

УДК 581.557:579.64

## РЕАКЦИЯ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА НА ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Сытников Д. М.<sup>1</sup>, Шейко Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»,

Симферополь, Республика Крым, Россия

E-mail: sytnikov@list.ru

Изучена реакция сои *Glycine max* L. Мегг. на бактеризацию комплексными микробными препаратами на основе клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum*, свободноживущего азотфиксатора *Azotobacter chroococcum* и фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus megatericum* при обработке различными дозами регулятора роста растений. Результаты вегетационных опытов указывают на перспективность использования для инокуляции семян микробных препаратов, включающих в себя клубеньковые и фосфатмобилизующие бактерии, на фоне применения ½ рекомендованной дозы биосила. Такое сочетание биоагентов способствует накоплению растениями вегетативной массы и стимулирует ризогенез, повышает вирулентность штамма-инокулянта, а также содержание фотосинтетических пигментов в листьях. При этом возрастает уровень азотфиксирующей активности симбиотических систем, их продуктивность и количество белка в семенах.

**Ключевые слова:** *Glycine max* (L.) Мегг., *Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatericum*, комплексная бактеризация, эффективность симбиоза, биосил.

### ВВЕДЕНИЕ

Современные биотехнологии растениеводства предусматривают применение биопрепаратов на основе различных почвенных микроорганизмов, соответствующих требованиям экологической безопасности и обладающих широким спектром положительного влияния на растения и окружающую природную среду. Одним из перспективных подходов повышения продуктивности растений является оптимизация азотфиксации в агробиоценозах при участии симбиотических и ассоциативных микроорганизмов в комплексе с биологически активными веществами [1, 2].

Высокотехнологичные микробные препараты способны сохранять необходимый титр и физиологическую активность биоагентов в течение длительного времени. Актуальным является создание новых микробных препаратов на основе различных микроорганизмов, введение в их состав различных биологически активных веществ и компонентов, способствующих пролонгированию сроков хранения, улучшению свойств микроорганизмов и их выживанию после инокуляции [2, 3].

Для повышения продуктивности растений широко применяются различные стимуляторы роста растений. Их разделяют на синтетические (N-оксиды

производных пиридина [4], фосфорилированные азолы и другие аналоги фитогормонов) и природные: ауксины, гибберелины, цитокинины и фузикоцин [5].

На становление симбиоза между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями влияют вещества как растительного, так и микробного происхождения [3, 6]. Влияние отдельных синтетических регуляторов роста на продуктивность азотфиксирующего симбиоза изучено в опытах с соей и другими бобовыми растениями. Установлено, что применение регуляторов роста в определённых концентрациях стимулирует развитие бобово-ризобияльного симбиоза, активность азотфиксации, продуктивность растений и содержание в них азота [7–9].

Для повышения уровня азотфиксации в агробиоценозах создаются комплексные микробные препараты, содержащие кроме клубеньковых бактерий, свободноживущие азотфиксирующие и фосфатмобилизирующие микроорганизмы [10, 11].

Содержание пигментов в листьях зависит от симбиотических свойств клубеньковых бактерий и фазы развития растений [12]. Принято полагать, что содержание фотосинтетических пигментов в листьях инокулированных растений является одним из косвенных показателей эффективности симбиоза. При этом известно [13], что интенсивность азотфиксации в клубеньках при дефиците минерального азота определяет интенсивность фотосинтеза растений.

Целью настоящей работы было изучить влияние комплексных микробных препаратов в присутствии экологически чистого биостимулятора на эффективность симбиоза у растений сои.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили растения сои *Glycine max* (L.) Merr. сорта Киевская 27, а также активный штамм медленнорастущих клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018, свободноживущий азотфиксатор *Azotobacter chroococcum* В-7171 и фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus megatericum* В-7168. В работе применяли регулятор роста растений биосил, приобретённый в МНТЦ «Агробиотех».

Вегетационные исследования проводили в условиях модельных опытов на вегетационной площадке при влажности субстрата 60 % и естественном освещении. Растения выращивали по 6 штук в 8-килограммовых сосудах Вагнера. Сосуды предварительно стерилизовали 20 %-ным раствором  $H_2O_2$ . В качестве субстрата использовали оподзоленный чернозём (рН 5,8–6,1, содержание гумуса 4–5 %) с добавлением минеральных питательных растворов ( $N_{30}P_{90}K_{90}$ ), а также микроудобрения ТМ «Реаком», содержащего комплекс микроэлементов.

