НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ АГРОЕКОЛОГІЇ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ

ГУМЕНЮК ІРИНА ІГОРІВНА

УДК 579.26:573.4:58.071:579.841.31

ЕКОЛОГО-БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ІЗ ҐРУНТІВ УКРАЇНИ

03.00.16 «Екологія»

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті агроекології і природокористування Національної академії аграрних наук України.

Науковий керівник: доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник
Дем'янюк Олена Сергіївна,
Інститут агроекології і природокористування НААН,
заступник директора з наукової роботи.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Волошина Наталія Олексіївна,
Національний педагогічний університет імені М.П. Драгоманова,
завідувач кафедри екології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Копилов Євгеній Павлович,
Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,
головний науковий співробітник лабораторії рослинно-мікробних взаємодій.

Захист відбудеться «28» травня 2019 р. об 11-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.371.01 в Інституті агроекології і природокористування НААН за адресою: вул. Метрологічна, 12, м. Київ, Україна, 03143.

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту агроекології і природокористування НААН за адресою: вул. Метрологічна, 12, м. Київ, Україна, 03143.

Автореферат розіслано «26» квітня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат сільськогосподарських наук К.В. Коцовська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Біологічна фіксація азоту мікроорганізмами – один із важливих біохімічних процесів біосферного значення. Щороку близько 190 млн т азоту фіксується на поверхні суші, 30–130 млн т – у водних екосистемах (Патика та ін., 1982). Біологічна азотфіксація забезпечує рослини доступними формами азоту, не порушуючи екологічний стан навколишнього природного середовища (Мішустін, 1962; Умаров, 1982; Волкогон, 1997; Надкернична, 2004; Шерстобоєва, 2011; Копилов, 2011; Чабанюк, 2015).

Особливістю бульбочкових бактерій є здатність формувати симбіоз із бобовими рослинами та фіксувати азот із повітря, використовуючи продукти фотосинтезу. Бобово-ризобіальний симбіоз є важливим біосферним процесом, що забезпечує синтез високобілкової органічної речовини (Надкернична, 2004; Тихонович, 2009; Патика, 2010).

Результати досліджень вітчизняних та закордонних науковців свідчать, що висококонкурентні штами бульбочкових бактерій здатні забезпечувати високу азотфіксувальну активність, нодулюючу здатність та формування симбіотичної взаємодії з рослинами, але через адаптацію їх ферментних систем до сапротрофного існування у ґрунті з роками знижується активність цих процесів (Проворов, 2003; Крутило, 2006; Downie, 2007; Pessi, 2007; Кожемяков, 2011). Також відомо, що екологічні чинники середовища: вологість ґрунту, аерація, температура, рівень pH, пестицидне навантаження впливають на біологічні властивості бактерій та їх функціональну активність (Патика та ін., 2003; Волошина, 2015).

Отже, оцінка властивостей ізолятів *Bradyrhizobium japonicum*, виділених з ґрунту, що забезпечують ефективне функціонування штучно сформованих симбіотичних систем з *Glycine max* (L.) Merrill, є актуальним завданням екології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконано впродовж 2015–2018 рр. в Інституті агроекології і природокористування НААН у межах програми наукових досліджень Національної академії аграрних наук України 06 «Науково-екологічні основи формування збалансованих агроекосистем України в умовах глобальних змін клімату» за завданнями «Розробити науково-методичні основи оптимізації мікробних угруповань ґрунтів в агроекосистемах» (ДР № 0116U000744), «Розробити науково-методичні основи оцінювання ґрунтового біорізноманіття агроекосистем молекулярно-генетичними методами» (ДР № 0116U000743).

Мета і завдання дослідження. *Мета* – з'ясувати еколого-біологічні особливості ізолятів *Bradyrhizobium japonicum,* адаптованих до умов чорноземних ґрунтів унаслідок тривалого існування у сапротрофному стані, що забезпечують формування та ефективне функціонування симбіотичної системи *B. japonicum* – *Glycine max* (L.) Merrill.

Досягнення мети передбачало виконання таких *завдань:*

– виділити у чисту культуру із чорноземних ґрунтів України активні ізоляти ризобій, які тривалий час перебували у сапротрофному стані, та ідентифікувати їх;

– оцінити здатність виділених ізолятів *B. japonicum* формувати симбіотичну систему з *Glycine max* (L.) Merrill;
– визначити нітрогеназну активність виділених ізолятів *B. japonicum* та вміст лег-гемоглобіну у бульбочках на коренях рослин сої;
– з'ясувати здатність виділених ізолятів *B. japonicum* до синтезу екзополісахаридів та визначити їх реологічні властивості;
– визначити у динаміці вплив екологічних чинників (pH, температура, хімічні протруйники, виділення насіння сої) на зберігання життєздатних клітин ізолятів *B. japonicum* на поверхні насіння сої;
– дослідити вплив виділених ізолятів *B. japonicum* на ріст, розвиток і формування фотосинтетичних показників рослин сої;
– встановити ефективність сформованої симбіотичної системи виділених ізолятів *B. japonicum* з *Glycine max* (L.) Merrill.

Об'єкт дослідження – формування та ефективне функціонування симбіотичної системи *B. japonicum – Glycine max* (L.) Merrill.

Предмет дослідження – еколого-біологічні особливості ізолятів *B. japonicum,* виділених із чорноземних ґрунтів, формування та функціонування симбіотичної бобово-ризобіальної системи.

Методи дослідження: *інформаційно-бібліографічний* – для узагальнення результатів досліджень вітчизняних і закордонних учених відповідно до мети та об'єкта досліджень; *польові* (стаціонарні, тимчасові) і *лабораторні* (екологічні, мікробіологічні, біохімічні, молекулярно-генетичні); *кореляційно-регресійний аналіз* – для з'ясування причинно-наслідкових зв'язків стану об'єкта дослідження від показників предмета дослідження; *математичної статистики* – для оброблення первинних експериментальних даних і оцінювання достовірності одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Виділено із чорноземних ґрунтів зони Лісостепу України високоактивні ізоляти *Bradyrhizobium japonicum,* що адаптувались до сапротрофного існування та не втратили своїх екологічних і біологічних властивостей, які забезпечують формування та ефективне функціонування симбіотичної системи з *Glycine max* (L.) Merrill.

Вперше:

– з чорноземного ґрунту виділено два конкурентоздатні ізоляти *B. japonicum* (LG 2 і LG 5), які зберегли здатність до активної симбіотичної взаємодії з *Glycine max* (L.) Merrill із високою нітрогеназною активністю;

– з'ясовано, що ізолят *B. japonicum* LG 5 найактивніше синтезує екзополісахариди, реологічні властивості яких вище порівняно з еталоном (препарат Ризоактив), а отже забезпечує довготривале зберігання на поверхні інокульованого насіння високий титр життєздатних клітин;

– встановлено, що ізоляти *B. japonicum* LG 2 і LG 5 є стійкими до впливу хімічних протруйників насіння Максим, Вітавакс 200 ФФ та Редіго М, що за завчасної обробки насіння не знижують інокуляційне навантаження бактеріальних клітин ризобій на насінні сої;

– доведено позитивний вплив інокуляції насіння сої виділеними ізолятами *B. japonicum* LG 2 і LG 5, які забезпечують формування високоефективної симбіотичної системи та підвищення урожайності та якості зерна;

– встановлено вплив таких екологічних чинників як температура та pH середовища на розвиток ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5. Визначено, що ізоляти здатні розвиватись у середовищі з інтервалом pH 4,5–8,5 та температурним режимом 17–39°C, що визначає їх технологічність при розробленні біологічних препаратів.

Набуло подальшого розвитку положення про еколого-біологічні особливості ізолятів *Bradyrhizobium japonicum,* особливості формування симбіотичного апарату, росту й розвитку інокульованих рослин сої.

Практичне значення одержаних результатів. Виділені високоефективні ізоляти бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* LG 2 і LG 5 може бути використано для створення нових високоефективних мікробних препаратів для сої, що забезпечать підвищення врожайності зерна на 20–29%, уміст білка в зерні до 6%.

Матеріали дисертації використовуються під час викладання курсу лекцій «Сільськогосподарська мікробіологія» та «Біогеохімічна діяльність мікроорганізмів» для підготовки фахівців освітнього рівня «магістр» на кафедрі мікробіології та імунології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора та завершеним науковим дослідженням. Автором самостійно виконано інформаційно-літературний пошук за темою дисертації, розроблено програму досліджень, сплановано й проведено лабораторні, вегетаційні та польові дослідження, сформульовано висновки, підготовлено методичні рекомендації. Друковані праці за темою дисертації підготовлено самостійно та у співавторстві. У працях, опублікованих у співавторстві, частка авторства здобувача полягає в плануванні й виконанні експериментальних досліджень, узагальненні та опрацюванні результатів, а також підготовленні рукописів до друку.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації представлено і обговорено на 8 міжнародних наукових конференціях: II та III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century» (Київ, 2016, 2018), I Міжнародній науково-практичній конференції «Збалансоване природокористування: традиції, перспективи і інновації» (Київ, 2017), I Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми екології та еволюції екосистем в умовах трансформованого середовища» (Київ, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічна безпека та збалансоване природокористування в агропромисловому виробництві» (Київ, 2017, 2018), XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioSience Advances» (Київ, 2017); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 16 наукових праць, у т.ч. 7 статей, з яких 6 – у фахових виданнях України, 8 – тез та матеріалів доповідей конференцій, 1 – методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота містить анотацію, вступ, п’ять розділів, висновки, список використаних джерел, додатки. Загальний обсяг дисертації викладено на 177 сторінках друкованого тексту. Робота проілюстрована 22 рисунками та 22 таблицями. Загальний список використаних джерел становить 254 найменувань, у т.ч. 169 латиницею.

