

Д. В. Крутило, кандидат біологічних наук

М. А. Ушакова

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

С. І. Колісник, С. В. Іванюк, С. Я. Кобак, кандидати

сільськогосподарських наук

Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН

ШТАМ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ З ПІДВИЩЕНОЮ САПРОФІТНОЮ КОМПЕТЕНТНІСТЮ ЯК ОСНОВА БІОПРЕПАРАТІВ

*Отримано новий високоефективний штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* KB11 з інтенсивним ростом та підвищеною сапрофітною компетентністю (приживаністю у ґрунті). Застосування цього штаму як біоагента мікробних препаратів сприяє формуванню в ґрунтах активних місцевих популяцій бульбочкових бактерій сої та забезпечує стабільне підвищення урожайності зерна сої різних сортів на 15,9—31,5 %.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum, біопрепарати, конкурентоспроможність, сапрофітна компетентність, соя.*

Відомо, що для підвищення врожайності бобових культур у сільськогосподарській практиці широко застосовуються мікробні препарати на основі високоефективних штамів бульбочкових бактерій [1].

В останні десятиліття в Україні при вирощуванні сої інтенсивно використовувались як вітчизняні, так і закордонні біопрепарати. Це сприяло формуванню в агроценозах місцевих популяцій специфічних бульбочкових бактерій сої. Проведені нами дослідження показали, що ґрунтові популяції ризобій різняться за щільністю та якісним складом і є досить гетерогенними. У результаті аналізу морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та генетичних властивостей штамів ризобій сої, виділених із ґрунтів різних регіонів України, нами вперше виявлені бульбочкові бактерії [2, 3, 4], які істотно відрізняються від типових повільно рослих симбіонтів сої виду *Bradyrhizobium japonicum*, описаних раніше [5]. Виділені штами характеризуються підвищеною швидкістю росту і були умовно названі «штамами з інтенсивним ростом».

Співвідношення між повільно та інтенсивно рослими штамами змінюється в залежності від ґрунтово-кліматичної зони. У деяких регіонах України штами з інтенсивним ростом виступають домінуючим компонентом популяцій ризобій сої [3], що може свідчити про їхню високу конкуре-

нтоспроможність та сапрофітну компетентність (сапрофітна компетентність визначається як здатність штамів тривалий час зберігатися у ґрунті, займаючи свою екологічну нішу).

Слід зазначити, що ґрунтові популяції бульбочкових бактерій сої можна розглядати як джерело господарсько-цінних штамів, а з іншого боку, вони можуть виступати конкурентами біоагентів мікробних препаратів. У зв'язку із стрімким зростанням в Україні посівних площ під соєю та збільшенням щільності місцевих популяцій ризобій актуальним залишається пошук нових активних та конкурентоспроможних штамів. Притаманна інтенсивно рослим бульбочковим бактеріям властивість краще приживатися у ґрунті може бути використана на практиці в селекції вискоєфективних штамів та розробці на їх основі нових мікробних препаратів для підвищення урожайності цієї культури.

Метою даної роботи було одержати новий вискоєфективний штам бульбочкових бактерій сої, який, відрізнявся би інтенсивним ростом, підвищеною сапрофітною компетентністю і як біоагент бактеріальних препаратів забезпечував стабільно високий урожай зерна сої.

Матеріали і методика досліджень. Бульбочкові бактерії сої виділяли з кореневих бульбочок культурної сої (*Glycine max* L.). Ефективність та приживаність нового перспективного штаму *Bradyrhizobium japonicum* вивчали у вегетаційних, польових та виробничих дослідах.

Веgetаційні досліді проводили на дерново-підзолистому ґрунті з численною популяцією бульбочкових бактерій сої в посудинах ємністю 2 л. Використовували насіння сої сортів Устя, Ленінградська 5, Шара, Бейхудо, Lambert, Корада, Labrador, Sito, IS-14, Войва, Proteinka (надані ННЦ «Інститут землеробства НААН» та Інститутом кормів та сільського господарства Поділля НААН). Вологість підтримували на рівні 60 % ПВ. Повторність дослідів – 4–6 кратна. Ідентифікацію штамів ризобій сої в бульбочках здійснювали за допомогою реакції аглютинації з використанням антисироваток 46, M8, 6346 та KB11 [3]. Частку нового інтенсивно рослого штаму *B. japonicum* KB11 в бульбочках визначали, враховуючи приналежність його до серогрупи KB11.

На основі інтенсивно рослого штаму *B. japonicum* KB11 розроблено та виготовлено експериментальні партії біопрепаратів Ризобіфит та Ризогумін.