Перед посевом семена стерилизовали 70 %-ным этанолом в течение 15 мин, а затем промывали проточной водой в течение 2 ч. После этого в зависимости от схемы опыта семена сои подвергали бактеризации специально подготовленной суспензией (композицией) соответствующих штаммов микроорганизмов, затем обрабатывали полной или  $\frac{1}{2}$  дозой биосила и выдерживали 60 мин. Титр бактериальных клеток в суспензии *B. japonicum* составил  $2 \times 10^8$  кл/мл,

*A. chroococcum* –  $2 \times 10^8$  кл/мл и *B. megatericum* –  $0,5 \times 10^6$  кл/мл. Работу с микроорганизмами производили по общепринятым в микробиологии правилам.

Контролем служили растения без бактериализации, а также растения обработанные только биосилом или инокулированные активным штаммом *B. japonicum*. Отбор растительного материала для анализа производили в фазах 4-х настоящих листьев и цветения – начала плодообразования на 30-е и 60-е сутки от появления всходов соответственно.

Биометрические показатели – массу сырого и сухого вещества надземной части растений, корней и клубеньков определяли в пяти-десятикратной повторности. Фиксацию образцов производили в течение 20 мин при 105 °С и высушивали при 60–65 °С в течение 4 ч. После учёта урожая в семенах сои определяли общее содержание белка по методике, описанной в практикуме [14].

*Нитрогеназную (азотфиксирующую) активность* определяли по уровню ацетиленовосстанавливающей активности корневых клубеньков ацетиленовым методом [6, 15]. Корни растений с клубеньками в пятикратной повторности помещали в герметично закрывающиеся стеклянные флаконы емкостью 75 см<sup>3</sup>, в которые вводили 10 % ацетилена. Продолжительность инкубации – 1 ч. После инкубации газовую смесь, содержащую этилен, образовавшийся в результате редукции ацетилена нитрогеназой, анализировали на газовом хроматографе Chromatograf-504 («Mera Elwro», Польша) с пламенно-ионизационным детектором.

*Определение содержания пигментов* производили по методике Веллбурна [16]. Хлорофиллы и каротиноиды экстрагировали диметилсульфоксидом (на 0,1 г растительного материала 10 мл ДМСО) из высечек листьев, после чего измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре «Smart Spec Plus» (Biorad, США) при 665 и 649 нм в кювете толщиной 1 см. Для измерений брали пробы средних долей тройчатых листьев закончивших рост и без видимых признаков старения. Листья отбирали из средних ярусов пяти рендомезированных растений одного варианта.

*Статистическую обработку* полученных данных производили по Доспехову [17]. В таблицах и в тексте представлены %, средние арифметические, стандартные ошибки и НСР. Достоверность разницы значений оценивали, используя 5 % уровень значимости ( $P \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе вегетационного опыта были проанализированы экологические факторы, оказывающие существенное влияние на показатели эффективности симбиоза. Прежде всего, это активность клубеньковых бактерий, различные комбинации специфического штамма-микросимбионта (*B. japonicum*) с другими микроорганизмами при инокуляции (свободноживущий азотфиксатор *A. chroococcum* или фосфатмобилизующая бактерия *B. megatericum*), а также присутствие и доза используемого биологически-активного вещества (биосил).

Из данных таблицы 1 следует, что внесение в инокуляционную суспензию активного штамма *B. japonicum* микробных препаратов *A. chroococcum* и

*B. megatericum* достоверно приводило к замедлению накопления зелёной массы растениями сои (варианты 6 и 7) в фазу 4-х настоящих листьев.