Подяка. Автор висловлює щиру подяку колективу відділу агроекології і біобезпеки ІАП НААН, особливо доктору сільськогосподарських наук, професору О.В. Шерстобоєвій.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

БІОСФЕРНА ФУНКЦІЯ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ ТА ЇЇ ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ЕКОЛОГІЧНОГО СТАНУ АГРОЕКОСИСТЕМ

У розділі наведено огляд вітчизняних та закордонних літературних джерел із питань симбіотичної азотфіксації та покращення екологічного стану агроекосистем унаслідок застосування біологічних препаратів на основі високоактивних штамів бульбочкових бактерій. Проаналізовано наукові результати вчених щодо впливу екологічних чинників на формування та функціонування симбіотичної системи *Bradyrhizobium japonicum – Glycine max* (L.) Merrill.

На основі проведеного аналізу та узагальнення сучасної наукової літератури обґрунтовано актуальність теми дисертаційного дослідження.

УМОВИ ТА МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Науково-дослідні роботи виконано в 2015–2018 рр. у лабораторії екології мікроорганізмів відділу агроекології і біобезпеки Інституту агроекології і природокористування НААН.

Польові дослідження проведено в умовах дослідного поля відділу агроекології і біобезпеки Інституту агроекології і природокористування НААН (с. Білий Рукав, Хмільницький р-н, Вінницька обл., координати: 49°35´833´´N; 28 03´394´´E; 311.2 м над рівнем Чорного моря). Тип ґрунту – чорнозем типовий глибокий, середньо-суглинковий на карбонатному лесі, pH = 6,65. Уміст гумусу (за Тюріним) – 4,25%, нітрогену легкогідролізованих сполук (за Корнфілдом) – 124,25 мг/кг ґрунту, рухомого фосфору P_2O_5 (за Чиріковим) – 126, обмінного калію K_2O (за Чиріковим) – 119 мг/кг ґрунту. Розмір дослідної ділянки – 25 м^2, повторність – чотириразова, розміщення ділянок рендомізоване. Закладення польових та вегетаційних дослідів проводили за методикою Б. Доспєхова (1985).

Ізоляти *Bradyrhizobium japonicum* виділяли із чорноземного ґрунту з п’яти ділянок (нині переліг), де понад десять років не вирощували сільськогосподарські культури, зокрема і сою.

Відбір зразків ґрунту для мікробіологічних досліджень проведено відповідно до чинних ДСТУ (ДСТУ 4287:2004, ДСТУ ISO 10381-6-2001).

Дослідження стану ґрунтової мікробіоти та спрямування основних біохімічних процесів проводили загальноприйнятими в ґрунтовій мікробіології методами (Звягинцев, 1991; Волкогон та ін., 2010). Виділяли азотфіксувальні ізоляти бактерій методом аналітичної селекції (Okon, 1982). Морфологію бактеріальних клітин вивчали в живій однодобовій культурі з використанням мікроскопа при збільшенні ×1000 (OPTIKA SRL Microscopes – B-383PLi, Італія). Технологічні параметри росту культур мікроорганізмів визначали за Г. Нікітіним (1981).

Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості виділених ізолятів бактерій вивчали з використанням експрес-систем для ідентифікації бактерій API® (bioMérieux, США) та за встановленими ідентифікаційними ознаками. Ідентифікували нові ізоляти бактерій за визначником Берджі (2005) із подальшим уточненням назв родів.

Підтвердження виділених ізолятів бульбочкових бактерій до виду проводили молекулярно-генетичними методами. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили із застосуванням універсальних праймерів для ґрунтових бактерій за допомогою ампліфікатора Creacon Technologies 0005.400 (Нідерланди).

Нітрогеназну активність мікроорганізмів, чистих культур ізолятів бульбочкових бактерій визначали методом ацетиленредукції за допомогою газового хроматографа марки «Chrom-4» (Hardy, 1973).

Білок лег-гемоглобін, що є каталізатором процесу засвоєння атмосферного нітрогену, визначали ціанметгемоглобіновим методом (Wilson, Reisenaeur, 1963), оптичну щільність фільтрату реєстрували на спектрофотометрі Optizen 2120UV (Південна Корея).

Екзополісахариди (ЕПС) виділяли із супернатанта культуральної рідини осадженням та визначали гравіметричним методом (Sutherland, 1983). Реологічні властивості ЕПС, а саме динамічну в’язкість визначали за допомогою капілярного віскозиметра, оптичну щільність – на фотоелектроколориметрі PG INSTRUMENTS T60 UV-Visible (Велика Британія) за довжиною хвилі 600 нм.

Визначення поглинальної поверхні коренів здійснювали колориметричним методом Сабініна–Колосова (1962). Як адсорбат використовували розчин барвника (метиленовий синій). Оптичну щільність розчинів вимірювали на спектрофотометрі Optizen 2120UV (Південна Корея).

Площу листкової поверхні визначали відповідно до методики А. Нечипоровича (1975). Кількісне визначення хлорофілів a, b та каротиноїдів визначали спектрофотометричним методом за довжиною хвилі 644 нм (хлорофіл a), 662 нм (хлорофіл b), 652 нм (хлорофіли (a+b)) і 440,5 нм (каротиноїди) на приладі PG INSTRUMENTS T60 UV-Visible (Велика Британія) та підставляли у рівняння Хольм-Веттштейна. Маса сирих листків становила 0,1 г. Екстракцію проводили з використанням 100% ацетону (Туманов, 2007).

Визначення якості зерна сої (вмісту білка та олії) здійснювали за допомогою інфрачервоного аналізатора IM 8800 NIR Grain Analyzer Perten instruments (Швеція).

У польових умовах визначали ефективність інокуляції насіння сої виділеними ізолятами *B. japonicum.* Інокуляційне навантаження становило 10^4 КУО на

1 насінину сої. Для порівняння як еталон обрано вітчизняний біопрепарат Ризоактив у рідкій препаративній формі.

Математичний аналіз одержаних результатів здійснювали за допомогою стандартних комп'ютерних програм із використанням пакета програм Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) та Microsoft Excel 2010.

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ СИМБІОТИЧНИХ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ З ҐРУНТУ

Із 352 зразків чорнозему типового зони Лісостепу України нами виділено 34 ізоляти, що утворювали бульбочки на коренях рослин сої. За результатами морфологічних досліджень виділені ізоляти поділено на три групи – епіфітні мікроорганізми (38%), швидкорослі (29%) та повільнорослі (32%) бактерії (табл. 1).

Таблиця 1

Морфологічні і культуральні ознаки виділених ізолятів

Група	Присвоєна назва	Фарбування за Грамом	Морфологія колоній, доба появи	Розмір, мкм	Спори	Рухливість
Rhizobium (повільнорослі ризобії)	LG 1–11	Грам (–)	Біло-кремові, круглі, 1,0–2,0 мм колонії, край рівний, 7–10 доба	0,5–0,9× 1,2–3,0	–	+
Rhizobium (швидкорослі ризобії)	SF 12–21	Грам (–)	Біло-прозорі, круглі, 1,0–7,0 мм колонії, край рівний, 3–4 доба	2,3–2,5× 0,4–0,5	–	+
Bacillus (епіфітні бактерії)	BP 22–34	Грам (+)	Кремово-рожеві, зморшкуваті, 3,0–20,0 мм, край нерівний, 2 доба	2,0–5,0× 0,6–0,8	+	+

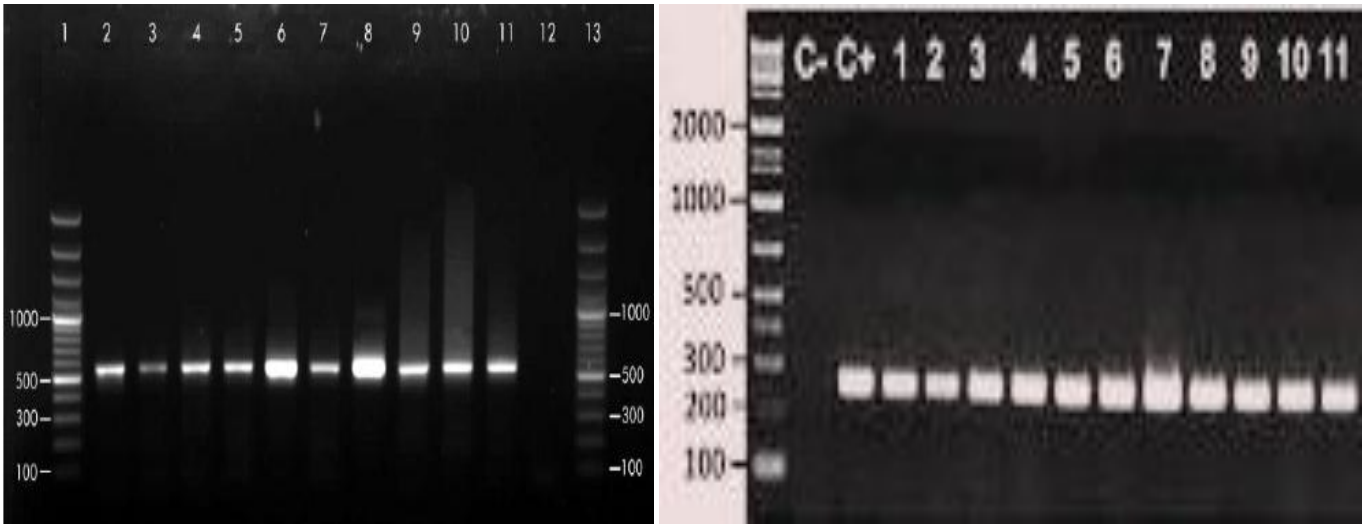
У чисту культуру було виділено 11 бактеріальних ізолятів, що в модельних умовах виявили здатність до утворення бульбочок на коренях рослин сої. Після проведення стандартних ідентифікаційних тестів їх було віднесено до роду *Bradyrhizobium*.

