsiya azota: bobovo-rizobial'nyy simbioz* [Biological nitrogen fixation: legume-rhizobial symbiosis]. Vol. 1. Kiev: Logos [in Russian].
3. Volobueva, O. G. (2011). Vliyanie kornevina na bobovo-rizobial'nyy simbioz rasteniy fasoli [Effect of root on legume-rhizobial symbiosis of bean plants]. *Scientific notes of orel state university*, 3, 124–129 [in Russian].
4. Proyda, Yu. O. (1999). The effectiveness of the use of trace elements in the cultivation of soybean in the South-West of the CPR. (Extended abstract of Candidate thesis). Kursk State Agricultural Academy named after I. I. Ivanov. Kursk, Russia [in Russian].
5. Petrychenko, V. F., Lykhochvor, V. V., Ivaniuk, S. V., Korniihuk, O. V., Kolisnyk, S. I., Kobak, S. Ya. ... Zakharova, O. M. (2016). *Soja* [Soybean]. Vinnytsia: Dilo [in Ukrainian].
6. Timofeeva, Ya. O. & Golov, V. I. (2012). Mikroelementy v rasteniyakh soi i pshenitsy dal'nevostochnogo regiona [Trace elements in soybean and wheat plants of the Far Eastern region] *Oilseeds. Scientific and technical bulletin of the All-Russian Scientific Research Institute of Oilseeds*, 2, 151–152 [in Russian].
7. Mottaghian, A., Pirdashti, H., Bahmanyar, M. A. & Abbasian, A. (2008). Leaf seed micro-nutrient accumulation in soybean cultivars in response to integrated organic and chemical fertilizers application. *Pakistan journal of biological sciences*, 9(11), 1227–1233. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1227.1233>
8. Spaynk, G., Kondoroshi, A., Hukas, P. (Eds.). (2002). *Rhizobiaceae*. Molecular biology of bacteria interacting with plants (rus translation eds. Tihonovich, I. A., Provorov, N. A.). Saint Petersburg [in Russian].
9. Avdoshina, K. A., Tabarova, K. P., & Ryazanova, G. E. (1978). *Nanotekhnologii v sel'skom khozyaystve. Mikroudobreniya: spravochnaya kniga* [Nanotechnology in agriculture Microfertilizers: a reference book]. Leningrad: Kolos [in Russian].
10. Sekhon, B. S. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2(7), 31–53. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>
11. Scott, N. & Chen, H. (2013). Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*, 9, 17–18. <http://doi.org/10.1089/ind.2013.1555>
12. Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., & Schuster E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection*, 35, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>
13. Sitar, O. V., Novitska, N. V., Taran, N. Yu., Kalenska, S. M., & Ganchurin, V. V. (2010). Nanotekhnologii' v suchasnomu sil'skomu gospodarstvi [Nanotechnology in the state-of-the-art state partnership]. *Physics of the Alive*, 3(18), 113–116 [in Ukrainian].
14. Child, J. J. (1975). Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. child association with nonleguminous plant cells. *Nature*, 253, 350–351.
15. Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*, 43, 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
16. Dosphehov, B. A. (1985). *Metodika polevogo opyta* [Methodology of field experiment]. Moscow: Agropromizdat [in Russian].
17. Knight, R. D., & Shimeld, S. M. (2011). Identification of conserved C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biology*, 5(2), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-research0016>
18. Singh, G., Singh, A. K., Bhatt, R. P., & Pant, S. (2012). Effects of zinc on cell viability and cell surface components of Rhizobium sp. isolated from root nodules of Trifolium alexandrinum. *Journal of Agricultural Technology*, 3(8), 941–959.
19. Rahman, M. M., Bhuiyan, M. M. H., Sutradhar, G. N. C., Rahman, M. M., & Paul, A. K. (2008). Effect of phosphorus, molybdenum and rhizobium inoculation on yield and yield attributes of mungbean. *International journal of Sustainable Crop Prod.*, 3, 26–33.
20. Albino, U. B., & Campo, R. J. (2001). Effect of sources and levels of molybdenum on Bradyrhizobium survival and on biological nitrogen

fixation in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 3(36), 527–534. <http://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000300018>

21. Goudar, G., Mudenoor, M. G., & Savalgi, V. P. (2008). Effect of micronutrient supplemented Bradyrhizobium biofertilizers on nodulation, dry matter production and yield of soybean (*Glycine max* (L) merrill). *Legume Res*, 1(31), 20–25.

22. Prasad, R., Bhattacharyya, A., & Nguyen, Q. D. (2017). Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Frontier of Microbiology*, 8, 1–13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01014>

23. Mukhopadhyay, S. (2014). Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints *Nanotechnology. Science and Applications*, 7, 63–71. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>

24. Kots, S. Ya., & Peterson, N. V. (2009).

*Mineral'ni elementy i dobryva v zhyvlenni roslyn* [Mineral elements and fertilizers in plant nutrition]. Kiev: Logos [in Ukrainian].

25. Ndakidemi, P. A., Bambara, S., & Makoi, J. H. J. R. (2011). Micronutrient uptake in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by rhizobium inoculation, and supply of molybdenum and lime. *Plant Omics Journal*, 1(4), 40–52.

26. Lukevich, E. Ya., Gar, T. K., Ignatovich, L. M., & Mironov, V. F. (1990). *Biologicheskaya aktivnost' soedineniy germaniya* [Biological activity of germanium compounds]. Riga: Zinatne [in Russian].

27. Brear, E. M., Day, D. A., & Smith, P. M. C. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Frontiers in plant science*, 4, 359–374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00359>

Received 24.10.2018