**Таблица 1**

**Влияние комплексных микробных препаратов и биосила на формирование надземной массы растений сои *Glycine max* L. Merr., фаза 4-х настоящих листьев**

№ п/п	Инокуляция (обработка)	Надземная масса		Сухая надземная масса
		г/растение	% к штамму	г/растение
1	Контроль	8,49 ± 0,51	104	1,66 ± 0,06
2	Биосил	6,76 ± 0,52*	83	1,62 ± 0,18
3	Штамм <i>B. japonicum</i>	8,15 ± 0,58	100	1,63 ± 0,13
4	<i>B. japonicum</i> + биосил	8,54 ± 0,53	105	1,61 ± 0,12
5	<i>B. japonicum</i> + биосил (½)	8,34 ± 0,42	102	1,59 ± 0,17
6	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	7,32 ± 0,43*	90	1,52 ± 0,05*
7	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i>	7,77 ± 0,15*	95	1,52 ± 0,07*
8	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	6,36 ± 0,34*	78	1,34 ± 0,07*
9	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	8,51 ± 0,05	104	1,61 ± 0,17
10	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил	8,39 ± 0,69	103	1,68 ± 0,15
11	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил (½)	8,91 ± 0,74	109	1,68 ± 0,13

Примечание: «\*» – достоверность рассчитана относительно данных контроля.

При обработке семян биосилом без бактериализации показатели надземной массы растений были почти самыми низкими в сравнении с контролем и другими опытными вариантами. Для формирования надземной массы имела значение доза используемого биологически активного вещества. Так, при использовании комплексных препаратов с рекомендованной дозой биосила, было отмечено достоверное угнетение роста растений (вариант 8) или незначительное увеличение их массы (варианты 4 и 10) в сравнении с инокуляцией *B. japonicum*. В то же время, применение ½ дозы биосила во всех вариантах её применения проявилось тенденцией к увеличению накопления надземной массы растений (варианты 5, 9 и 11), где незначительная прибавка находилась в пределах 4–9 %. По показателям сухой надземной массы достоверные зависимости между вариантами опыта сохранялись.

Таблица 2

Влияние комплексных микробных препаратов и биосила на формирование надземной массы растений сои *Glycine max* L. Merr., фаза цветения – начала плодообразования

№ п/п	Инокуляция (обработка)	Надземная масса		Сухая надземная масса
		г/растение	% к штамму	г/растение
1	Контроль	9,94 ± 0,29	83	2,48 ± 0,16
2	Биосил	10,01 ± 0,71	84	2,43 ± 0,08
3	Штамм <i>B. japonicum</i>	11,91 ± 1,22*	100	2,53 ± 0,22
4	<i>B. japonicum</i> + биосил	11,30 ± 0,34*	95	2,48 ± 0,10
5	<i>B. japonicum</i> + биосил (½)	13,11 ± 0,27*	110	2,75 ± 0,10*
6	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	12,51 ± 0,51*	105	2,58 ± 0,11
7	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i>	11,19 ± 0,68*	94	2,48 ± 0,14
8	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	11,51 ± 0,71*	97	2,49 ± 0,11
9	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	10,53 ± 0,18*	88	2,37 ± 0,14
10	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил	10,74 ± 0,33*	90	2,42 ± 0,11
11	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил (½)	12,86 ± 0,57*	108	2,81 ± 0,11*

Примечание: «\*» – достоверность рассчитана относительно данных контроля.

К началу плодообразования все растения были хорошо развиты (табл. 2). Инокуляция сои активным штаммом *B. japonicum* и комплексными микробными препаратами на его основе достоверно увеличивали накопление растениями надземной массы в сравнении с контролем. Наиболее выраженное её нарастание отмечалось при инокуляции растений активным штаммом, а также комплексным микробным препаратом, включающим фосфатмобилизующие бактерии при обработке ½ дозы биосила (варианты 5 и 11). Показатели сухой надземной массы достоверно превышали контроль только в упомянутых вариантах опыта (см. табл. 2).

Данные о влиянии комплексных микробных препаратов и биосила на формирование корневой системы у растений сои в фазу 4-х настоящих листьев представлены в таблице 3. Достоверное увеличение массы корней в сравнении с контролем наблюдалось при инокуляции активным штаммом *B. japonicum*, а также при его сочетании с *A. chroococcum* и *B. megatericum* на фоне биосила (варианты 3, 8 и 11). Во всех остальных вариантах применение совместной инокуляции

микробными препаратами и биосилом не оказывало существенного влияния на ризогенез. Обработка семян биосилом без инокуляции проявилась тенденцией к замедлению роста корневой системы (вариант 2).