Для підтвердження видової належності виділених ізолятів, що виявили нодуляційну здатність, вивчали їх морфологічні, культуральні та фізіолого-

біохімічні властивості. Відібрані ізоляти віднесено в першу групу Грам (–) паличкоподібні бактерії, рожевого кольору на препараті. Не утворюють спор, у однодобовій культурі – рухливі палички розміром 0,5–0,9×1,2–3,0 мкм, на твердому манітно-дріжджовому агарі (МДА) утворювали колонії 2-х типів: біло-кремові, округлі, опуклі, до 1 мм у діаметрі та білі, слизові, круглі, до 2 мм у діаметрі, не росли на м'ясо-пептонному агарі (МПА).

Для визначення здатності мікроорганізмів метаболізувати карбонові сполуки, проведено порівняння виділених ізолятів із еталонним препаратом Ризоактив. Встановлено, що виділені ізоляти бульбочкових бактерій мали здатність використовувати як субстрат арабінозу, галактозу, глюкозу, рамнозу, сахарозу і маніт, зовсім не використовували сорбіт та інозитол, що є характерним для еталонного препарату. Виділені бактеріальні ізоляти продукували желатиназу та характеризувалися негативною реакцією Фогес–Проскауера, що є класичною ознакою для ризобій. Ізоляти не мали здатності до виділення сірководню та синтезу індолу, а також не утилізували цитрат. Отже, аналіз отриманих даних за проведеними біохімічними тестами та оцінюванням морфолого-культуральних характеристик, дав змогу віднести виділені 11 ізолятів до виду *Bradyrhizobium japonicum.*

Важливу роль у встановленні ефективного симбіозу відіграють крупні плазміди. На плазмідах локалізовані гени, що контролюють утворення бульбочок (гени - *nod, noe, nol*) і саме вони відіграють ключову роль у процесі симбіотичної азотфіксації, специфічність азотфіксації (гени *fix*) та утворення нітрогенази (гени *nif*), ехо-гени – синтез екзополісахаридів. За азотфіксувальну активність у *Bradyrhizobium japonicum* відповідає група генів. У наших дослідженнях було обрано дві групи генів. Серед виділених із ґрунту ізолятів визначали наявність гену *nifH,* що є головним у опероні бактерій. В лабораторних умовах нами було проведено ПЛР-аналіз визначення наявності в ізолятах гена *nifH* (рис. 1*а*).



а – наявність nifH гена ***б – наявність nodD гена***

C^- – негативний контроль; C^+ – позитивний контроль;
1–11 ДНК ізолятів виділених із ґрунту

Рис. 1 – Електрофореграма продуктів полімеразної ланцюгової реакції

На електрофореграмі представлено, що у всіх ізолятах, виділених із ґрунту присутній у геномі даний ген. Однак *nif*-гени можуть бути виявлені також у багатьох інших представників сапротрофних ґрунтових бактерій, не лише цього роду *Bradyrhizobium.* Тому, нами було прийнято рішення за схожою схемою дослідити та визначити наявність у представлених ізолятів *Nod*-генів, які відповідають за утворення бульбочок, синтез Nod-факторів, а саме за початковий етап становлення та формування симбіозу. Здійснювали перевірку присутності *nodD* гена у виділених із ґрунту ізолятів бактерій (рис. 1*б*). Усі ізоляти містили даний ген, що підтверджує віднесення їх до виду *B. japonicum.*

У вегетаційному досліді встановлено, що всі виділені ізоляти ризобій сприяли формуванню бульбочок на коренях рослин сої, але вони мали різну кількість та масу. Було виявлено серед них ізоляти, що характеризувались найбільшою нодуляційною здатністю – LG 2 та LG 5 (табл. 2).

Таблиця 2

Активність ізолятів *Bradyrhizobium japonicum*

Варіант	**Кількість бульбочок на коренях сої, од.**	**Нітрогеназна активність, нмоль C_2H_4/ рослину за годину**
Контроль (без інокуляції)	–	–
Ізолят LG 1	13,4 ± 0,1	0,42 ± 0,13
Ізолят LG 2	21,7 ± 0,7	2,07 ± 0,18
Ізолят LG 3	17,5 ± 0,5	0,82 ± 0,31
Ізолят LG 4	14,2 ± 0,6	0,72 ± 0,26
Ізолят LG 5	23,2 ± 0,2	2,18 ± 0,14
Ізолят LG 6	12,5 ± 0,3	0,45 ± 0,05
Ізолят LG 7	12,1 ± 0,1	0,52 ± 0,16
Ізолят LG 8	13,3 ± 0,1	0,13 ± 0,04
Ізолят LG 9	14,1 ± 0,5	0,67 ± 0,24
Ізолят LG 10	7,2 ± 0,3	0,23 ± 0,07
Ізолят LG 11	8,6 ± 0,1	0,28 ± 0,13

Нами було встановлено, що 11 ізолятів з 34 виділених у чисту культуру здатні утворювати 8–23 бульбочок на коренях сої за інокуляції стерилізованого 96% етанолом насіння.

У паралельних дослідженнях було перевірено азотфіксувальну активність виділених ізолятів. Показано, що деякі з них, а саме LG 2 та LG 5 мали найвищу нітрогеназну активність – 2,07 та 2,18 нмоль C_2H_4/рослину за год.

ВЛАСТИВОСТІ ВИДІЛЕНИХ ІЗОЛЯТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*, ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ЕФЕКТИВНЕ ФОРМУВАННЯ СИМБІОТИЧНОГО АПАРАТУ

Під час культивування ізолятів бульбочкових бактерій *B. japonicum* у рідкому середовищі МДА було встановлено, що початок експоненційної фази росту *B. japonicum* LG 2 наступав на 66 год від початку культивування, ізоляту LG 5 – на 72 год. Аналіз росту досліджуваних ізолятів дає змогу стверджувати, що оптимумом культивування даних бульбочкових бактерій є 90–96 год, коли культури набувають максимальної чисельності клітин у культуральній рідині (рис. 2).

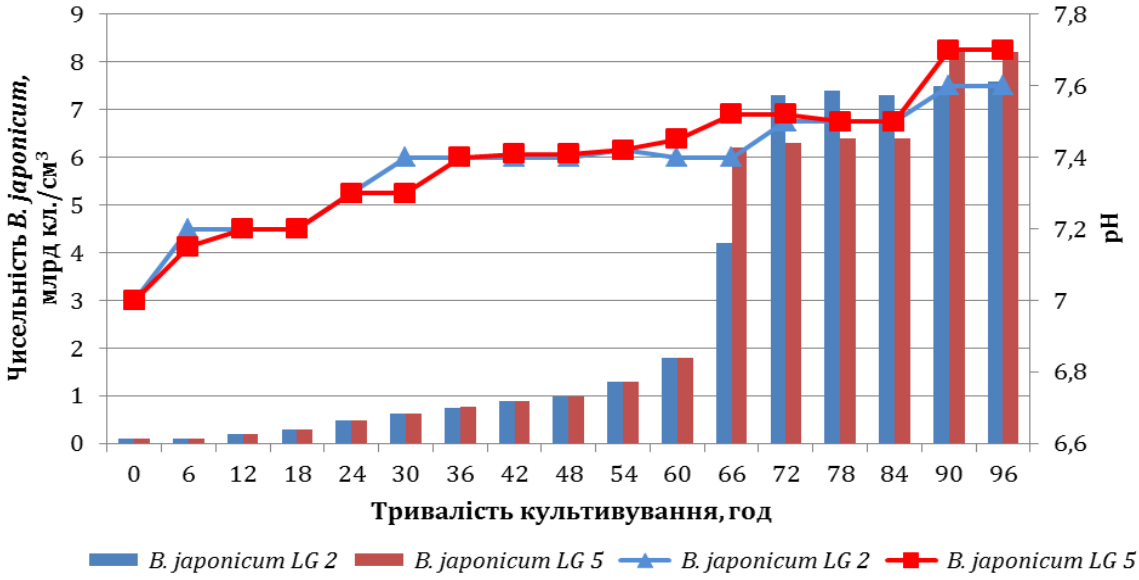


Рис. 2 – Динаміка розвитку ізолятів *B. japonicum* в умовах *in vitro* (28±2°С)

Встановлено, що ізоляти *B. japonicum* ростуть у межах pH середовища 4,5–8,5, а оптимальним для початку росту ізолятів можна вважати вузький інтервал показника pH 7,4–7,6. За таких початкових значень показника pH титр культури за 1 добу досягав до 8 млрд кл./см^3. Обидва ізоляти LG 2 і LG 5 можуть розвиватися за температурного діапазону 17–39°С, найактивніше нарощують біомасу за 26–29°С. Під час розвитку культури ізоляту середовище поступово, відповідно до росту культури, підлужнюється від початкового pH 7,0 до 7,9. Тобто ізоляти продукують лужні метаболіти, що є характерним для повільнорослих бульбочкових бактерій.