Ефективність та приживаність перспективного штаму *B. japonicum* KB11 як біоагенту твердої (торф'яна) форми препарату Ризобіфиту перевіряли в польових дослідях у ґрунтово-кліматичних умовах Полісся України (дослідні поля Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН), м. Чернігів. Тип ґрунту – чорнозем вилугуваний. Сорт сої Устя. Повторність дослідів – чотирикратна. Площа облікових ділянок – 6 м².

Виробнича перевірка проводилась в ДП «Науковий інноваційно-технологічний центр» Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН, с. Агрономічне, Вінницького р-ну, Вінницької обл. Тип ґрунту – сірий лісовий. Сорт сої – КиВін. Насіння сої протруювали Вітаваксом 200 ФФ (2,5 л/т) за тиждень до інокуляції. У день посіву насіння обробляли біопрепаратом Ризогумін. Система захисту від бур'янів – Харнес (2,2 л/га), у фазі 3-й трійчастий листок Базагран (1,8 л/га) + Хармоні (7 г/га), через п'ять днів після страхової бакової суміші – гербіцид Пантера (1,6 л/га). Обсяг виробничої перевірки: – 12 га.

Активність азотфіксації визначали ацетиленовим методом на газово-му хроматографі “Chrom-4”. Статистичну обробку даних проводили за методикою Б. О. Доспехова [6], та застосовували комп'ютерну програму Statistica 7.0.

Результати досліджень. Методом аналітичної селекції нами отримано новий штам бульбочкових бактерій сої *B. japonicum* KB11, який характеризується інтенсивним ростом. Штам виділений з численної популяції бульбочкових бактерій сої сірого лісового ґрунту (дослідні поля Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН).

Штам *B. japonicum* KB11 відрізняється від традиційних повільно рослих ризобій сої більш швидким накопиченням бактеріальної маси при культивуванні у рідкому середовищі. Через 72 години культивування титр бактерій сягав $3\text{--}4 \times 10^9$ КУО/мл, що характеризує штам як більш технологічний при виробництві біопрепаратів. Штам депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за реєстраційним номером *Bradyrhizobium japonicum* B-7435.

Здатність нового інтенсивно рослого штаму *B. japonicum* KB11 зберігатися в ґрунті вивчали у польових дослідках на чорноземі вилугуваному. Приживаність його порівнювали з трьома повільно рослими штамми бульбочкових бактерій сої. У перший рік досліджень рослини сої інокулювали штамом *B. japonicum* KB11 з інтенсивним ростом, а також повільно рослими штамми *B. japonicum* M8, *B. japonicum* 46 і *B. japonicum* 6346. Восени після відмирання бульбочок та навесні поле переорювали, забезпечуючи рівномірний розподіл всіх інтродукованих штамів у ґрунті. На другий, третій і четвертий роки досліджень сою вирощували на тому ж самому полі, але насіння не інокулювали. Приживаність штамів у ґрунті визначали за їхньою часткою у сформованих бульбочках серологічним методом.

Як видно з даних табл. 1, новий інтенсивно рослий штам *B. japonicum* KB11 добре приживався в чорноземі вилугуваному. Він домінував у бульбочках сої протягом трьох років (71,7–100,0 %) порівняно із повільно рослими штамми *B. japonicum* M8, *B. japonicum* 46 та *B. japonicum* 6346, частка яких вже на другий рік вирощування сої у монокультурі зменшилася від 100,0 до 3,3–20,0 %. Найменше бульбочок (3,3 %) на коренях сої утворювалося за участі штаму *B. japonicum* M8. На четвер-

тий рік досліджень бульбочки на коренях сої були утворені лише новим штамом із інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11, що є доказом його підвищеної сапрофітної компетентності та високої конкурентоспроможності.

1. Приживаність штамів ризобій сої у ґрунті та їх азотфіксувальна активність (польові досліді, ІСМАВ НААН, 2008—2011 рр.)

Рік досліджень	Варіанти досліді	Частка штамів бульбочкових бактерій сої у бульбочках, %				Активність азотфіксації, мкг N/рослину за год.	Активність азотфіксації за інокуляції <i>B. japonicum</i> M8, мкг N/рослину за год.
		46	M8	KB11	6346		
2008	Інокуляція <i>B. japonicum</i> 46	100,0	0	0	0	33,3 ± 3,6	—
	Інокуляція <i>B. japonicum</i> M8	0	100,0	0	0	29,8 ± 3,9	—
	Інокуляція <i>B. japonicum</i> KB11	0	0	100,0	0	30,2 ± 3,5	—
	Інокуляція <i>B. japonicum</i> 6346	0	0	0	100,0	15,3 ± 1,2	—
2009	Без інокуляції	20,0	3,3	71,7	5,0	30,0 ± 1,5	—
2010	Без інокуляції	8,3	0	91,7	0	11,7 ± 1,0	10,0 ± 0,6
2011	Без інокуляції	0	0	100,0	0	22,7 ± 1,5	19,0 ± 1,3

Крім того, активність симбіотичної азотфіксації сої в монокультурі за умов домінування в бульбочках нового інтенсивно рослого штаму *B. japonicum* KB11 (другий-четвертий роки) була достатньо високою (11,7—30,0 мкг N/рослину за год.) та не відрізнялася від інтенсивності фіксації молекулярного азоту повільно рослим штамом *B. japonicum* M8 (10,0—19,0 мкг N/рослину за год.). Даний факт є доказом формування у ґрунті активної місцевої популяції ризобій сої, яка здатна забезпечувати рослини біологічним азотом і представлена в основному новим штамом з інтенсивним ростом *B. japonicum* KB11.