Таблица 3

**Влияние комплексных микробных препаратов и биосила на ризогенез растений сои *Glycine max* L. Merr.**

№ п/п	Инокуляция (обработка)	Фаза развития			
		4-х настоящих листьев		Цветение	
		г/растение	% к штамму	г/растение	% к штамму
1	Контроль	4,77 ± 0,19	88	6,99 ± 0,44	100
2	Биосил	4,03 ± 0,55	74	5,61 ± 0,34*	80
3	Штамм <i>B. japonicum</i>	5,45 ± 0,39*	100	6,98 ± 0,41	100
4	<i>B. japonicum</i> + биосил	4,79 ± 0,32	88	5,41 ± 0,51*	78
5	<i>B. japonicum</i> + биосил (½)	5,39 ± 0,56	99	7,33 ± 0,55	105
6	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	5,04 ± 0,47	92	5,22 ± 0,50*	75
7	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i>	4,75 ± 0,46	87	5,72 ± 0,48*	82
8	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	5,64 ± 0,25*	103	5,70 ± 0,31*	82
9	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	5,26 ± 0,42	97	5,36 ± 0,61*	77
10	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил	4,78 ± 0,30	88	4,98 ± 0,54*	71
11	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил (½)	6,10 ± 0,58*	112	7,12 ± 0,47	102

Примечание: «\*» – достоверность рассчитана относительно данных контроля.

С наступлением цветения масса корневой системы растений увеличивалась во всех вариантах, однако применение комплексных микробных препаратов заметно сдерживало её развитие. Из данных таблицы 3 следует, что достоверное снижение массы корней в сравнении с контролем было отмечено во всех вариантах опыта за исключением инокуляции активным штамом *B. japonicum*, (в т.ч. при обработке ½ дозы биосила) и комплексным препаратом на основе *B. megatericum* с ½ дозы биосила.

Важным показателем эффективности соево-ризобиального симбиоза является количество и масса образовавшихся на корнях клубеньков (табл. 4). Растения, выращенные без инокуляции и после обработки биосилом, не формировали

клубеньков. Они могли появляться спонтанно, в единичном количестве, и без способности фиксировать азот атмосферы.

В фазу 4-х настоящих листьев у растений, инокулированных активным штаммом *V. japonicum*, применение биосила достоверно увеличивало количество клубеньков на корнях (варианты 4 и 5). Повышение их количества также отмечено при использовании комплексных микробных препаратов, включающих в себя кроме активного штамма *V. japonicum* фосфатмобилизующие бактерии *V. megatericum* и биосил (варианты 7, 10 и 11). Показатели массы клубеньков во всех вариантах инокуляции находились в пределах ошибки опыта, достоверно уступая контролю при использовании комплексных микробных препаратов, содержащих свободноживущий азотфиксатор *A. chroococcum* и биосил (варианты 8 и 9).

Таблица 4

**Влияние комплексных микробных препаратов на индуцирование корневых клубеньков у сои *Glycine max* L. Merr.**

№ п/п	Инокуляция (обработка)	Фаза развития			
		4-х настоящих листьев		Цветение	
		шт/ растение	г/ растение	шт/ растение	г/ растение
1.	Контроль	0	0	0	0
2.	Биосил	0	0	0	0
3.	Штамм <i>V. japonicum</i>	18 ± 1,1	0,37 ± 0,03	35 ± 2,1	0,69 ± 0,05
4.	<i>V. japonicum</i> + биосил	24 ± 1,6*	0,35 ± 0,04	34 ± 1,7	0,67 ± 0,01
5.	<i>V. japonicum</i> + биосил (½)	26 ± 0,6*	0,35 ± 0,02	35 ± 1,5	0,70 ± 0,01
6.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	21 ± 1,8	0,38 ± 0,03	34 ± 1,9	0,65 ± 0,01
7.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i>	24 ± 1,4*	0,34 ± 0,03	34 ± 1,1	0,65 ± 0,01
8.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	16 ± 1,4	0,25 ± 0,02*	29 ± 1,6*	0,47 ± 0,01*
9.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	21 ± 1,4	0,28 ± 0,03*	30 ± 1,5*	0,57 ± 0,01*
10.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i> + биосил	23 ± 1,0*	0,37 ± 0,01	31 ± 1,9	0,69 ± 0,01
11.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i> + биосил (½)	25 ± 1,0*	0,37 ± 0,03	34 ± 1,8	0,74 ± 0,01

Примечание: «\*» – достоверность рассчитана относительно данных инокуляции штаммом *V. japonicum*.