Найголовнішими критеріями добору активних ізолятів *B. japonicum* для створення високопродуктивного симбіозу із соєю є їх висока вірулентність, значна азотфіксувальна активність, конкурентоздатність, технологічність та ефективність симбіотичної системи. В умовах вегетаційного досліду визначено ефективність відібраних ізолятів *B. japonicum* та їх вплив на рослини сої. Отримані дані

засвідчили високу здатність ізолятів формувати симбіотичний апарат і покращувати біометричні показники бактеризованих рослин сої (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив ізолятів *B. japonicum* на ріст і розвиток рослин сої (сорт Моравія)

Варіант	Висота стебла, см	Маса стебла, г	Довжина кореня, см	Маса кореня, г	Кількість бульбочок од./росл.	Маса бульбочок г/росл.
Контроль (без інокуляції)	15,7 ± 0,36	1,83 ± 0,06	6,5 ± 0,61	0,42 ± 0,03	–	–
Еталон (Ризоактив)	17,8 ± 0,47	2,02 ± 0,01	8,2 ± 0,56	0,59 ± 0,02	22,5 ± 0,5	0,44 ± 0,05
B. japonicum LG 2	18,1 ± 0,23	2,08 ± 0,08	7,7 ± 0,44	0,47 ±0,01	31,5 ± 0,5	0,62 ± 0,03
B. japonicum LG 5	17,4 ± 0,98	2,11 ± 0,11	8,7 ± 0,53	0,54 ± 0,02	38,6 ± 0,5	0,68 ± 0,02

Встановлено, що інокуляція насіння сої ізолятом LG 5 забезпечувала формування ефективнішого симбіотичного апарату за показником кількості бульбочок та їх маси на одну рослину з перевищенням варіанту досліду із застосуванням еталонного препарату на 72 і 55%, відповідно. Це сприяло найкращому розвитку рослин сої: показники надземної маси рослин були на 11–15% і маси коріння на 29–34% вищі порівняно з контролем. Порівняно з еталоном (препарат Ризоактив), встановлено достовірні відмінності ($p < 0,05$) на 6 і 4%, відповідно за показником довжини кореня і маси стебла.

Ефективність інокуляції *B. japonicum* LG 2 дещо поступалася за низкою показників ізоляту LG 5, проте, за кількістю бульбочок на корінні рослин та їх масою перевищувала варіант із еталонним препаратом Ризоактив у 1,4 раза.

Важливим етапом нашої роботи було проведення досліджень обраних ізолятів на здатність до утворення справжніх бульбочок та визначення нітрогеназної активності. Так, азотфіксувальна активність досліджуваних нами варіантів становила 1,91–2,18 нмоль C_2H_4/рослину за год (табл. 4).

Таблиця 4

Азотфіксувальна активність ізолятів *B. japonicum*

Варіант	Нітрогеназна активність, нмоль C_2H_4/рослину за год	Вміст лег-гемоглобіну, мг/г
Еталон (Ризоактив)	1,91 ± 0,04	0,725 ± 0,08
B. japonicum LG 2	2,07 ± 0,18	0,565 ± 0,16
B. japonicum LG 5	2,18 ± 0,14	0,658 ± 0,31

Встановлено, що виділеним ізолятам *B. japonicum* LG 2 і LG 5 властива висока нітрогеназна активність із перевищенням значень еталонного препарату Ризоактив на 8–14%. Тестування на ефективність нових ізолятів є обов'язковою умовою перед використанням їх як основи для виготовлення бактеріальних препаратів.

Нами проведено оцінку кількості лег-гемоглобіну в активних (червоного кольору) бульбочках сформованих досліджуваними ізолятами на коренях рослин сої (Wilson, Reisenaeur, 1963). Лег-гемоглобін – міоглобінподібний білок, що володіє високою спорідненістю до кисню. Він відіграє важливу роль у проходженні процесу азотфіксації, підтримуючи концентрацію кисню на низькому, але стабільному рівні, достатньому для дихання бактероїдів. Він не інгібує, а навпаки захищає фермент нітрогеназу. Отримані дані засвідчили, що у варіантах із застосуванням ізолятів *B. japonicum* LG 2 та LG 5 вміст білка лег-гемоглобіну в бульбочках був на рівні 0,565 і 0,658 мг/г, що вказує на високий рівень перебігу процесу азотфіксування в них та підтверджує активне функціонування нітрогеназного комплексу.

Важливим показником, що характеризує поглинальну поверхню кореня слугує його адсорбційна поверхня. Активне поглинання солей значно пов'язане з обміном речовин та визначається ним. Забезпечення рослин поживними речовинами залежить від розмірів кореневої системи та середньої швидкості поглинання, тобто величини потоку елементів мінерального живлення через поверхню коренів. За дії передпосівної бактеризації насіння у рослин сої збільшувалась поглинальна поверхня коренів, що своєю чергою, сприяло формуванню розвиненої кореневої системи (рис. 3).

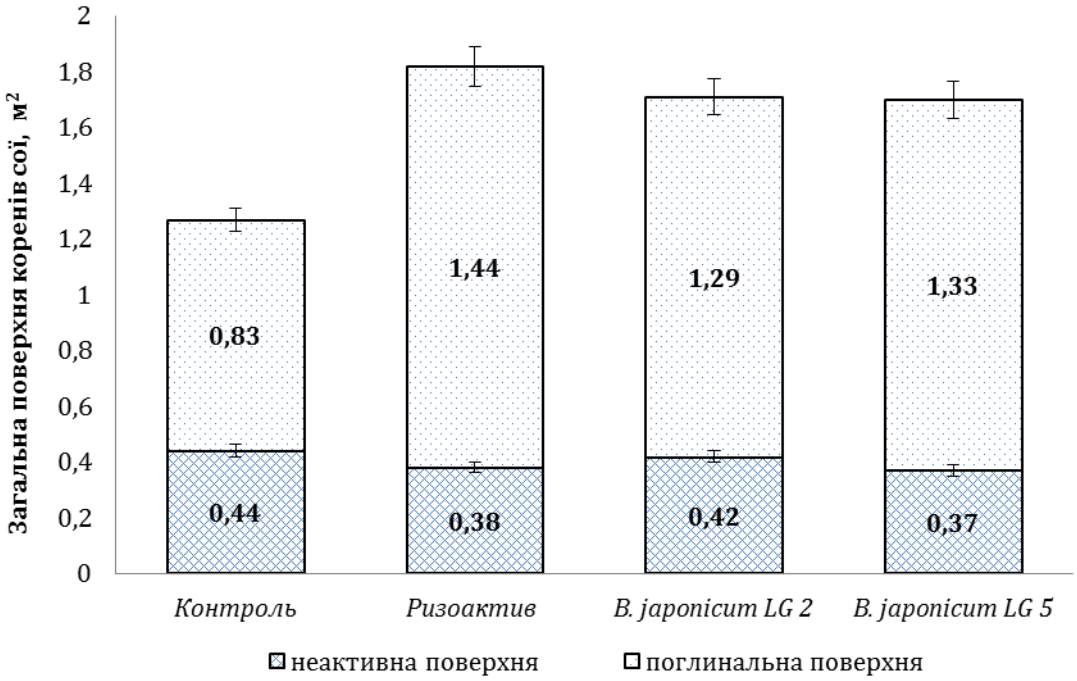


Рис. 3 – Вплив ізолятів *B. japonicum* на поглинальну поверхню коренів рослин сої

Аналіз поглинальної поверхні коренів рослин сої, сформованої за дії досліджуваних ізолятів *B. japonicum* LG 2 та LG 5, засвідчив формування потужної кореневої системи (1,29 і 1,33 м^2), із перевищенням контролю на 55–60%.

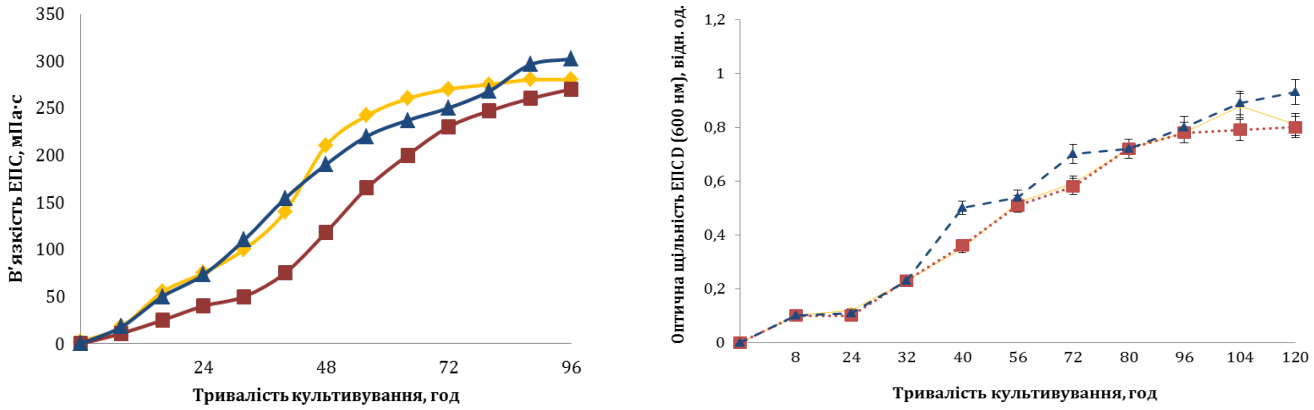
Одним із найважливіших питань залишається можливість зберігання мікробних препаратів упродовж тривалого періоду. Це стає можливим завдяки виділенню екзополісахаридів бульбочковими бактеріями. ЕПС азотфіксувальних ризобіальних бактерій також є потенційними біополімерами для виробництва препаратів, оскільки у культуральній рідині призводять до збільшення її в`язкості та забезпечують процеси адаптації мікроорганізмів до умов оточуючого середовища як у симбіозі з бобовими рослинами, так і у сапротрофному стані.

Показником ефективності бульбочкових бактерій є здатність утворювати ЕПС, середній діапазон синтезу яких становить 0,5–1,5 г/дм^3 (Косенко, 1982). З практичної точки зору, достатня кількість ЕПС у мікробних препаратах забезпечує збереження високого титру мікроорганізмів та високу фізіологічну активність бактеріальних клітин упродовж тривалого періоду (Шерстобоєва, 2000).

