Сільськогосподарська мікробіологія. 2022. Вип. 36. С. 36–46.
ISSN 1997-3004

https://doi.org/10.35868/1997-3004.36.36-46
УДК 579:581.1:631.86:631.847.211:632.952

РЕАКЦІЯ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* У ВІЛЬНОЖИВУЧІЙ ТА СИМБІОТИЧНІЙ ФОРМАХ НА ЗАСТОСУВАННЯ БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ

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

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

Мета. *З'ясувати вплив різних концентрацій бурштинової кислоти на інтенсивність росту Bradyrhizobium japonicum та активність симбіотичних систем, створених за їх участю.* ***Методи.*** *Мікробіологічні, фізіологічні, статистичні, газова хроматографія.* ***Результати.*** *Виявлено, що штам Т21-2 мав більш виражену, як порівняти зі штамом РС08, реакцію на застосування бурштинової кислоти незалежно від її концентрації. Додавання до середовища культивування ризобій бурштинової кислоти у концентрації 0,01 та 0,02 г/л зумовлювало зростання титру бактеріальних клітин штамів Т21-2 і РС08, тоді як у концентрації 0,2 г/л вона здійснювала токсичний вплив на досліджувані штами. Бурштинова кислота у концентрації 0,01 г/л, як за обробки насіння, так і в ролі компонента інокуляційної суспензії суттєво активізувала процеси формування та функціонування симбіотичних систем сої, утворених штамом ризобій Т21-2. У концентрації 0,02 г/л вона забезпечувала найвищий з досліджуваних варіантів темп росту бактеріальних клітин і викликала підвищення їхнього титру щодо ризобій без додавання кислоти як на третю, так і на четверту добу культивування. Незалежно від способу застосування, така концентрація бурштинової кислоти частково пригнічувала нодуляційну активність ризобій штаму Т21-2 та азотфіксувальну активність сформованих за їх участю симбіотичних систем.* ***Висновки.*** *На основі виявленого впливу бурштинової кислоти на ріст Bradyrhizobium japonicum у чистій культурі та на формування й функціонування симбіозу, для підвищення активності соєво-ризобіальних симбіотичних систем нами рекомендовано застосовувати бурштинову кислоту в концентрації 0,01 г/л як у ролі компонента інокуляційної суспензії, так і для передпосівної обробки насіння.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum, бурштинова кислота, азотфіксувальна активність, бобово-ризобіальний симбіоз, соя.*

Вступ. Соя є основною зернобобовою культурою в світовому землеробстві. Вона має важливе агротехнічне значення, є прекрасним елементом збалансованої сівозміни та попередником для наступних сільськогосподарських культур, особливо зернових, виявляє фітомеліоративні й фітосанітарні властивості. За рахунок добре розвиненої кореневої системи, що проникає глибоко в ґрунт, ця культура здатна використовувати малодоступні важкорозчинні мінеральні сполуки не тільки з орного, а й із більш глибоких шарів ґрунту, а також підвищувати рівень його аерації [1]. Окрім цього, біологічною особливістю сої є здатність утворювати високоефективні азотфіксувальні симбіози з бульбочковими бактеріями, завдяки яким відбувається збагачення ґрунтів доступними для рослин формами азоту [2]. Вона є особливо цінною білково-олійною культурою, вміст білка в зерні якої становить від 35 % до 50 %. Крім того, зерно сої містить до 31 % безазотистих екстрактивних речовин, 14–26 % — жиру, 20–30 % — крохмалю, 3–7 % — клітковини, 4–6 % — золи, а в 100 кг зерна міститься 147 кормових оди-

© Л. І. Рибаченко, С. Я. Коць, П. П. Пухтаєвич, О. Р. Рибаченко, С. В. Омельчук, 2022

ниць. У золі багато калію, фосфору, кальцію, а також вітамінів (А, B_1, С, B_2, Е, К, D_1, D_3, РР) [3]. Саме тому збільшення продуктивності цієї культури із урахуванням її симбіотичного потенціалу є одним із найважливіших засобів поповнення як харчового, так і кормового білка в світі, дефіцит якого є найбільш актуальною проблемою сьогодення.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У контексті сучасних стратегічних напрямків розвитку аграрного сектору підвищення продуктивності сільськогосподарських культур досягається шляхом інтенсифікації виробництва за рахунок застосування нових прогресивних технологій, які дають змогу підвищити врожайність і стійкість культурних рослин до несприятливих чинників довкілля. Складовою частиною цього напряму є розробка методів екзогенної регуляції та стабілізації адаптивних реакцій рослин завдяки використанню фізіологічно активних речовин.

З екологічної точки зору до практики рослинництва варто зарахувати метод передпосівної обробки насіння регуляторами росту. Ці сполуки у виключно малих дозах впливають на важливі фізіолого-біохімічні процеси, зумовлюючи активізацію метаболізму рослинного організму, що дозволяє підвищувати ефективність реалізації потенційної продуктивності сортів [4]. Відомо, що регулятори росту здатні проявляти антиоксидантні властивості та підвищувати стійкість рослин до несприятливих факторів навколишнього середовища (фізичних, хімічних, біологічних) [5; 6].

Дослідженнями низки авторів доведено, що регулятори росту позитивно впливають не лише на рослинний організм, а й на розвиток і функціонування мікробіоти ґрунту, активізують процеси формування та функціонування симбіотичних систем бобових культур і сприяють збільшенню їхньої продуктивності. Ці сполуки підвищують нітрогеназну активність не лише тих штамів мікроорганізмів, які застосовувалися для інокуляції, але й азотфіксувальних мікроорганізмів, що мешкають у ґрунті та перебувають у зоні висіяного насіння, а потім і в прикореневій зоні рослин [7; 8]. Такий ефект від застосування регуляторів росту є досить важливим на сьогодні з огляду на широке використання у сучасних технологіях вирощування бобових хімічних засобів захисту рослин, зокрема фунгіцидів, дія яких призводить до серйозних негативних наслідків у разі їхньої токсичності щодо інокулянтів. Адже за протруювання насіння його поверхня стає зоною взаємодії бактерій з хімічним агентом. Токсична дія останнього може значно знижувати ефект інокуляції.