С наступлением цветения количество и масса клубеньков значительно возрастали, существенно не различаясь по большинству вариантов инокуляции

(обработки). При этом микробные препараты, содержащие *A. chroococcum* при обработке биосилом, по-прежнему, достоверно угнетали клубенькообразование (см. табл. 4).

Известно, что фиксация молекулярного азота клубеньками тесно сопряжена с процессами фотосинтеза, в связи с чем содержание фотосинтетических пигментов в листьях рассматривают в качестве косвенного показателя эффективности бобово-ризобиального симбиоза. Результаты опыта показали (табл. 5), что инокуляция активным штаммом *B. japonicum*, а также комплексными микробными препаратами положительно влияли на изменение содержания в листьях хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в фазу цветения – начала плодообразования.

Таблица 5

Содержание фотосинтетических пигментов (мг/г)  
в листьях сои (*Glycine max* L. Merr.), инокулированной комплексными микробными препаратами, фаза цветения – начала плодообразования

№ п/п	Инокуляция (обработка)	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	каротиноиды
1	Контроль	0,98 ± 0,05*	0,33 ± 0,01*	0,31 ± 0,01*
2	Биосил	0,80 ± 0,01*	0,25 ± 0,01*	0,29 ± 0,01*
3	Штамм <i>B. japonicum</i>	1,75 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,52 ± 0,01
4	<i>B. japonicum</i> + биосил	1,96 ± 0,01*	0,57 ± 0,01*	0,55 ± 0,01*
5	<i>B. japonicum</i> + биосил (½)	2,67 ± 0,03*	0,83 ± 0,01*	0,66 ± 0,01*
6	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	2,36 ± 0,05*	0,72 ± 0,02*	0,57 ± 0,01*
7	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i>	1,89 ± 0,02*	0,55 ± 0,01*	0,55 ± 0,01*
8	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	2,52 ± 0,04*	0,73 ± 0,02*	0,57 ± 0,01*
9	<i>B. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	2,47 ± 0,02*	0,72 ± 0,01*	0,56 ± 0,01*
10	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил	1,97 ± 0,06*	0,60 ± 0,03*	0,54 ± 0,01
11	<i>B. japonicum</i> + <i>B. megatericum</i> + биосил (½)	2,13 ± 0,06*	0,66 ± 0,05*	0,61 ± 0,02*

Примечание: «\*» – достоверность рассчитана относительно данных инокуляции штаммом *B. japonicum*.

Применение обработки биосилом без инокуляции достоверно снижало содержание пигментов в листьях в сравнении с контролем. Максимальное же их количество содержали растения, инокулированные активным штаммом *B. japonicum* после обработки ½ дозы биосила.

**Таблица 6**

**Азотфиксирующая активность клубеньков (АФА), урожай и содержание белка в семенах сои (*Glycine max* L. Merr.), инокулированной комплексными микробными препаратами**

№ п/п	Инокуляция (обработка)	АФА, мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (растение · ч)		Урожай		Содержание белка, %
		I	II	г/сосуд	% к штамму	
1.	Контроль	0	0	10,0	30	40,7
2.	Биосил	0	0	28,5	85	40,2
3.	Штамм <i>V. japonicum</i>	5,4 ± 0,53	7,93 ± 0,17	33,5	100	41,8
4.	<i>V. japonicum</i> + биосил	4,9 ± 0,55	7,94 ± 0,62	35,0	104	42,1
5.	<i>V. japonicum</i> + биосил (½)	4,9 ± 0,11	8,76 ± 0,70*	37,5	112	41,8
6.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i>	4,3 ± 0,58	7,37 ± 0,40	33,4	100	42,7
7.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i>	5,0 ± 0,77	7,55 ± 0,56	35,1	105	41,8
8.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил	4,9 ± 0,70	8,08 ± 0,88	35,1	105	41,9
9.	<i>V. japonicum</i> + <i>A. chroococcum</i> + биосил (½)	4,7 ± 0,42	7,93 ± 0,31	35,5	106	41,8
10.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i> + биосил	4,4 ± 0,65	8,18 ± 0,53	33,8	101	41,3
11.	<i>V. japonicum</i> + <i>V. megatericum</i> + биосил (½)	4,7 ± 0,54	8,59 ± 0,44*	35,7	107	42,7
	НСР <sub>0,05</sub>			2,1		0,9

Примечание: I – фаза 4-х настоящих листьев, II – фаза цветения – начала плодообразования; «\*» – достоверность рассчитана относительно данных инокуляции штаммом *V. japonicum*.