Встановлено, що досліджувані ізоляти синтезували ЕПС у кількості 2,8–3,2 г/дм^3. Зокрема, ізолят LG 5 утворював 3,2 г/дм^3 ЕПС, що на 13,4% перевищувало здатність штамів *B. japonicum*, які є складовою препарату Ризоактив.

Практичне значення ЕПС визначається їх реологічними властивостями, тобто здатністю підвищувати в'язкість та пластичність розчинів. Під час культивування ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5 на рідкому МДА відмічено інтенсивний ріст біомаси, через утворення позаклітинних полісахаридів.

В'язкість культуральної рідини при застосуванні препарату Ризоактив сягала 280 мПа·с. Своєю чергою, ізолят *B. japonicum* LG 5 мав здатність утворювати екзополісахариди, в'язкість яких перевищувала еталон (препарат Ризоактив) на 7,8% (рис. 4*а*).



а ***б***

– Ризоактив; – *B. japonicum* LG 2; – *B. japonicum* LG 5

а – в'язкість ЕПС, мПа·с; ***б – оптична щільність ЕПС, відносних одиниць***

Рис. 4 – Реологічні властивості ЕПС, синтезованих ізолятами *B. japonicum*

Досліджували динаміку змін оптичної щільності (D) культуральної рідини ізолятів бульбочкових бактерій залежно від періоду культивування (рис. 4б). Встановлено, що оптична щільність збільшується відповідно до біомаси представлених варіантів досліду. Так, найбільшою оптичною густиною (D=0,93 відносних одиниць) характеризувався ізолят *B. japonicum* LG 5.

Отже, виділені ізоляти *B. japonicum* LG 2 і LG 5 за низкою біохімічних показників є перспективними для створення нового ефективного біологічного препарату для сої.

Динаміка зберігання бульбочкових бактерій на поверхні насіння. Проведено визначення динаміки титру життєздатних клітин ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5 на поверхні насіння сої за умов моноінокуляції та поєднаного застосування композиції двох ізолятів (LG 2 + LG 5). Саме завдяки передпосівній обробці насіння сої можна визначити алелопатичний вплив поверхневих речовин насіння різних сортів та селекцій на активність та життєздатність азотфіксувальних бактерій сої. В обох варіантах досліду інокуляційне навантаження *B. japonicum* становило $8{,}27\times10^3$ клітин на 1 насінину сої. Порівнювали з контролем – насіння оброблене водою з титром епіфітних ризобій на 1 насінині не більше 100 клітин.

У варіанті з ізолятом *B. japonicum* LG 2 через 2 год чисельність знижувалась і сягала $4{,}1\times10^3$ клітин/насінину, у варіанті з ізолятом *B. japonicum* LG 5 – $5{,}9\times10^3$ клітин/насінину, а за інокуляції у складі композиції обох ізолятів (LG 2 + LG 5) – до $7{,}2\times10^3$ клітин/насінину, що на 5,7% більше, порівняно з препаратом Ризоактив (рис. 5).

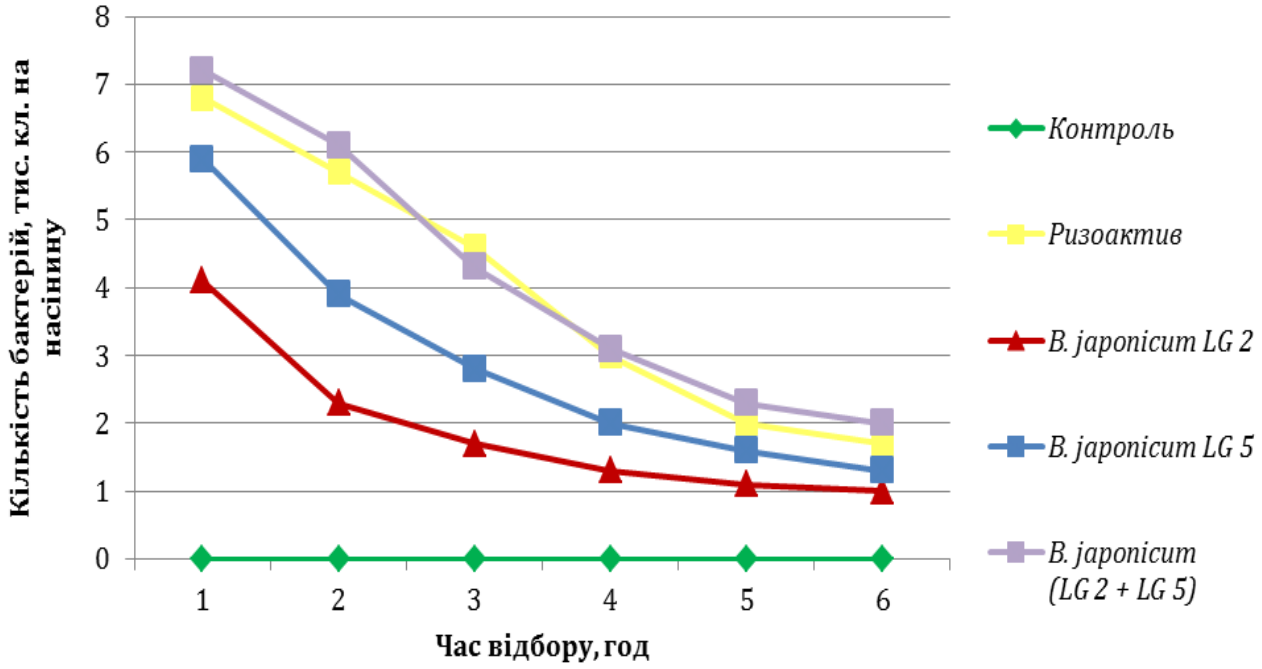


Рис. 5 – Динаміка чисельності клітин ізолятів *B. japonicum* на поверхні насіння сої за штучної інокуляції

Титр клітин ізолятів *B. japonicum* упродовж 12 год знижувався у всіх варіантах досліду. Зокрема, за моноінокуляції у варіанті з ізолятом LG 2 кількість бактерій знижувалась до $1{,}0 \cdot 10^3$ клітин/насінину, у варіанті з ізолятом LG 5 – до $1{,}3 \cdot 10^3$ клітин/насінину. За інокуляції композицією ізолятів (LG 2 + LG 5) титр ризобій знижувався лише до $2{,}0 \cdot 10^3$ життєздатних клітин на 1 насінину, що на 15% більше, ніж у варіанті з препаратом Ризоактив.

Таким чином, у наших дослідженнях речовини, що знаходились на поверхні насіння сої сорту Моравія, не чинили згубної дії на виживання клітин ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5. Уповільнення зменшення титру бульбочкових азотфіксувальних бактерій на насінні сої за інокуляції комплексом двох ізолятів, ймовірно, впливає наявність в'язких ЕПС, які синтезує ізолят LG 5, та які, своєю чергою, захищають від впливу екологічних чинників, що пошкоджують бактеріальні клітини, а також сприяє утриманню клітин на поверхні насінин.

Технологічні дослідження динаміки титру життєздатних клітин у твердому субстраті показало, що наприкінці 6-ти місяців 1,7 та 2,1 млрд/г клітин досліджуваних ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5 залишається, тобто одержані культуральні рідини ізолятів *B. japonicum* LG 2 та LG 5 зберігають титр на достатньому рівні та можуть використовуватись до 6 місяців (табл. 5).

Таблиця 5

Кількість клітин ізолятів *B. japonicum* за зберігання в умовах *in vitro*

Ізолят бактерій		Термін зберігання, міс.						
		0,5	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
B. japonicum LG 2, млрд/г		3,4±0,14	3,5±0,21	3,7±0,16	3,2±0,33	2,5±0,15	2,1±0,04	1,7±0,25
Стороння мікрофлора, %	бактерії	0	0	0,1±0,05	0,2±0,01	0,2±0,04	0,4±0,07	0,4±0,02
	гриби	0	0	0	0	0	0	0
B. japonicum LG 5, млрд/г		4,2±0,18	4,4±0,35	4,6±0,47	3,5±0,24	3,2±0,18	2,4±0,39	2,1±0,27
Стороння мікрофлора, %	бактерії	0	0	0,1±0,03	0,2±0,01	0,2±0,02	0,2±0,05	0,3±0,02
	гриби	0	0	0	0	0	0	0

Проведено визначення впливу хімічних протруювачів насіння (Максим, Вітавакс 200 ФФ, Редіго М) на ізоляти *B. japonicum* за обробки насіння сої під час зберігання впродовж 2-х місяців. Застосування фунгіцидів може викликати порушення рівноваги в біологічній системі ґрунту, впливаючи на мікробіоту ґрунту, зокрема ризобії – біоагенти мікробних препаратів. У результаті наших досліджень не встановлено значного негативного впливу хімічних протруйників на клітини ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5, оскільки чисельність бактерій на насінні сої була

на рівні 0,83–4,68 тис. КУО/насінину. Життєздатність клітин *B. japonicum* LG 5 за впливу хімічних протруйників Вітавакс 200 ФФ, Рediго М була вищою за контроль (Ризоактив) у 1,5–2,2 раза (табл. 6).