Водночас серед широкого на сьогодні спектру регуляторів росту варто звернути увагу на бурштинову кислоту, посилення на сьогодні інтересу до якої як стимулятора росту пояснюється тим, що йде активний пошук препаратів, які не несуть небезпеки для людини й навколишнього середовища. Здатність цієї сполуки до регуляції росту рослин, нормалізації природної мікробіоти ґрунту та її антистресові властивості давно відомі. У зв'язку з цим актуальними є дослідження особливостей застосування бурштинової кислоти в технологіях вирощування бобових культур.

Бурштинова кислота є проміжним продуктом циклу трикарбонових кислот у багатьох організмах і виробляється рослинами, тваринами та мікроорганізмами, а також є одним із кінцевих продуктів ферментації анаеробного метаболізму [9; 10]. Вона може виділятися коренями рослин під час їхнього росту, накопичується в ґрунті в процесі розкладання рослинних залишків. Як і багато інших компонентів кореневого ексудату, бурштинова кислота не тільки сприяє посиленню росту рослин і стійкості до стресу, але також впливає на ріст ризобактерій. Численні аналізи показали важливу роль бурштинової кислоти у формуванні різноманітності мікробних угруповань ґрунту та її стимулювальну дію на розмноження ризосферних мікроорганізмів [11; 12].

На сучасному етапі розвитку технологій вирощування сільськогосподарських культур сумісне застосування регуляторів росту та мікробних препаратів на основі активних штамів бульбочкових бактерій для підвищення продуктивності та стійкості рослин сої до стресових чинників викликає значний інтерес. Обґрунтоване залучення бактеріальних препаратів на основі рістрегуляторних речовин як елементів екологічного землеробства дозволяє суттєво знизити хімічне навантаження на екосистеми внаслідок зменшення використання хімічних засобів

захисту рослин, що підвищує врожайність і покращує якість продукції [13; 14].

Механізм стимулювального впливу регуляторів росту рослин на азотфіксувальну активність (АФА) симбіотичних систем зумовлений активізацією цими сполуками низки фізіолого-біохімічних процесів, зокрема розвитком потужної кореневої системи, посиленням процесу фотосинтезу і, як наслідок, інтенсивним відтоком у кореневу зону фотоасимілятів, які є основним джерелом живлення ризобій тощо [15].

Проте інформація щодо впливу регуляторів росту на симбіотичні системи є досить суперечливою. Результати низки досліджень вказують на посилення активності процесу симбіотичної азотфіксації за сумісного застосування передпосівної бактеризації і регуляторів росту рослин [16; 17]. Водночас у науковій літературі є застереження проти поєднання мікробних препаратів із регуляторами росту, пов'язані з тим, що обидва види препаратів містять фізіологічно активні речовини, дія яких на продукційний процес культурних рослин у разі передозування може мати негативні наслідки [17; 18].

Аналіз літературних джерел дозволив виявити, що питання впливу сумісного застосування мікробних препаратів та регуляторів росту на симбіотичні системи *Glycine max* (L.) Merr. – *Bradyrhizobium japonicum* є недостатньо розкритим та потребує з'ясування особливостей їхньої дії на перебіг біологічної фіксації атмосферного азоту. З огляду на це, ми поставили перед собою мету з'ясувати вплив різних концентрацій бурштинової кислоти на інтенсивність наростання біомаси *Bradyrhizobium japonicum* та показники активності симбіотичних систем, створених за їх участю.

Методи досліджень. Культуру ризобій для лабораторних та вегетаційних досліджень вирощували за 26–28 °С на манітно-дріжджовому середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 0,5; $MgSO_4$ — 0,2; NaCl — 0,1; дріжджовий екстракт — 1,0; маніт — 10,0 [19]. Культивування бактерій здійснювали методом періодичного інкубування на кругових качалках у колбах Ерленмейера, що містили 200 мл живильного середовища. Посівний матеріал у колби вносили в концентрації 2 % від об'єму живильного середовища. Чисельність ризобій у суспензії, що вносилася, становила 10^8 клітин/мл. Чистоту культури перевіряли шляхом її висіву на середовище МПА, на якому бульбочкові бактерії *B. japonicum* не ростуть.

Для проведення лабораторних досліджень було використано два штами бульбочкових бактерій із музейної колекції азотфіксувальних мікроорганізмів відділу симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України: *B. japonicum* Т21-2, отриманий шляхом міжвидової кон'югації *Escherichia coli* S17-1 і *B. japonicum* 646. У геномі клітин бульбочкових бактерій цього штаму присутній фрагмент гену неоміцинфосфотрансферази транспозону Tn5 довжиною 517 н. п., що відрізняє його від вихідного штаму і забезпечує стійкість до канаміцину сульфату в концентрації 200 мг/мл. Штам Т21-2 характеризується підвищеною продукцією екзополісахаридів, непатогенний, з високою екологічною пластичністю та конкурентоздатністю. Також використовували штам РС08, виділений із бульбочок сої сорту Київська 27, що росла на темно-сірому опідзоленому ґрунті. Штам висококонкурентоздатний та має високу технологічність [20].

Перед посівом ризобій у середовище культивування бактерій вносили бурштинову кислоту в концентраціях 0,2, 0,02, та 0,01 г/л. Контрольними варіантами були чисті культури ризобій без застосування бурштинової кислоти (Т21-2 (контроль 1), РС08 (контроль 2)). Визначення кількості мікробних клітин в одиниці об'єму здійснювали за використання методу послідовних розведень з висіванням на МДА суспензій ризобій інкубованих із бурштиновою кислотою та без її додавання і наступним підрахунком утворених колоній на поверхні твердого живильного середовища.