Наступним етапом нашої роботи було дослідити приживаність інтенсивно рослого штаму у дерново-підзолистому ґрунті. Для цього, шляхом вирощування сої, інокульованої повільно та інтенсивно рослими штамми *Bradyrhizobium japonicum*, була створена місцева популяція бульбочкових бактерій сої. У вегетаційному досліді на відібраних зразках ґрунту із сформованою популяцією ризобій сої вивчали здатність її представників утворювати симбіоз із 10 сортами сої різного географічного походження. Ідентифікацію бульбочкових бактерій у кореневих бульбочках здійснювали за допомогою набору антисироваток до різних штамів ризобій сої. Результати досліджень наведені у табл. 2.

2. Частка повільно та інтенсивно рослих штамів ризобій сої у бульбочках сої різних сортів (вегетаційний дослід)

Сорти сої	Країна походження	Частка штамів бульбочкових бактерій сої у бульбочках, %				
		46	M8	KB11	6346	Інші*
Устя	Україна	0	0	66,7	0	33,3
Ленінградська 5	Росія	0	0	87,5	0	12,5
Шара	Білорусь	4,2	0	66,6	0	29,2
Бейхудо	Китай	12,5	4,2	79,1	0	4,2
Lambert	США	4,2	4,2	75,0	0	16,6
Корада	Канада	16,7	0	70,8	0	12,5
Labrador	Франція	0	0	66,7	0	33,3
Sito	Німеччина	12,5	0	50,0	0	37,5
IS-14	Угорщина	4,2	0	70,8	0	25,0
Войва	Литва	12,5	0	58,3	0	29,2
Proteinka	Сербія	8,3	0	79,2	0	12,5

Примітка.* – бульбочкові бактерії сої не віднесені до відомих серогруп.

На коренях рослин сої виявлені бульбочки, утворені ризобіями, які належать до серологічних груп 46, M8 та KB11. Певна частка бульбочок формувалася за участі бульбочкових бактерій сої не віднесених до відомих серогруп. Слід відмітити, що в бульбочках усіх сортів домінував новий інтенсивно рослий штам *B. japonicum* KB11. Його частка варіювала в межах від 50,0 % (сорт Sito) до 87,5 % (сорт Ленінградська). Повільно росли бульбочкові бактерії серогрупи 46 та M8 виявлені в бульбочках у мінорних кількостях. Штам *B. japonicum* 46 інфікував рослини сої восьми сортів, утворюючи 4,2–16,7 % бульбочок. Кількість бульбочок сформованих за участі штаму *B. japonicum* M8 була низькою – лише 4,2 % бульбочок на двох сортах Бейхудо та Lambert.

Отримані дані свідчать про екологічну пластичність нового штаму *B. japonicum* KB11. Він добре приживається у ґрунті, має високу конкурентоспроможність та сумісний з широким спектром сортів різного географічного походження.

Слід відмітити, що досліджуваний штам здатний комплексно впливати на розвиток сої: посилювати процеси фотосинтезу та симбіотичної азотфіксації, суттєво підвищувати зернову продуктивність цієї культури.

Ефективність штаму *B. japonicum* KB11, як біоагенту твердої (торф'яна) форми препарату Ризобофіту, перевіряли у польових дослідках в умовах Полісся України як за відсутності специфічних ризобій у ґрунті, так і на фоні місцевих популяцій цих мікроорганізмів.

Інтенсивно рослий штам *B. japonicum* KB11 є високоефективним (табл. 3), він сприяє збільшенню урожайності сої в середньому за два роки на 24,7 % порівняно до контролю (за відсутності місцевої популяції ризобій сої у ґрунті).

3. Вплив інокуляції Ризобофітом на насіннєву продуктивність сої сорту Устя за відсутності у ґрунті специфічних ризобій (польові досліді, ІСМАВ НААН, 2010—2011 рр.)