Увеличение количества хлорофиллов *a* и *b* более чем в 1,5 раза может указывать на способность определённых доз биологически активного вещества оказывать положительное влияние на метаболизм ризобий, что отражается на их симбиотических свойствах.

В фазу 4-х настоящих листьев уровень азотфиксирующей активности растений сои, при бактеризации комплексными микробными препаратами, существенно не

отличался от аналогичных показателей при инокуляции активным штаммом *V. japonicum* и находился в пределах ошибки опыта (табл. 6). С началом плодобразования уровень нитрогеназной активности клубеньков возрастал во всех вариантах. При этом отмечено достоверное увеличение азотфиксации у растений, инокулированных активным штаммом *V. japonicum*, а также комплексным микробным препаратом, включающим в себя фосфатмобилизующие бактерии *V. megatericum* при обработке ½ дозы биосила (варианты 5 и 11).

Из представленных в таблице 6 показателей урожая следует, что применение для бактеризации семян сои большинства комплексных микробных препаратов не приводило к существенному изменению интегрального показателя эффективности взаимодействия партнёров симбиоза – зерновой продуктивности растений ( $НСР_{0,05} = 2,1$  г/сосуд). Как и в случае с азотфиксирующей активностью, исключение составили растения, инокулированные *V. japonicum*, а также комплексным микробным препаратом с *V. megatericum* при обработке ½ дозы биосила (варианты 5 и 11). Достоверная прибавка урожая зерна в этих вариантах по отношению к инокуляции активным штаммом *V. japonicum* составила 12 и 7 % соответственно. В то же время, бактеризация сои любыми из изученных микробных препаратов, независимо от использования и дозировки биосила, приводила к повышению белка в семенах в сравнении с контролем без инокуляции.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе вегетационных опытов показано, что применение рекомендованной дозы биосила при инокуляции растений сои активным штаммом *V. japonicum*, достоверно повышает вирулентность бактерий. Включение в инокуляционную суспензию фосфатмобилизующих бактерий *V. megatericum* увеличивает данный показатель независимо от использования регулятора роста.
2. Комплексные микробные препараты, включающие в себя активный штамм *V. japonicum* и свободноживущий азотфиксатор *A. chroococcum* на фоне рекомендованной дозы биосила могут положительно влиять на ризогенез растений сои.
3. Установлено, что применение ½ дозы биосила в сочетании с инокуляцией растений сои активным штаммом *V. japonicum* или в комплексе с фосфатмобилизующими бактериями *V. megatericum* способствует накоплению вегетативной массы и массы корней растениями, повышению вирулентности бактерий, а также прибавке урожая зерна.
4. Бактеризация сои любыми из изученных микробных препаратов, независимо от использования и дозировки биосила, приводила к повышению содержания хлорофилла и каротиноидов в листьях и белка в семенах в сравнении с контролем без инокуляции.