Для вивчення впливу бурштинової кислоти на азотфіксувальну активність симбіотичних систем і підбору оптимальних концентрацій та способів застосування цієї речовини для активізації симбіотичних систем було проведено низку досліджень на вегетаційному майданчику Інституту фізіології рослин та генетики НАН України. У відповідних варіантах насіння сої сорту Алмаз перед посівом інкубували у розчинах бурштинової кислоти (1 год.) та інокулювали (1 год.) бульбочковими бактеріями (чистими, або із

додаванням відповідних концентрацій бурштинової кислоти) штаму Т21-2 за такою схемою:

1) насіння + *B. japonicum* Т21-2 (контроль);

2) насіння + [*B. japonicum* Т21-2 + бурштинова кислота 0,01 г/л];

3) насіння + [*B. japonicum* Т21-2 + бурштинова кислота 0,02 г/л];

4) [насіння + бурштинова к-та 0,01 г/л] + *B. japonicum* Т21-2;

5) [насіння + бурштинова к-та 0,02 г/л] + *B. japonicum* Т21-2.

Сою вирощували по 6 рослин у 4-кілограмових посудинах, за природного освітлення та температури, оптимального водозабезпечення (60 % ПВ). Як субстрат використовували промитий річковий пісок. Джерело мінерального живлення — поживна суміш Гельрігеля, збагачена мікроелементами: молібденом, бором, марганцем і міддю, та збіднена на азот — 0,25 норми (1 норма азоту відповідає 708 мг $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ на 1 кг субстрату).

Відбори зразків для аналізу процесів формування та функціонування симбіотичного апарату здійснювали у фази трьох справжніх листків, бутонізації та цвітіння. Вимірювання проводили у 5–6-кратній біологічній повторності.

Визначення нодуляційної активності ризобій проводили за обрахунком кількості бульбочок на коренях рослин та вимірюванням їхньої маси. Також здійснювали вимірювання азотфіксувальної активності симбіотичних систем ацетиленовим методом [21]. Для цього корені з утвореними на них бульбочками переносили в герметично закриті скляні флакони, куди вводили 10 % ацетилену. Тривалість інкубації становила 1 год. Газову суміш аналізували на хроматографі Agilent GC System 6850 (США). Азофіксувальну активність виражали в мікромолях утвореного етилену за 1 год (мкмоль C_2H_4/год.) на рослину. Визначення проводили у 4-кратній біологічній повторності.

У таблицях наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки ($x \pm SE$). Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), де відмінності вважалися значущими, оскільки P-значення менше за 0,05 (з поправкою Бонферроні).

Результати досліджень. Результати лабораторних досліджень показали, що штам Т21-2 характеризувався більш вираженою та позитивною реакцією на застосування бурштинової кислоти, ніж штам РС08 (рис.). Встановлено, що додавання до середовища культивування цього штаму бурштинової кислоти в концентрації 0,02 г/л було найбільш ефективним способом збільшення темпів росту бактеріальних клітин і викликало підвищення досліджуваного показника щодо контролю 1 на 14 % (третя доба культивування) та 24 % (четверта доба культивування). Дещо менш ефективною була концентрація 0,01 г/л, яка зумовлювала незначне послаблення (на 7 %) темпів росту бактеріальної культури щодо того ж контролю на третю добу культивування, проте на четверту добу відбувся суттєвий приріст кількості бактеріальних клітин, який становив 18 %, як порівнянти з контролем 1.

Такий ефект є очікуваним, адже відомо, що бурштинова кислота впливає на активність мікробіоти ґрунту. Доведено, що застосування препаратів на основі цієї кислоти призводить до стабілізації життєдіяльності природної ґрунтової мікробіоти [22]. Загалом вважається, що бурштинова кислота впливає на мікроорганізми, які забезпечують інтенсивну біологічну переробку мінеральних речовин. Такий ефект може проявлятись як наслідок стимуляції дихання, що загалом сприятливо позначається на енергетичному балансі бактеріальної клітини [23].

Концентрація бурштинової кислоти 0,2 г/л здійснювала токсичний вплив на ріст культури ризобій штаму Т21-2 (рис.). Так, на третю добу вирощування бактеріальної культури титр мікробних клітин у цьому варіанті був нижчим — на 38 %, а на четверту добу — на 88 % щодо контролю 1.

Як і у випадку зі штамом Т21-2, найбільш ефективною концентрацією бурштинової кислоти, що додавалася до середовища вирощування ризобій штаму РС08, була 0,02 г/л — досліджуваний показник перевищував контроль 2 на 8 % та 31 % на третю та четверту добу культивування відповідно (рис.). Дещо нижчий позитивний ефект забезпечувала концентрація 0,01 г/л, кількість бактеріальних клітин варіанту із цією концентрацією бурштинової кислоти перевищувала контроль 2