Варіанти досліді	Урожайність, т/га			Приріст до контролю, %
	роки			
	2010	2011	Середнє	
Контроль (без інокуляції)	1,50	2,46	1,98	100,0
Ризобофіт (<i>B. japonicum</i> M8)	1,72	3,10	2,41	121,7
Ризобофіт (<i>B. japonicum</i> KB11)	1,76	3,18	2,47	124,7
НІР ₀₅	0.16	0.15		

Штам *B. japonicum* KB11 як біоагент Ризобофіту добре проявляє себе також за наявності у ґрунті різних за щільністю місцевих популяцій ризобій сої, що підтверджує його конкурентоспроможність та ефективність (табл. 4). Інокуляція новим штамом сприяла стабільному збільшенню урожайності сої в середньому за три роки на 0,38 т/га порівняно до контролю.

4. Вплив інокуляції Ризобофітом на насіннєву продуктивність сої сорту Устя на фоні місцевих популяцій специфічних ризобій (польові досліді, ІСМАВ НААН, 2012—2014 рр.)

Варіанти досліді	Урожайність, т/га				Приріст до контролю, %
	роки				
	2012	2013	2014	Середнє	
Контроль (без інокуляції)	2,55	2,23	2,39	2,39	100,0
Ризобіфіт (<i>B. japonicum</i> KB11)	2,88	2,55	2,88	2,77	115,9
НІР ₀₅	0.15	0.23	0.15		

Ефективність штаму *B. japonicum* KB11 перевіряли також у виробничому досліді в зоні центрального Лісостепу України за наявності у ґрунті щільної популяції ризобій сої. Штам досліджували як біоагент комплексного препарату Ризогуміну. Дані, наведені в табл. 5, свідчать, що бактеризація насіння новим інтенсивно рослим штамом сприяла підвищенню продуктивності сої сорту КиВін на рівні високоефективного повільно рослого штаму *B. japonicum* 46 і становила 31,5 % порівняно до контролю.

Це зумовлено тим, що штам є активним симбіотичним азотфіксатором, спроможним колонізувати кореневу систему сої. А його підвищена здатність до виживання у ґрунті є важливою для формування стабільної популяції бульбочкових бактерій, здатної активно постачати зв'язаний азот рослинам.

Розрахунки економічної ефективності застосування Ризогуміну на основі штаму *B. japonicum* KB11 при вирощуванні сої вказують, що даний агрозахід є економічно вигідним. Умовно чистий прибуток становив 6685 грн./га при рівні рентабельності 113 %.

5. Вплив обробки насіння Ризогуміном на продуктивність сої сорту КиВін (виробничий дослід, ДП «Науковий інноваційно-технологічний центр ІКСГП НААН», 2014 р.)

Варіанти дослідів	Урожайність зерна, т/га	Приріст урожаю,	
		т/га	%
Без інокуляції (контроль)	1,84	—	100,0
Ризогумін (<i>B. japonicum</i> 46)	2,38	0,54	129,3
Ризогумін (<i>B. japonicum</i> KB11)	2,42	0,58	131,5
HIP ₀₅	0,12		

Висновки. Методом аналітичної селекції отримано новий високоефективний штам *B. japonicum* KB11, який характеризується інтенсивним ростом. Він більше пристосований до різних ґрунтово-кліматичних умов України та жорсткої внутрішньовидової конкуренції між представниками місцевих популяцій специфічних ризобій. Крім того, цей штам характеризується підвищеною сапрофітною компетентністю, він здатний формувати активну місцеву популяцію бульбочкових бактерій сої у ґрунті і як представник цієї популяції домінувати у бульбочках. Використання штаму *B. japonicum* KB11 як біоагента препаратів Ризобіофіт та Ризогумін забезпечує стабільне підвищення урожайності сої різних сортів на 15,9–31,5 %.

Бібліографічний список

1. Біологічний азот / В. П. Патика, С.Я. Коць, В. В. Волкогон та ін. / За ред. В. П. Патики – К.: Світ, 2003. – 424 с.
2. Крутило Д. В. Біологічна різноманітність бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України / Д. В. Крутило, О. В. Надкернична, Т. М. Ковалевська, В. П. Патика // Мікробіол. журн. – 2008. – Т. 70, – № 6. – С. 27–34.
3. Крутило Д. В. Серологічне різноманіття бульбочкових бактерій сої у ґрунтах України / Д. В. Крутило, І. В. Волкова // Агроекологічний журнал. – 2012. – № 4. – С. 66–71.
4. Крутило Д. В. Генотипический анализ клубеньковых бактерий, нодулирующих сою в почвах Украины / Д. В. Крутило, В. С. Зотов // Экологическая генетика. – 2013. – № 4. – С. 86–95.
5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A + B + C.* // Eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. Editor-in-chief G. M. Garrity. – New York, NY: Springer SBM, 2nd ed., 2005. – Vol. 2. – 2800 p.
6. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 352 с.

Надійшла до редколегії 16. 06. 2015 року