Таблиця 6

Життєздатність клітин ізолятів *B. japonicum* за впливу хімічних протруйників насіння

Варіант		Титр бактерій, тис. КУО/насінину	
Ізолят	**Протруйник**	**на 30 добу**	**на 60 добу**
Контроль (Ризоактив)	Максим	3,91 ± 0,2	3,12 ± 0,2
	Вітавакс 200 ФФ	3,45 ± 0,1	2,95 ± 0,1
	Рediго М	2,31 ± 0,2	1,92 ± 0,1
B. japonicum LG 2	Максим	3,71 ± 0,2	2,02 ± 0,2
	Вітавакс 200 ФФ	3,23 ± 0,1	0,96 ± 0,1
	Рediго М	1,06 ± 0,1	0,92 ± 0,2
B. japonicum LG 5	Максим	3,15 ± 0,5	3,06 ± 0,2
	Вітавакс 200 ФФ	7,16 ± 0,3	4,68 ± 0,2
	Рediго М	2,45 ± 0,2	2,14 ± 0,3
B. japonicum (LG 2 + LG 5)	Максим	2,91 ± 0,5	3,21 ± 0,2
	Вітавакс 200 ФФ	3,69 ± 0,2	0,83 ± 0,3
	Рediго М	4,21 ± 0,2	3,21 ± 0,5

Обробка насіння сої ізолятами *B. japonicum* LG 2 і LG 5 показала стійкий стимулюючий та захисний ефект на фоні застосування фунгіцидів Максим, Вітавакс 200 ФФ та Рediго М для попередньої обробки насіння сої.

Комбіноване використання хімічних засобів захисту та комплексної інокуляції насіння дозволяє ефективно захистити посіви сої від збудників хвороб та сприяє формуванню активного нодуляційного апарату та збільшенню продуктивності рослин. Ізоляти *B. japonicum* LG 2 і LG 5 є стійкими до впливу хімічних протруйників насіння Максим, Вітавакс 200 ФФ та Рediго М. Ізолят *B. japonicum* LG 5 та поєднання двох ізолятів (LG 2 + LG 5) були більш стійкими до дії хімічних препаратів у 1,5–2,2 раза порівняно з еталонним препаратом Ризоактив.

У польових умовах підтверджено високу ефективність виділених ізолятів LG 2 і LG 5 у формуванні симбіотичної системи *B. japonicum – Glycine max* (L.) Merrill. Інокуляція культуральною рідиною ізоляту LG 5 забезпечила найвищу нітрогеназну активність та масу бульбочок на коренях рослини, з перевищенням еталонного варіанта досліду (Ризоактив) на 20 і 52%, відповідно. За інокуляції насіння сої

культуральною рідиною ізоляту LG 2 зафіксовано найбільшу кількість бульбочок на коренях рослин (табл. 7).

Таблиця 7

Ефективність формування симбіотичної системи *B. japonicum – Glycine max* (L.) Merrill

Варіант	Кількість бульбочок, од.	Маса бульбочок, г	Нітрогеназна активність, нмоль C_2H_4/росл. за год
Контроль	7,2 ± 0,02	0,05 ± 0,01	–
Еталон (Ризоактив)	24,0 ± 0,03	0,2 ± 0,04	0,98 ± 0,16
B. japonicum LG 2	31,0 ± 0,18	0,26 ± 0,11	1,05 ± 0,07
B. japonicum LG 5	19,0 ± 0,12	0,32 ± 0,2	1,18 ± 0,12

Важливо зазначити, що досліджені ізоляти *B. japonicum* виділено із мікробіоценозу чорнозему типового, для якого властивий високий уміст органічних речовин, проте було показано, що в умовах польових дослідів азотфіксувальний потенціал не виявлявся повною мірою (порівняно з лабораторними дослідженнями). Важливим критерієм був показник маси бульбочок та їх нітрогеназна активність, коефіцієнт кореляції між якими становив r = 0,39–0,72.

ЕФЕКТИВНЕ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОТИЧНОЇ СИСТЕМИ НОВИХ ІЗОЛЯТІВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM – GLYCINE MAX* (L.) MERRILL

Ефективність симбіозу *Bradyrhizobium japonicum – Glycine max* (L.) Merrill за показниками фотосинтезу. Формування такого показника як площа листкової поверхні є однією з найбільш показових ознак для оцінювання ефективності сформованого бобово-ризобіального симбіозу.

Встановлено анатомо-морфологічні зміни листкового апарату рослин сої залежно від використання досліджуваних ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5. Передпосівна обробка насіння культуральними рідинами ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5 сприяла формуванню 14,3–54,2 тис. м^2/га листкової поверхні рослин сої.

Аналізуючи динаміку зміни листкової поверхні, встановлено, що найбільша листкова поверхня у фазі цвітіння (54,2 тис. м^2/га) була сформована рослинами сої у варіанті з інокуляцією ізолятом LG 5, що на 8,4% вище відповідного показника у варіанті з використанням препарату Ризоактив. Збільшення асиміляційної поверхні відбувається до фази цвітіння, а потім відбувається зменшення інтенсивності її наростання до фази наливу бобів (рис. 6).

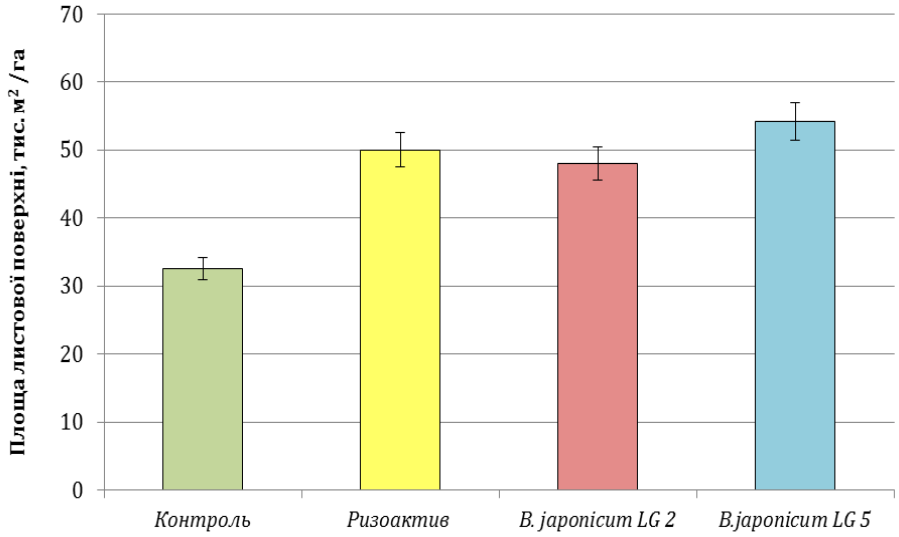


Рис. 6 – Вплив ізолятів *B. japonicum* на формування площі листкової поверхні рослин сої (фаза цвітіння)

Формування фотосинтетичних пігментів у листках *Glycine max* (L.) Merrill за дії ізолятів *Bradyrhizobium japonicum*. Одним із важливих показників, який характеризує ефективність сформованої бобово-ризобіальної системи, є вміст пластидних пігментів у листках інокульованих рослин сої. Культуральні рідини ізолятів *B. japonicum* LG 2 і LG 5 здатні позитивно впливати на вміст основних фотосинтетичних пігментів у листках рослин сої. За їх інокуляції зафіксовано підвищення вмісту кількості хлорофілів (a+b) відносно контролю та варіанту з препаратом Ризоактив на 9–16% (рис. 7).

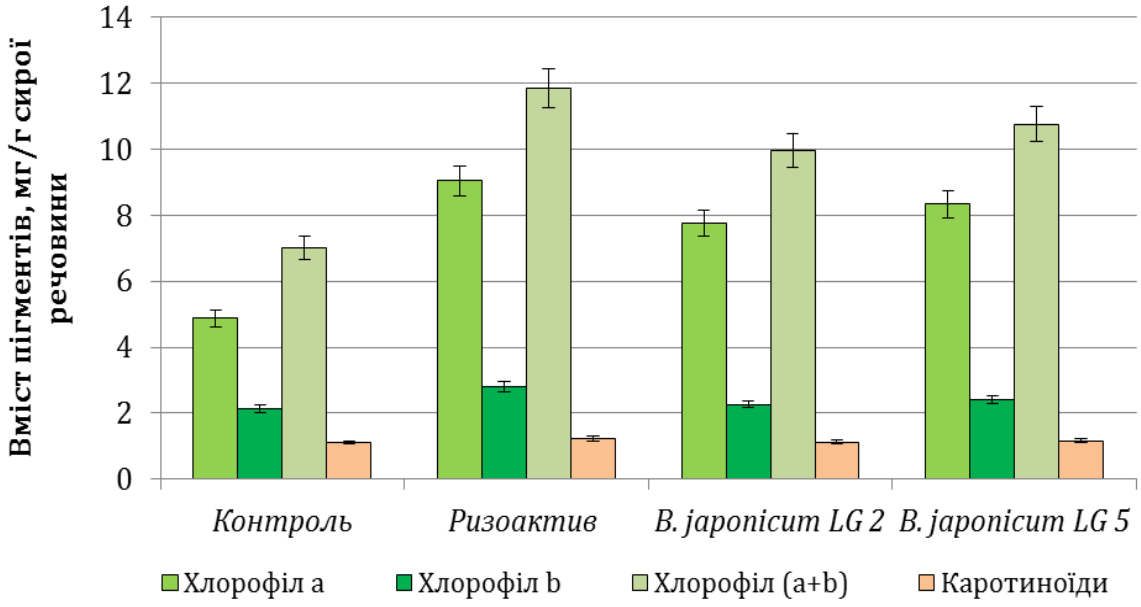


Рис. 7 – Вплив ізолятів *B. japonicum* на вміст фотосинтетичних пігментів у листках рослин сої (фаза цвітіння)

Сумарне нагромадження вегетативної маси залежить, як від листкової поверхні, яка формується у міжфазні періоди росту і розвитку рослин, так і тривалості даного періоду. У результаті проведених досліджень встановлено, що найбільший вміст фотосинтезуючих пігментів був у листках інокульованих рослин сої.