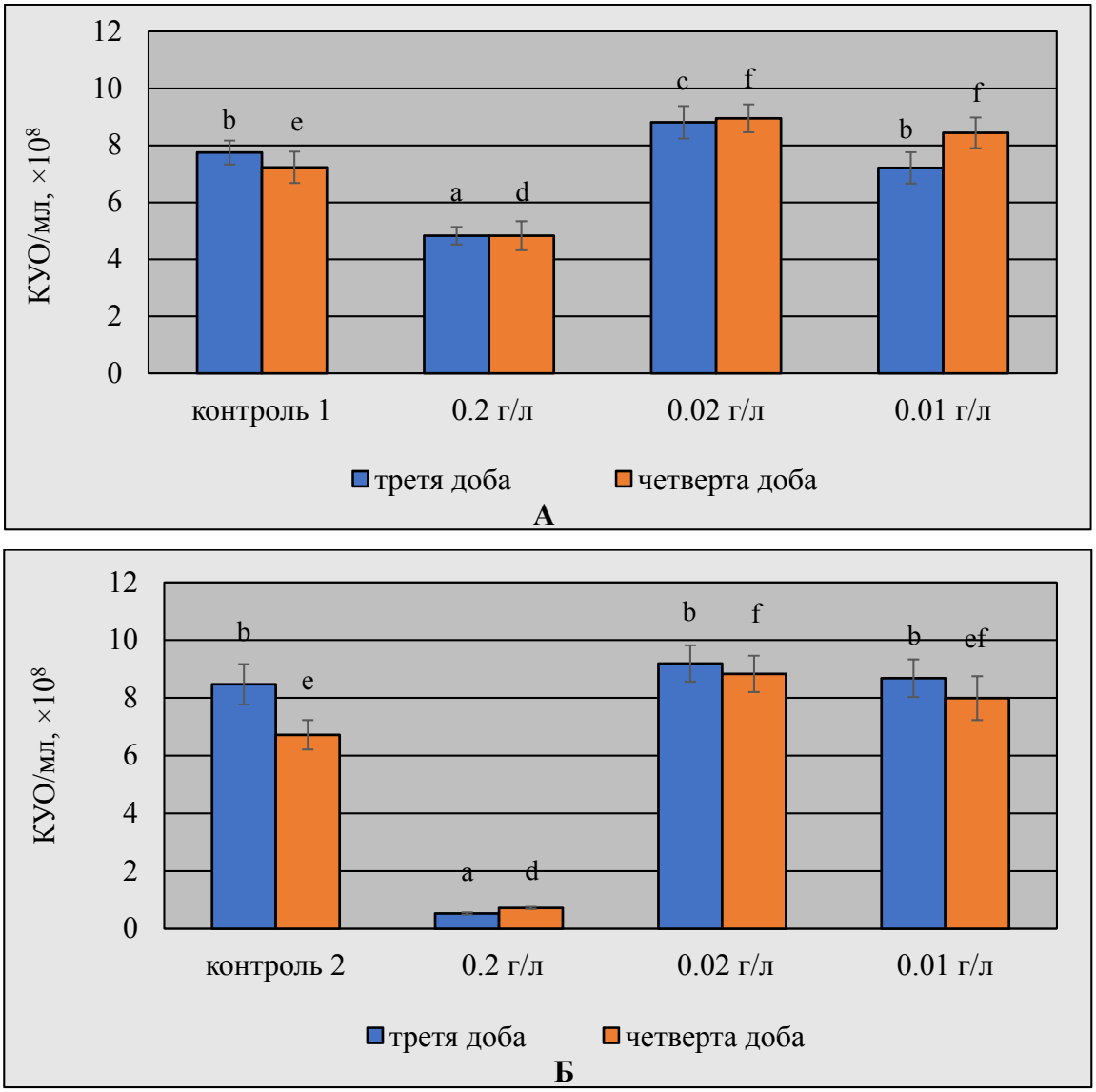

Рисунок. Титр мікробних клітин Bradyrhizobium japonicum за впливу бурштинової кислоти.

А — штам Т21-2; Б — штам РС08.

Різні літери в стовпчиках вказують на значення, що суттєво відрізняються одне від одного між варіантами внаслідок порівняння за допомогою тесту Тукі ($P < 0,05$) з поправкою Бонферроні (літери a, b, c — достовірно між варіантами на третю добу культивування; d, e, f — достовірно між варіантами на четверту добу культивування).

лише на четверту добу культивування на 14 %. Бурштинова кислота у концентрації 0,2 г/л спричинювала суттєве зниження титру мікробних клітин щодо контролю 2 на 94 % та 92 % — на третю та четверту добу культивування відповідно.

Отже, на основі лабораторних експериментів для подальших вегетаційних досліджень реакції бобово-ризобіальних симбіотичних систем сої на застосування різних концентрацій бурштинової кислоти було обрано дві концентрації 0,01 та 0,02 г/л, а як мікросимбіонт — штам Т21-2, отриманий шляхом транспозонового мутагенезу, який володіє розширеним спектром комплементарності та забезпечує більш інтенсивну азотфіксацію сої різних сортів, як порівняти із штамами аналітичної селекції, до яких належить штам РС08 [24].

Дослідження процесів формування та функціонування соєво-ризобіального симбіозу дозволило виявити, що у фазу трьох справжніх листків найактивніші симбіотичні системи було сформовано бактеріями, вирощеними на середовищі із бурштиновою кислотою у концентрації 0,01 г/л. Вони перевищували контрольні рослини на 25 % за кількістю бульбочок, на 10 % — за їхньою ма-

сою та на 38 % — за азотфіксувальною активністю (табл. 1). Ми припустили, що позитивний вплив бурштинової кислоти на формування симбіотичного апарату може бути зумовлений більшою кількістю мікроорганізмів у прикореневій зоні рослин сої за рахунок стимуляції їхніх адаптивних властивостей, адже, як зазначалося вище, ця сполука бере активну участь у клітинному диханні аеробних мікроорганізмів, а також здатна стабілізувати життєдіяльність природної ґрунтової мікробіоти.

Ще у 1981 році колектив авторів — Фінан, Вуд та Джордан — зробив припущення, що бурштинова кислота та її солі можуть бути джерелом енергії для процесу фіксації азоту [25]. Дослідженнями Бергерсена й Тернера [26] було показано, що фіксація азоту ізольованими бактероїдами сої суттєво стимулюється сукцинатом і фумаратом. Можливо, виявлене нами підвищення азотфіксувальної активності є підтвердженням цього припущення.

Водночас ризобії, вирощені на середовищі із бурштиновою кислотою у концентрації 0,02 г/л, сформували симбіотичні системи із низькою активністю. Кількість, маса кореневих бульбочок та їхня азотфіксувальна активність були на 57 %, 52 % та 59 % меншими, ніж у контролі.