Список литературы

1. Вильдфлуш И. Р. Влияние новых форм удобрений и регуляторов роста на фотосинтетическую деятельность посевов, урожайность и качество зерна сортов ячменя кормового назначения / И. Р. Вильдфлуш, А. Р. Цыганов, Н. В. Барбасов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2019. – Т. 57, № 3. – С. 297–307.
2. Титова Л. В. Роль липкогенных компонентов в повышении физиологической активности ризобий и продуктивности соево-ризобиального симбиоза / Л. В. Титова, И. С. Бровко, Н. О. Леонова [и др.] // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 6. – С. 9–16.
3. Сытников Д. М. Биотехнология микроорганизмов-азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе / Д. М. Сытников // Biotechnol. Acta. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 34–45.
4. Пономаренко С. П. Регуляторы роста растений на основе N-оксидов производных пиридина (физико-химические свойства и биологическая активность) / Пономаренко С. П. – Киев: Техника, 1999. – 272 с.
5. Кефели В. И. Природные и синтетические регуляторы онтогенеза растений / В. И. Кефели, П. В. Власов, Л. Д. Прусакова [и др.] // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Физиология растений. – 1990. – Т. 7. – 160 с.
6. Старченков Е. П. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях / Е. П. Старченков, Н. И. Белима, В. М. Желюк [и др.]. – Киев: Наук. думка, 1984. – 224 с.
7. Патыка В. Ф. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современном земледелии Украины / В. Ф. Патыка, Н. З. Толкачѳв, О. Ю. Бутвина. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, № 5. – С. 384–393.
8. Толкачѳв Н. З. Повышение эффективности симбиотической азотфиксации и продуктивности сои путѳм применения стимуляторов и биопрепаратов / Толкачѳв Н. З. // Физиология и биохимия культ. растений – 1997. – Т. 24, № 4. – С. 304–309.
9. Шильникова В. К. Эффективность инокуляции семян гороха при обработке растений синтетическими регуляторами роста / В. К. Шильникова, О. Г. Волобуева, Г. П. Гурьев // Изв. ТСХА. – 1992. – № 1. – С. 85–90.
10. Шабаев В. П. Минеральное питание и продуктивность люцерны при инокуляции смешанными культурами бактерий / В. П. Шабаев // Агрехимия. – 2006 – № 9. – С. 24–32.
11. Rasipour L. Interactive Effect of phosphate solubilizing bacteria and *Bradyrhizobium japonicum* on growth nodule indices and some nutrient uptake of soybean / L. Rasipour, N. Ali Asgharzadeh // Water and Soil Science. – 2007. – Vol. 11, N 40 (A). – P. 53–63.
12. Антипчук А. Ф. Связь между показателями фотоассимиляционной активности бобовых растений и их симбиотической азотфиксацией / А. Ф. Антипчук, Р. М. Канцелярук, В. Н. Рангелова [и др.] // Микробиол. журн. – 1990. – 52, № 6. – С. 49–53.
13. Сытников Д. М. Интенсивность фотосинтеза и лектиновая активность листьев сои при инокуляции ризобиями совместно с гомологичным лектином / Д. М. Сытников, С. Я. Коць, С. М. Маличенко, Д. А. Киризий // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 2. – С. 189–195.
14. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош [и др.]; Под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1989. – 430 с.
15. Hardy R. W. F. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: Laboratory and field evaluation / R. W. F. Hardy, R. D. Holsten, E. K. Jackson, R. C. Burns // Plant Physiol. – 1968. – 43, N 8. – P. 1185–1207.
16. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions / A. R. Wellburn // J. Plant Physiol. – 1994. – 144, N 3. – P. 307–313.
17. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

## REACTION OF SOYBEAN-RHIZOBIUM SYMBIOSIS ON THE APPLICATION OF COMPLEX MICROBIAL PREPARATIONS

Sytnikov D. M.<sup>1</sup>, Sheiko E. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russia

<sup>2</sup>V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

E-mail: sytnikov@list.ru

The reaction of soybean *Glycine max* L. Merr. to inoculation with complex microbial preparations based on nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum*, free-living nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* and phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus megatericum* was studied under treated with various doses of plant growth regulator.

Studies were conducted under the conditions of model pot experiments on a growing plot with a substrate humidity of 60 % and natural light. The selection of plant material for analysis was carried out in the phases of 4 true leaves and flowering (the beginning of seed formation) on the 30th and 60th days from the emergence of seedlings, respectively.

Nitrogenase activity (nitrogen-fixation) was determined by the level of acetylene-reducing activity of root nodules by the acetylene method. Chlorophylls and carotenoids were extracted with dimethylsulfoxide from leaf cuttings, after which the optical density of the solution was measured on a spectrophotometer. After harvesting of soybean seeds the total protein content was determined.

The data were processed statistically. In the tables and in the text, %, arithmetic means, standard errors and least significant difference are presented. The significance of the difference in values was assessed using the 5 % significance level ( $P \leq 0.05$ ).

The results indicate the prospective applying of microbial preparations for inoculation of seeds, including nodule and phosphate-mobilizing bacteria, on the using background of ½ the recommended dose of biosil.

The above combination of bioagents promotes the accumulation of vegetative mass by plants and stimulates their rhizogenesis, increases the virulence of the inoculant strain, as well as the content of photosynthetic pigments in the leaves. At the same time, the level of nitrogen-fixing activity of the symbiotic systems of soybean, their productivity and the amount of protein in the seeds are increased.