Ефективність симбіотичної системи *B. japonicum – Glycine max* (L.) Merrill також аналізували за показниками врожайності та якості зерна сої сорту Моравія. Встановлено позитивний вплив інокуляції насіння культуральною рідиною ізолятів LG 2 і LG 5, а саме підвищення врожайності на 22,4 і 29,2%, умісту білка в зерні у середньому на 6 і 4% (табл. 8).

Таблиця 8

Ефективність симбіотичної системи *B. japonicum – Glycine max* (L.) Merrill

Варіант	Урожайність зерна, т/га	Приріст урожаю до контролю		Вміст у зерні	
				білка	олії
		т/га	%	%	
Контроль (без інокуляції)	2,19	–	–	37,9	21,2
Еталон (Ризоактив)	2,71	0,52	23,7	39,8	22,1
B. japonicum LG 2	2,68	0,49	22,4	39,2	21,9
B. japonicum LG 5	2,83	0,64	29,2	40,5	22,2
$НІР_{05}$	0,25			0,36	0,18

Крім того, ізолят LG 5 забезпечив підвищення врожайності на 4,4% порівняно із застосуванням препарату Ризоактив.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі з’ясовано еколого-біологічні властивості ізолятів *Bradyrhizobium japonicum,* виділених із чорноземних ґрунтів України, що адаптувались до сапротрофного існування та не втратили своїх екологічних та біологічних властивостей і здатні забезпечити формування та ефективне функціонування симбіотичної системи з *Glycine max* (L.) Merrill. На основі результатів досліджень та їх узагальнення зроблено наступні висновки:

1. Із 352 зразків чорноземного ґрунту, виділено 34 ізоляти, що утворювали бульбочки на коренях рослин сої. У чисту культуру виділено 11 повільнорослих бактеріальних ізолятів, які після проведення стандартних ідентифікаційних тестів було віднесено до роду *Bradyrhizobium.*

2. Відібрано два конкурентоздатні високоактивні ізоляти *Bradyrhizobium japonicum* LG 2 і LG 5, які після тривалого існування у ґрунті зберегли здатність до активної симбіотичної взаємодії з *Glycine max* (L.) Merrill із високою нітрогеназною

активністю (2,07 та 2,18 нмоль/ росл./год), нодулюючою здатністю (31,5 і 38,6 бульбочок/росл.), вмістом лег-гемоглобіну (0,565 і 0,658 мг/г), відповідно.

3. Встановлено, що культури ізолятів *B. japonicum* LG 5 і LG 2 здатні розвиватись у середовищі з інтервалом pH 4,5–8,5 та температурним режимом 17–39°С. Визначено, що оптимальною температурою для нарощування біомаси ізолятів є 26–29°С.

4. Ізолят *B. japonicum* LG 5 здатний синтезувати 3,2 г/дм^3 ЕПС, що на 13,4% вище ніж у еталонного препарату Ризоактив. Ізолят *B. japonicum* LG 2 синтезує 2,75 г/дм^3 ЕПС, що є на рівні еталонного препарату. ЕПС із найвищою в'язкістю (302 мПа·с) і оптичною щільністю (0,93 відносних одиниць) синтезує ізолят *B. japonicum* LG 5.

5. За інокуляції насіння сої культуральною рідиною ізолятів *B. japonicum* LG 5 і LG 2 зберігається значна кількість життєздатних бактерій на поверхні насіння ($2{,}0\times10^3$ КУО/насінину) через 12 годин, що на 15% вище, ніж за інокуляції препаратом Ризоактив. Ізолят *B. japonicum* LG 5, який синтезує ЕПС із найвищими значеннями реологічних показників і є більш стійким до дії екологічних чинників, характеризується тривалим терміном зберігання на поверхні насіння.

6. Встановлено, що ізоляти *B. japonicum* LG 2 і LG 5 є стійкими до впливу хімічних протруйників насіння Максим, Вітавакс 200 ФФ та Рédіго М. Ізолят *B. japonicum* LG 5 та поєднання двох ізолятів (LG 2 + LG 5) були більш стійкими до дії хімічних препаратів у 1,5–2,2 раза порівняно з еталонним препаратом Ризоактив.

7. Встановлено позитивний вплив виділених ізолятів *B. japonicum* на ріст і розвиток рослин сої. Інокуляція насіння ізолятами LG 5 і LG 2 сприяла формуванню 1,29 та 1,33 м^2 поглинальної поверхні коренів, формуванню листкової поверхні 54,2 та 48,4 тис. м^2/га, накопичення фотосинтезуючих пігментів у листку 10,1 і 11,3 мг/г сирої речовини, що порівняно з контролем у 1,6–1,7 раза вище.

8. У польових умовах показано, що за передпосівної обробки насіння сої культурою ізоляту *B. japonicum* LG 5 нітрогеназна активність бульбочок зростала на 20,4% відносно еталону (Ризоактив), а за застосування ізоляту *B. japonicum* LG 2 – на 7,1%.

9. Доведено ефективність симбіотичної системи сформованої ізолятами *B. japonicum* LG 2 і LG 5 з рослинами сої, а саме підвищення врожайності зерна на 22,4 і 29,2%. Інокуляція насіння ізолятом *B. japonicum* LG 5 забезпечила підвищення врожайності зерна на 4,4% порівняно із еталонним препаратом Ризоактив.

ОСНОВНІ НАУКОВІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Статті у фахових наукових виданнях України

1. **Гуменюк І.І.**, Грузінський С.Ю., Бровко І.С., Чабанюк Я.В. Коренева система сої за дії *Bradyrhizobium japonicum*. *Агроекологічний журнал.* 2018. № 1. С. 138–143 *(проведення експерименту, аналіз отриманих даних, участь у написанні статті).*

2. **Gumeniuk I.I.,** Gruzynskyi S.Y., Brovko I.S., Chabaniuk Ya.V. The search of the native soil bacteria *Bradyrhizobium. Екологічні науки.* 2018. № 2(21). С. 153–156 *(планування та проведення досліджень, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

3. **Гуменюк І.І.**, Грузінський С.Ю., Бровко І.С., Чабанюк Я.В. Скринінг аборигенних бактерій *Bradyrhizobium* з ґрунту та їх симбіотичні властивості. *Агроекологічний журнал.* 2018. № 3. С. 77–81 *(участь у плануванні та проведенні досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*

4. **Gumeniuk I.**, Gruzinskii S., Brovko I., Chabanyuk Ya. Synthesis of exopolisaccharides by *Bradyrhizobium japonicum* isolates. *Екологічні науки*. 2018. № 3(22). С. 73–76 *(проведення досліджень, аналіз результатів, написання статті).*

5. **Gumeniuk I.** Rheological features of isolates of *Bradyrizobium* nodule bacteria. *Агроекологічний журнал*. 2018. № 4. P. 93–98 *(участь у плануванні та проведенні досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*

6. **Gumeniuk I.**, Sherstoboeva O., Chabanyuk Ya. Dynamics of *Bradyrhizobium japonicum* number on soybean seed. *Екологічні науки*. 2018. № 4(23). С. 129–133 *(проведення досліджень, написання статті).*

Статті в інших наукових виданнях

7. **Gumeniuk I.**, Gruzinskii S., Brovko I., Chabanyuk Ya. Soybean symbiotic apparatus formed by *Bradyrhizobium japonicum. Молодий вчений.* 2018. № 4. P. 387–390.

Тези та матеріали конференцій

8. **Gumeniuk I.I.**, Ryzhykova M.V., Gruzinskii S.J., Brovko I.S. Establishing the optimal method of pre-treatment of seed inoculants based on microorganisms. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century: Abstract book of the II International Scientific Conference (Kyiv, 14–15 of April, 2016). Kyiv, 2016. P. 19–20.

9. **Gumeniuk I.I.**, Brovko I.S., Gruzinskii S.Yu. The measurement of leg-hemoglobin in legume-rhizobia symbiosis. Шевченківська весна: досягнення біологічної науки: BioSciensce Advances: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (Київ, 18–21 квітня 2017 р.). К.: ПАЛИВОДА А.В., 2017. С. 34–35.

10. **Гуменюк І.І.**, Грузінський С.Ю., Бровко І.С. Оцінка азотфіксувальної активності симбіотичного апарату сої сорту Моравія у зоні Лісостепу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції (Львів, 25–27 квітня 2017 р.). Л., 2017. С. 177–178.

11. **Gumeniuk I.I.**, Gruzinskii S.Yu., Brovko I.S., Chabanyuk Ya.V. Different seeds pre-treatment methods. Збалансоване природокористування: традиції, перспективи і інновації: Матеріали І Міжнародної науково-практичної конференції (Київ, 18–19 травня 2017 р.). К.: ДІА, 2017. С. 36–38.

12. **Gumeniuk I.I.**, Brovko I.S., Chabanyuk Ya.V. Methods of seeds pre-treatment based on nodule bacteria. Проблеми екології та еволюції екосистем в умовах трансформованого середовища: Матеріали І Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених (Київ, 25–26 травня 2017 р.). К.: ДУ «ІЕЕ НАН України», 2017. С. 29–31.

13. Gruzinskii S.Yu., **Gumeniuk I.I.** Modern use of biological preparations of nodule bacteria of soybean. Екологічна безпека та збалансоване природокористування в агропромисловому виробництві: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (Київ, 6–7 липня 2017 р.). К.: ДІА, 2017. С. 42–44.

14. **Gumeniuk I.I.**, Gruzinskii S.J., Brovko I.S., Chabanyuk Ya.V. Factors of legume-rhizobium symbiosis formation. Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century: Abstract book of the III International Scientific Conference (Kyiv, 19–20 of April, 2018). Kyiv, 2018. P. 44.