Обробка насіння бурштиновою кислотою в концентрації 0,01 г/л не впливала суттєво на досліджувані показники у фазу трьох справжніх листків, тоді як застосування 0,02 г/л зумовило зростання лише кількості та маси кореневих бульбочок щодо рослин контрольного варіанту на 130 % і 60 % (табл. 1).

У фазу бутонізації, як і в попередній фазі розвитку рослин, найбільш ефективними були симбіотичні системи, що формувались у разі застосування бурштинової кислоти в концентрації 0,01 г/л, незалежно від способу її використання (табл. 2). Зокрема, використання бурштинової кислоти у цій концентрації як компонента інокуляційної суспензії зумовило зростання кількості кореневих бульбочок щодо контрольних рослин на 15 % та їхньої азотфіксувальної активності — на 28 %. За обробки насіння виявлено зростання кількості та маси бульбочок на 37 % та 46 %, а також АФА — на 31 %.

Бурштинова кислота у концентрації 0,02 г/л, незалежно від способу її застосування, чинила негативну дію на симбіотичний апарат рослин сої. Додавання її до середовища вирощування ризобій призвело до зниження кількості, маси бульбочок та їхньої азотфіксувальної активності у фазу бутонізації, як порівняти із контрольними рослинами, на 57 %, 35 % та 18 % відповідно. Обробка насіння такою концентрацією бурштинової кислоти зумовила зниження кількості кореневих бульбочок на 24 % та їх АФА — на 44 % (табл. 2).

Таблиця 1. ***Формування та функціонування симбіотичних систем соя – B. japonicum T21-2 за впливу бурштинової кислоти*** *(фаза трьох справжніх листків)*

Варіанти досліду	Кількість бульбочок, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	АФА, мкмоль C_2H_4 / / (рослину·год.)
насіння + *B. japonicum* T21-2 (контроль)	16,33 ± 1,27 [b]	0,19 ± 0,04 [g]	2,53 ± 0,31 [j]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,01 г/л]	20,33 ± 2,21 [c]	0,21 ± 0,03 [g]	3,44 ± 0,08 [k]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,02 г/л]	7,00 ± 0,68 [a]	0,09 ± 0,01 [f]	1,23 ± 0,17 [l]
[насіння + бурштинова кислота 0,01 г/л] + *B. japonicum* T21-2	17,33 ± 1,60 [b]	0,20 ± 0,07 [g]	2,83 ± 0,28 [j]
[насіння + бурштинова кислота 0,02 г/л] + *B. japonicum* T21-2	37,66 ± 2,38 [d]	0,31 ± 0,06 [h]	2,39 ± 0,21 [j]

Примітка: Тут і в таблицях 2 і 3 різні літери в стовпчиках вказують на значення, що суттєво відрізняються одне від одного між варіантами внаслідок порівняння за допомогою тесту Тукі ($P < 0,05$) з поправкою Бонферроні (літери a, b, c, d, e — достовірно між варіантами за кількістю бульбочок; f, g, h, i — достовірно між варіантами за масою бульбочок; j, k, l — достовірно між варіантами за АФА).

Таблиця 2. ***Реакція симбіотичних систем соя – B. japonicum T21-2 на дію бурштинової кислоти*** *(фаза бутонізації)*

Варіанти досліду	Кількість бульбочок, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	АФА, мкмоль C_2H_4 / / (рослину·год.)
насіння + *B. japonicum* T21-2 (контроль)	22,33 ± 1,03 [c]	0,41 ± 0,09 [gh]	6,18 ± 0,19 [k]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,01 г/л]	25,66 ± 1,59 [d]	0,48 ± 0,02 [h]	7,91 ± 0,57 [l]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,02 г/л]	9,66 ± 1,40 [a]	0,27 ± 0,05 [f]	5,05 ± 0,27 [j]
[насіння + бурштинова кислота 0,01 г/л] + *B. japonicum* T21-2	30,66 ± 2,65 [e]	0,60 ± 0,07 [i]	8,12 ± 0,06 [l]
[насіння + бурштинова кислота 0,02 г/л] + *B. japonicum* T21-2	17,00 ± 1,00 [b]	0,39 ± 0,04 [g]	3,49 ± 0,41

Встановлено, що у фазу цвітіння рослини практично усіх досліджуваних нами варіантів перевищували рослини контролю за азотфіксувальною активністю та за кількістю кореневих бульбочок, за винятком варіанту із застосуванням 0,02 г/л бурштинової кислоти як компонента інокуляційної суспензії (табл. 3). Застосування бурштинової кислоти у концентрації 0,01 г/л викликало зростання АФА симбіотичних систем щодо контрольних на 30 % (у варіанті з обробкою ризобій), а також зростання кількості, маси кореневих бульбочок та їхньої активності на 68 %, 125 % та 107 % (варіант з обробкою насіння).

Застосування бурштинової кислоти у концентрації 0,02 г/л у фазу цвітіння впливало менш токсично, як порівняти з попередніми фазами розвитку рослин. Зокрема, використання її як компонента бактеріальної суспензії спричинило зниження кількості та маси бульбочок щодо контролю на 65 % та 24 % відповідно. Водночас ці симбіотичні системи перевищували контрольні за азотфіксувальною активністю на 89 %. Обробка насіння бурштиновою кислотою такої концентрації забезпечила зростання кількості бульбочок та їх АФА, як порівняти з контрольними рослинами, на 53 % та 55 % відповідно (табл. 3).