**Keywords:** *Glycine max* L. Merr., *Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megatericum*, complex bacterization, efficiency of symbiosis, biosil.

### References

1. Vildflush I. R., Tsyganov A. R. and Barbasov N. V., Effect of new forms of fertilizers and growth regulators on photosynthetic activities of crops, yield and barley grain quality of feed purpose varieties, *Vestsi Natsyyanalnai akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk*, **57** (3), 297 (2019). (in Russ.).
2. Titova L. V., Brovko I. S., Leonova N. O., Votselko S. K., Iutinskaya G. A. and Patyka V. F., Role of sticky-gene components in the increase of rhizobia physiological activity and productivity of soybean-rhizobia symbiosis, *Mikrobiol. zhurn.*, **74** (6), 9 (2012). (in Russ.).

3. Sytnikov D. M., Biotechnology of microbial nitrogen fixers and future trends of their preparation application, *Biotechnol. Acta*, **5** (4), 34 (2012). (in Russ.).
4. Ponomarenko S. P., *Plant growth regulators based on N-oxides of pyridine derivatives (physicochemical properties and biological activity)*, 272 p. (Kiev: Tekhnika, 1999). (in Russ.).
5. Kefeli V. I., Vlasov P. V., Prusakova L. D. [et al.], Natural and synthetic regulators of plant ontogenesis, *Itoги nauki I tekhniki. VINITI. Seriya Fiziologiya rastenii*, **7**, 160 (1990). (in Russ.).
6. Starchenkov E. P., Belima N. I., Zheluk V. M. [et al.], *Bonding of molecular nitrogen by nodule bacteria under symbiotic and cultural conditions*, 224 p. (Kiev: Naukova dumka, 1984). (in Russ.).
7. Patyka V. F., Tolkachev N. Z. and Butvina O. Yu., The main optimization directions of symbiotic nitrogen fixation in modern agriculture in Ukraine, *Fiziologiya i biokhimiya kult. rastenii*, **37** (5), 384 (2005). (in Russ.).
8. Tolkachev N. Z., Enhancing the efficiency of symbiotic nitrogen fixation and productivity of soybean through the applying of stimulants and biopreparations, *Fiziologiya i biokhimiya kult. rastenii*, **24** (4), 304 (1997). (in Russ.).
9. Shylnikova V. K., Volobuyeva O. G. and Guryev G. P., Efficiency of inoculation of pea seeds under plants treatment with synthetic growth regulators, *Izvestiya TSKhA*, **1**, 85 (1992). (in Russ.).
10. Shabayev V. P., Mineral nutrition and productivity of alfalfa after inoculation with mixed cultures of bacteria, *Agrokhimiya*, **9**, 24 (2006). (in Russ.).
11. Rasipour L. and Ali Asgharzadeh N., Interactive effect of phosphate solubilizing bacteria and *Bradyrhizobium japonicum* on growth nodule indices and some nutrient uptake of soybean, *Water and Soil Science*. **11** (40 A), 53 (2007).
12. Antipchuk A. F., Kantselyaruk R. M., Rangelova R. M. [et al.], Relations between indicators of photosynthetic activity of legume plants and their symbiotic nitrogen-fixation, *Mikrobiol. zhurn.*, **52** (6), 49 (1990). (in Russ.).
13. Sytnikov D. M., Kots S. Ya, Malichenko S. M. and Kirizy D. A., Photosynthetic rate and lectin activity of soybean leaves after inoculation with rhizobia together with homologous lectin, *Russian Journal of Plant Physiology*, **53** (2), 169 (2006).
14. *Methods of biochemical research of plants*, Ed.: A.I. Ermakov, 430 p. (Leningrad: Agropromizdat, Leningr. otd-nie, 1989). (in Russ.).
15. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., and Burns R. C., The acetylene-ethylene assay for  $N_2$ -fixation: Laboratory and field evaluation, *Plant Physiol.*, **43** (8), 1185 (1968).
16. Wellburn A. R., The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions, *J. Plant Physiol.*, 144 (3), 307 (1994).
17. Dospekhov B. A., *Field experiment methodology (with the basics of statistical processing of research results)*, 351 p. (Moscow: Agropromizdat, 1985). (in Russ.).