15. **Гуменюк І.І.**, Бровко І.С., Чабанюк Я.В., Потапенко В.В., Іванов М.С., Стефанюк Б.Р. Особливості функціонування симбіотичного апарату сої. Екологічна безпека та збалансоване природокористування в агропромисловому виробництві: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції (Київ, 4–6 липня 2018 р.). К.: ДІА, 2018. С. 49–51.

Методичні рекомендації

16. Мазур С.О., Чабанюк Я.В., Шерстобоєва О.В., Дем'янюк О.С., Бровко І.С., Кордунян О.О., Грузінський С.Ю., **Гуменюк І.І.**, Подгурська І.О., Мазур М.В., Бойко К.І., Шацман Д.О. Новітні ресурсоощадні технології і техніки в сільському господарстві для збереження та покращення родючості ґрунтів: Методичні рекомендації. К., 2018. 85 с.

АНОТАЦІЯ

Гуменюк І.І. Еколого-біологічні властивості ізолятів *Bradyrhizobium japonicum* із ґрунтів України. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 «Екологія». – Інститут агроекології і природокористування Національної академії аграрних наук України, Київ, 2019.

У дисертації досліджено еколого-біологічні властивості ізолятів *Bradyrhizobium japonicum*, виділених із чорноземних ґрунтів України, які після тривалого існування у сапротрофному стані зберегли високу нодулюючу здатність та нітрогеназну активність.

Відібрано два конкурентоздатні високоактивні ізоляти *B. japonicum* LG 2 і LG 5, які після тривалого існування у ґрунті зберегли здатність до активної симбіотичної взаємодії з *Glycine max* (L.) Merrill із високою нітрогеназною активністю (2,07 та 2,18 нмоль/росл./год), нодулюючою здатністю (31,5 і 38,6 бульбочок/росл.), вмістом лег-гемоглобіну (0,565 і 0,658 мг/г), відповідно.

Встановлено, що культури ізолятів *B. japonicum* LG 5 і LG 2 здатні розвиватись у середовищі з інтервалом pH 4,5–8,5 та температурним режимом

17–39°С. Визначено, що оптимальною температурою для нарощування біомаси ізолятів є 26–29°С.

Показано, що за передпосівної обробки насіння сої культурою ізоляту *B. japonicum* LG 5 нітрогеназна активність бульбочок зростала на 20,4% відносно еталону (Ризоактив), а за застосування ізоляту *B. japonicum* LG 2 – на 7,1%.

Виявлено, що інокуляція насіння ізолятом *B. japonicum* LG 5 забезпечила підвищення врожайності зерна на 4,4% порівняно із еталонним препаратом Ризоактив.

Ключові слова: *бульбочкові бактерії, Bradyrhizobium japonicum, ізолят, соя, симбіотична система, нітрогеназна активність, нодулююча здатність, азотфіксування.*

АННОТАЦИЯ

Гуменюк И.И. Эколого-биологические свойства изолятов *Bradyrhizobium japonicum* из почв Украины. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.16 «Экология». – Институт агроэкологии и природопользования Национальной академии аграрных наук Украины, Киев, 2019.

В диссертации исследовано эколого-биологические свойства изолятов *Bradyrhizobium japonicum*, выделенных из черноземных почв Украины после их длительного существования в сапротрофном состоянии, которые сохранили высокую нодулирующую способность и нитрогеназную активность.

Отобраны два конкурентоспособных высокоактивных изолята *B. japonicum* LG 2 и LG 5, которые после длительного существования в почве сохранили способность к активному симбиотическому взаимодействию с *Glycine max* (L.) Merrill с высокой нитрогеназной активностью (2,07 и 2,18 нмоль/раст./ч), нодулирующей способностью (31,5 и 38,6 клубеньков/раст.), содержанием лег-гемоглобина (0,565 и 0,658 мг/г), соответственно.

Установлено, что культуры изолятов *B. japonicum* LG 5 и LG 2 способны развиваться в среде с интервалом pH 4,5–8,5 и температурным режимом 17–39°С. Определено, что оптимальной температурой для наращивания биомассы изолятов является 26–29°С.

Показано, что при предпосевной обработке семян сои культурой изолята *B. japonicum* LG 5 нитрогеназная активность клубеньков была выше на 20,4% относительно эталона (препарат Ризоактив), а при применение изолята *B. japonicum* LG 2 – на 7,1%.

Инокуляция семян сои изолятом *B. japonicum* LG 5 обеспечила повышение урожайности зерна на 4,4% по сравнению с эталонным препаратом Ризоактив.

Ключевые слова*: клубеньковые бактерии, Bradyrhizobium japonicum, изолят, соя, симбиотическая система, нитрогеназная активность, нодулирующая способность, азотфиксация.*

SUMMARY

Gumeniuk I.I. Ecological and biological properties of *Bradyrhizobium japonicum* isolates from soils of Ukraine. – Manuscript.

The dissertation on receiving the scientific degree of candidate of the biological sciences on specialty 03.00.16 “Ecology”. – Institute of Agroecology and Environmental Management of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the dissertation the ecological and biological properties of *Bradyrhizobium japonicum* isolates isolated from the chernozem soils of Ukraine after their long existence in a saprotrophic conditions have been researched. Based on the conducted studies, the ecological and biological features of *Bradyrhizobium japonicum* isolates from the chernozem soils of Ukraine were identified, which ensure the formation and effective functioning of the symbiotic interaction with soybean plants under pre-treatment bacterization of seeds. The evaluation of the properties of *Bradyrhizobium japonicum* isolates from the soil, which ensuring the effective formation and functioning of symbiotic systems with *Glycine max* (L.) Merrill was evaluated. The formation of sustainable legume-rhizobial symbiosis is ensured by their nodulating ability, nitrogenase activity, the synthesis of exopolysaccharides, the effectiveness of interaction with soybean plants.

It has been established, that the isolates, which, after a long existence in a saprotrophic conditions, retained a high activity, and they form an active symbiotic soybean nodule apparatus, are virulent, have high nitrogen activity, mark a considerable amount of leg-hemoglobin in the nodules of soybean roots, are characterized by high the synthesis of EPS, with significant rheological properties. Thanks to the ability of the isolates to synthesize EPS with significant rheological features and increase the adhesive properties of crops, which allow them to be stored longer in the culture fluid and on the surface of soybean seeds. It can be assumed, that the ability of the nodule bacteria isolates to substantial development of the EPS may increase their adaptation and survival in the soil of various biocenoses.It has been established, that in the chernozem soils of the Forest-steppe of Ukraine there are highly active isolates of *Bradyrhizobium japonicum*, that adapted to saprotrophic existence, but did not lose their ability to ensure the formation and effective functioning of the symbiotic system with soybean plants *Glycine max* (L.) Merrill.

The existence of highly active isolates of *Bradyrhizobium japonicum* adapted to saprotrophic existence in the chernozem soils of the Forest-Steppe of Ukraine and their ecological and biological properties, ensuring the formation and effective functioning of the symbiotic system with soybean plants of *Glycine max* (L.) Merrill, promotes an increase in yield and seed quality.

It was established, that the usage of the *B. japonicum* LG 5 and LG 2 isolates conduced the formation of 1.29 and 1.33 m^2 of the absorbing surface of the soybean roots, which were at the level of the absorbing surface formed with using the Rizoaktiv preparation.

The possibility of seed inoculation with *B. japonicum* LG 2 and LG 5 isolates has been studied, after they have been treated by Maxim, Vitavax 200 FF and Redigo M, because they do not reduce the inoculation of the inoculum load on soybean seeds by pre-

treatment. Moreover, the use of culture broth of *B. japonicum* LG 5 isolate with a high content of EPS with significant rheological parameters were more resistant to the action of pesticides.

Thanks to the analysis of chernozem soils, highly effective isolates of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* LG 2 and LG 5 were obtained, which can be used as a basis for the production of a microbial preparation of nitrogen fixing soybean bacteria to increase the yield and quality of soybean seeds. It was found, that the use of *B. japonicum* LG 5 and LG 2 isolates of contributed to the formation of a significant absorption surface of the roots, was at the level of the absorption surface formed whith usage of the Rizoaktiv preparation. Under field conditions, it was also shown, that after pre-sowing treatment of soybean seeds with a culture of *B. japonicum* LG 5 isolate, nitrogenase activity of the nodules les increased by 20.4% relative to pre-sowing treatment with a standard and was equal to 1.18 nmol C_2H_4 formed per plant per hour, and when using strain LG 2, it was 1.05 nmol C_2H_4 formed per plant per hour, which is 7.1% more than the standard (Rizoaktiv preparation). For the first time competitive highly active *Bradyrhizobium japonicum* LG 2 and LG 5 isolates, which were isolated from chernozem soil and which retained the ability of active symbiotic interaction with *Glycine max* (L.) Merrill, namely, the nitrogenase activity of nodules on soybean roots 2.07 and 2.18 nmol/plant/h, nodulating ability of 31.5 and 38.6 nodules per plant, content of leghemoglobin – 0.565 and 0.658 mg/g, accordingly. They contributed to an increase in yield of 0.5–0.6 t/ha compared with the control. Whith usage of the isolates *Bradyrhizobium japonicum* LG 5, the yield increased by 4.4% compared to the standard.

Keywords*: nodule bacteria, Bradyrhizobium japonicum, soybean, isolate, symbiotic system, nitrogenase activity, nodulation ability, nitrogen fixation.*

Підписано до друку 23.04.2019 р. Зам. № 359
Формат 60х90 1/16. Папір офсетний. Друк – цифровий.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 1,4.
Друк «ЦП «КОМПРИНТ», Свідоцтво ДК № 4131 від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
528-05-42, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net