Отже, нами доведено, що додавання до середовища культивування ризобій бурштинової кислоти у концентрації 0,01 та 0,02 г/л зумовлювало стимуляцію темпів наростання кількості бактеріальних клітин штамів T21-2 і PC08; концентрація 0,02 г/л забезпечувала максимальний з досліджуваних концентрацій титр мікробних клітин і зумовлювала

Таблиця 3. ***Вплив бурштинової кислоти на нодуляційну активність B. japonicum T21-2 та АФА симбіотичних систем, створених за їх участю*** *(фаза цвітіння)*

Варіанти досліду	Кількість бульбочок, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину	АФА, мкмоль C_2H_4 / / (рослину·год.)
насіння + *B. japonicum* T21-2 (контроль)	17,00 ± 1,55 [b]	0,79 ± 0,10 [g]	5,31 ± 0,50 [j]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,01 г/л]	21,01 ± 2,78 [b]	0,66 ± 0,05 [fg]	6,91 ± 0,84 [jk]
насіння + [*B. japonicum* T21-2 + бурштинова кислота 0,02 г/л]	6,00 ± 0,20 [a]	0,60 ± 0,04 [f]	10,06 ± 1,37 [l]
[насіння + бурштинова кислота 0,01 г/л] + *B. japonicum* T21-2	28,66 ± 2,45 [c]	1,78 ± 0,08 [h]	11,04 ± 1,78 [l]
[насіння + бурштинова кислота 0,02 г/л] + *B. japonicum* T21-2	26,00 ± 1,73 [c]	0,73 ± 0,05 [g]	8,22 ± 0,90 [k]

підвищення досліджуваного показника щодо інших варіантів як на третю, так і на четверту добу культивування. Бурштинова кислота у концентрації 0,01 г/л як за обробки насіння, так і як компонент інокуляційної суспензії, активізувала процеси формування та функціонування симбіотичних систем сої, тоді як у концентрації 0,02 г/л пригнічувала нодуляційну активність ризобій та азотфіксувальну активність сформованих за їх участю симбіотичних систем. Отже, для підвищення активності соєво-ризобіальних симбіотичних систем сої нами рекомендовано застосовувати бурштинову кислоту в концентрації 0,01 г/л як у ролі компонента інокуляційної суспензії, так і для передпосівної обробки насіння.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Петриченко В. Ф., Лихочвор В. В., Іванюк С. В., Корнійчук О. В., Колісник С. І., Кобак С. Я. … Береговенко С. К. Соя. Вінниця : Діло, 2016. 400 с.

2. Коць С. Я., Моргун В. В., Патыка В. Ф., Маличенко С. М., Маменко П. М., Киризий Д. А. … Мельникова Н. Н. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз. К. : Логос, 2011. Т. 2. 523 с.

3. Шевніков М. Я., Міленко О. Г., Лотиш І. І. Якісні показники насіння сої залежно від впливу мінеральних і бактеріальних добрив. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2014. № 4. С. 25–29.

4. Choudhary S., Zehra A., Mukarram M. Naeem M., Masroor M., Khan A., Hakeem K. R., Aftab T. An insight into the role of plant growth regulators in stimulating abiotic stress tolerance in some medicinally important plants. *Environmental Science*. 2021. С. 75–100. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_3

5. Kamran M., Wang D., Xie K., Lu Y., Shi C., Sabagh A. EL … Xu P. Pre-sowing seed treatment with kinetin and calcium mitigates salt induced inhibition of seed germination and seedling growth of choysum (Brassica rapa var. Parachinensis). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021. Vol. 227. P. 1–16. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112921

6. Yuan L.-Y., Du J., Yuan Y.-H., Shu S., Sun J., Guo S.-R. Effects of 24-epibrassinolide on ascorbate-glutathione cycle and polyamine levels in cucumber roots under $Ca(NO_3)_2$ stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013. Vol. 35, № l. P. 253–262. https://doi.org/10.1007/s11738-012-1071-2

7. Волкогон В. В., Дульнев П. Г. Влияние стимуляторов роста растений на процесс биологической азотфиксации. *Елементи регуляції в рослинництві*. К. : ВВП «Компас», 1998. С. 17–24.

8. Hayat S., Hasan S. A., Yusuf M., Hayat Q., Ahmad A. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ and Exvironmental Botany*. 2010. № 69. P. 105–112. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004

9. Agarwal L, Isar J., Meghwanshi G. K., Saxena R. K. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by Escherichia coli. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. № 100. P. 1348–1354. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02894.x

10. Zeikus J. G., Jain M. K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derivedindustrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. № 51. P. 545–552.

11. Puglisi E., Pascazio S., Suciu N., Cattani I., Fait G., Spaccini R., Crecchio C., Piccolo A., Trevisan M. Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration*. 2013. № 129. P. 82–94. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.006

12. Yeomans C. V., Porteous F., Paterson E., Meharg A. A., Killham K. Assessment of lux-marked *Pseudomonas fluorescens* for reporting on organic carbon compounds. *FEMS Microbiology Letters*. 1999. № 176. P. 79–83.

13. Мазур В. А., Гончарук І. В., Панцирева Г. В., Телекало Н. В. Агроекологічне обґрунтування технологічних прийомів вирощування зернобобових культур. Вінниця : ТВОРИ, 2020. 192 с.

14. Моргун В. В., Коць С. Я., Кириченко Е. В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41, № 3. С. 187−204.

15. Івасюк Ю. І., Карпенко В. П., Грицаєнко З. М. Симбіотичний стан посівів сої за дії біологічно активних речовин. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2015. № 2. С. 13−16.

16. Мурач О. М., Волкогон В. В. Особливості формування симбіотичного апарату сої та продуктивність культури за впливу Ризогуміну, мікроелементів і стимулятора росту рослин. *Сільськогосподарська мікробіологія.* 2013. Т. 18. С. 87–99. https://doi.org/10.35868/1997-3004.18.89-99

17. Сальник В. П., Волкогон В. В., Мальцева Н. М., Мамчур О. Е. Вплив інокуляції і регулятора росту триман-1 на активність азотфіксації, розвиток та формування симбіозу люцерни з бульбочковими бактеріями. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2001. Т. 33., № 6.

С. 87–99.

18. Сайко В. Ф. Землеробство в сучасних умовах. *Вісник аграрної науки*. 2002. № 5. С. 5–10.

19. Child J. J. Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. association with nonleguminous plant cell cultures. *Nature*. 1975. Vol. 253. P. 350–351.

20. Коць С. Я., Воробей Н. А., Кириченко О. В., Мельникова Н. М., Михалків Л. М., Пухтаєвич П. П. Мікробіологічні препарати для сільського господарства. К. : Логос, 2016. 48 с.

21. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 1968. Vol. 43. P. 1185–1207.

22. Гізбулін Н. Г., Чернелівська О. О., Олекшій Л. М., Будовський М. Д., Даньков В. Я., Осадчук В. Д. … Черната Д. М. Янтарна кислота — ефективний регулятор росту рослин. *Цукрові буряки*. 2009. № 2. С. 4–5.

23. An Y., Zhou P., Xiao Q., Shi D. Effects of foliar application of organic acids on alleviation of aluminum toxicity in Alfalfa. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2014. Vol. 177, № 3. P. 421–430. https://doi.org/10.1002/jpln.201200445

24. Воробей Н. А., Коць С. Я., Маменко П. М. Реалізація азотфіксувального потенціалу Tn5-мутантів Bradyrhizobium japonicum у симбіозі з рослинами сої. *Biotechnologia acta*. 2013. Т. 6, № 5. С. 122–130.

25. Finan T. M., Wood J. M., Jordan D. C. Succinate transport in Rhizobium leguminosarum. *Journal of bacteriology*. 1981. Vol. 148, №. 1. P. 193–202.

26. Bergersen F. J., Turner G. L. Nitrogen fixation by the fraction of breis of soybean root nodules. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1967. Vol. 141, № 3. P. 507–515. https://doi.org/10.1016/0304-4165(67)90179-1

Отримано 22.07.2022

https://doi.org/10.35868/1997-3004.36.36-46
UDC 579:581.1:631.86:631.847.211:632.952

REACTION OF FREE-LIVING AND SYMBIOTIC *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ON THE USE OF SUCCINIC ACID

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

Institute of plant physiology and genetics, NAS of Ukraine, Kyiv
e-mail: veselika@ukr.net

Objective. *Find out the influence of different concentrations of succinic acid on the intensity of growth of Bradyrhizobium japonicim and the activity of symbiotic systems created with their participation.* ***Methods.*** *Microbiological, physiological, statistical, gas chromatography.* ***Results.*** *It was found that the T21-2 strain had a more pronounced reaction to the use of succinic acid than the PC08 strain, regardless of its concentration. Addition of succinic acid to the culture medium of rhizobia at a concentration of 0.01 and 0.02 g/L led to an increase in the titre of bacterial cells of T21-2 and PC08 strains, while at a concentration of 0.2 g/L it had a toxic effect on the studied strains. Succinic acid at a concentration of 0.01 g/L, both during seed treatment and as a component of the inoculation suspension, significantly activated the processes of formation and functioning of soybean symbiotic systems formed by the T21-2 rhizobia strain. At a concentration of 0.02 g/L, it provided the highest rate of growth of bacterial cells among the studied variants and led to an increase in their titre relative to rhizobia without adding acid, both on day three and four of cultivation. At the same time, regardless of the method of application, this concentration of succinic acid partially inhibited the nodulation activity of T21-2 strain and the nitrogen-fixing activity of the symbiotic systems formed with their participation.* ***Conclusion.*** *Based on the revealed effect of succinic acid on the growth of Bradyrhizobium japonicum in pure culture and on the formation and functioning of symbiosis, we recommend adding succinic acid at a concentration of 0.01 g/L, both as a component of the inoculation suspension, and for pre-sowing seed treatment to increase the activity of soybean-rhizobia symbiotic systems.*

Key words: *Bradyrhizobium japonicum, succinic acid, nitrogen-fixing activity, legume-rhizobia symbiosis, soybean.*

REFERENCES

1. Petrychenko, V. F., Lykhochvor, V. V., Ivaniuk, S. V., Korniichuk, O. V., Kolisnyk, S. I., Kobak, S. Ya. … Berehovenko, S. K. (2016). *Soia* [Soya]. Vinnytsia: Dilo [in Ukrainian].

2. Kots, S. Ya., Morhun, V. V., Patyka, V. F., Malychenko, S. M., Mamenko, P. M., Kyryzyi, D. A. … Melnykova, N. N. (2011). *Byolohycheskaia fyksatsyia azota: bobovo-ryzobialnyi symbyoz* [Biological nitrogen fixation: legume-rhizodial symbiosis]. Vol. 2. Kiev: Lohos [in Ukrainian].

3. Shevnikov, M. Ya., Milenko, O. H., & Lotysh, I. I. (2014). Yakisni pokaznyky nasinnia soi zalezhno vid vplyvu mineralnykh i bakterialnykh dobryv [Qualitative indicators of soybean seeds depending on the influence of mineral and bacterial fertilizers]. *Visnyk Poltavskoi derzhavnoi ahrarnoi akademii — Bulletin of Poltava State Agrarian Academy, 4*, 25–29 [in Ukrainian].

4. Choudhary, S., Zehra, A., Mukarram, M. Naeem, M., Masroor, M., Khan, A. … Aftab T. (2021). An insight into the role of plant growth regulators in stimulating abiotic stress tolerance in some medicinally important plants. *Environmental Science,* 75–100. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61153-8_3

5. Kamran, M., Wang, D., Xie, K., Lu, Y., Shi, C., Sabagh, A. EL … Xu P. (2021). Pre-sowing seed treatment with kinetin and calcium mitigates salt induced inhibition of seed germination and seedling growth of choysum (Brassica rapa var. Parachinensis). *Ecotoxicology and Environmental Safety, 227*, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112921

6. Yuan, L.-Y., Du, J., Yuan, Y.-H., Shu, S., Sun, J., & Guo, S.-R. (2013). Effects of 24-epibrassinolide on ascorbate-glutathione cycle and polyamine levels in cucumber roots under $Ca(NO_3)_2$ stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*(l), 253–262. https://doi.org/10.1007/s11738-012-1071-2

7. Volkohon, V. V., Dulnev, P. H. (1998). Vlyianye stymuliatorov rosta rastenyi na protsess byolohycheskoi azotfyksatsyy. [Influence of plant growth stimulants on the process of biological nitrogen fixation.] In *Elementy rehuliatsii v roslynnytstvi* (pp. 17–24). Kiev: VVP Kompas [in Russian].

8. Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q., & Ahmad, A. (2010). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environ and Exvironmental Botany*, *69*, 105–112. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.03.004

9. Agarwal, L, Isar, J., Meghwanshi, G. K., & Saxena, R. K. (2006). A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by Escherichia coli. *Journal of Applied Microbiology, 100*, 1348–1354. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02894.x

10. Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derivedindustrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, 545–552.

11. Puglisi, E., Pascazio, S., Suciu, N., Cattani, I., Fait, G., Spaccini, R. … Trevisan, M. (2013). Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration, 129*, 82–94. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.006

12. Yeomans, C. V., Porteous, F., Paterson, E., Meharg, A. A., & Killham, K. (1999). Assessment of lux-marked Pseudomonas fluorescens for reporting on organic carbon compounds. *FEMS Microbiology Letters, 176*, 79–83.

13. Mazur, V. A., Honcharuk, I. V., Pantsyreva, H. V., & Telekalo, N. V. (2020). *Ahroekolohichne obgruntuvannia tekhnolohichnykh pryiomiv vyroshchuvannia zernobobovykh kultur* [Agroecological substantiation of technological methods of growing legumes] Vinnytsia: TVORY [in Ukrainian].

14. Morhun, V. V., Kots, S. Ya., & Kyrychenko, E. V. (2009). Roststymulyruiushchye ryzobakteryy y ykh praktycheskoe prymenenye. [Growth promoting rhizobacteria and their use on practice] *Fyzyolohyia y byokhymyia kulturnykh rastenyi, 41*(3)*,* 187−204 [in Russian].

15. Ivasiuk, Yu. I., Karpenko, V. P., & Hrytsaienko, Z. M. (2015). Symbiotychnyi stan posiviv soi za dii biolohichno aktyvnykh rechovyn. [Symbiotic condition of crops soybean under the influence of biologically active substance]. *Visnyk Umanskoho natsionalnoho universytetu sadivnytstva — Bulletin of Uman National University of Horticulture, 2*, 13−16 [in Ukrainian].

16. Murach, M. O., Volkohon, V. V. (2013). Osoblyvosti formuvannia symbiotychnoho aparatu soi ta produktyvnist kultury za vplyvu Ryzohuminu, mikroelementiv i stymuliatora rostu roslyn. [Peculiarities of soybean symbiotic apparatus formation and crops productivity under the influence of Rhizohumin, micronutrients and plant growth stimulator]. *Agricultural microbiology — Silskohospodarska mikrobiolohiia, 18,* 87–99. https://doi.org/10.35868/1997-3004.18.89-99 [in Ukrainian].

17. Salnyk, V. P., Volkohon, V. V., Maltseva, N. M., & Mamchur, O. E. (2001). Vplyv inokuliatsii i rehuliatora rostu tryman-1 na aktyvnist azotfiksatsii, rozvytok ta formuvannia symbiozu liutserny z bulbochkovymy bakteriiamy [The influence of inoculation and the growth regulator triman-1 on the activity of nitrogen fixation, the development and formation of symbiosis of alfalfa with nodule bacteria]. *Physiology and biochemistry of cultivated plants — Fyzyolohyia y byokhymyia kulturnykh rastenyi, 33*(6)*,* 87–99 [in Ukrainian].

18. Saiko, V. F. (2002). Zemlerobstvo v suchas-

nykh umovakh [Agriculture in modern conditions]. *Visnyk ahrarnoi nauky — Bulletin of Agricultural Science, 5,* 5–10.

19. Child, J. J. (1975). Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. association with nonleguminous plant cell cultures. *Nature, 253*, 350–351.

20. Kots, S. Ya., Vorobei, N. A., Kyrychenko, O. V., Melnykova, N. M., Mykhalkiv, L. M., & Pukhtaievych, P. P. (2016). *Mikrobiolohichni preparaty dlia silskoho hospodarstva*. [Microbiological preparations for agriculture] Kiev: Lohos [in Ukrainian].

21. Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology, 43,* 1185–1207.

22. Hizbulin, N. H., Chernelivska, O. O., Olekshii, L. M., Budovskyi, M. D., Dankov, V. Ya., Osadchuk, V. D. … Chernata, D. M. (2009). Yantarna kyslota — efektyvnyi rehuliator rostu roslyn [Succinic acid is an effective plant growth regulator]. *Tsukrovi buriaky — Sugarbeet, 2,* 4–5 [in Ukrainian].

23. An, Y., Zhou, P., Xiao, Q., & Shi, D. (2014). Effects of foliar application of organic acids on alleviation of aluminum toxicity in Alfalfa. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *177*(3), 421–430. https://doi.org/10.1002/jpln.201200445

24. Vorobey, N. A., Kots, S. Ya., & Mamenko, P. M. (2013). Realization of nitrogen fixation potential of Tn5-mutants Bradyrhizobium japonicum in symbiosis with soybean plants. *Biotechnologia acta, 6*(5), 122–130.

25. Finan, T. M., Wood, J. M., & Jordan, D. C. (1981). Succinate transport in Rhizobium leguminosarum. *Journal of bacteriology*, *148*(1), 193–202.

26. Bergersen, F. J., Turner, G. L. (1967). Nitrogen fixation by the fraction of breis of soybean root nodules. *Biochimica et Biophysica Acta, 141*(3)*,* 507–515. https://doi.org/10.1016/0304-4165(67)90179-1

Received 22.07.2022