

Корисна модель належить до галузі сільськогосподарської мікробіології, а саме до мікробних засобів підвищення врожайності сої шляхом використання штаму бульбочкових бактерій виду *Bradyrhizobium diazoefficiens* - продуцента речовин фітогормональної природи.

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) є основною зернобобовою культурою світового землеробства і однією із стратегічних культур для України. Використання активних штамів бульбочкових бактерій для покращення росту та живлення рослин сої вважається перспективним підходом в екологічному землеробстві. Як основа біологічних препаратів вони забезпечують підвищення врожайності, поліпшення якості одержуваної продукції та сприяють формуванню в агроценозах місцевих угруповань специфічних бульбочкових бактерій [1-2].

Відомо, що у симбіотичні взаємовідносини з соєю можуть вступати бульбочкові бактерії різних видів: *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. diazoefficiens*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *tredii*, *S. xinjiangensis* і *Mesorhizobium tianshanense* [3]. У ґрунтах України типовими мікросимбіонтами сої є бульбочкові бактерії виду *B. japonicum*. У вітчизняній літературі не виявлено даних щодо інфікування сої іншими видами ризобій. Важливим завданням сьогодення залишається збільшення продуктивності цієї культури. Використання штамів-інокулянтів ризобій сої нових для України видів може забезпечити не лише розвиток активного симбіозу, підвищення урожайності сої, але і сприятиме формуванню гетерогенних ґрунтових популяцій її мікросимбіонтів, підтримці їх біологічного різноманіття.

Відомі штами бульбочкових бактерій *B. japonicum* 24108 [4] і *B. japonicum* KH10, які рекомендовані для підвищення урожайності сої [5]. Відомий штам *B. japonicum* 6346, який широко застосовується як стандартний штам у наукових дослідженнях і є активним симбіотичним азотфіксатором. Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є штам *B. japonicum* M-8 біоагент мікробних препаратів для сої [6].

Проте зазначені штами бульбочкових бактерій виду *B. japonicum* поступаються запропонованому штаму виду *B. diazoefficiens* за конкурентоспроможністю та здатністю підвищувати урожайність сої. Також практично не досліджувалась їх здатність продукувати біологічно активні речовини фітогормональної природи, яка є одним із важливих критеріїв симбіотичного потенціалу ризобій.

В основу корисної моделі поставлена задача підвищити урожайність сої шляхом передпосівної обробки насіння новим високоефективним і конкурентоспроможним штамом бульбочкових бактерій виду *Bradyrhizobium diazoefficiens*, який, на відміну від аналогів, здатний продукувати фітогормони-стимулятори, що приймають активну участь у процесах колонізації кореня та формування бульбочок, функціонуванні симбіотичних систем, стимуляції росту та розвитку рослин.

Для вирішення поставленої задачі насіння сої перед посівом інокулюють штамом бульбочкових бактерій нового для України виду *B. diazoefficiens* IMB B-8108, отриманим методом аналітичної селекції. Інокуляційне навантаження становить -200-300 тис. клітин на I насінину. Запропонований штам характеризується комплексом господарсько-цінних властивостей: він здатний синтезувати фітогормональні речовини ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи, активізувати розвиток симбіозу сої на фоні численних ґрунтових популяцій специфічних ризобій, забезпечити стабільно високі врожаї зерна цієї культури.

Новий штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 виділений з бульбочок вігні китайської (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., яку вирощували на дерново-підзолистому ґрунті як бобову "рослину-пастку" (дослідне поле Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, м. Чернігів). рН водне ґрунту 6,0; вміст гумусу 1,2 %; азоту, що легко гідролізується (за Тюрнімом і Коновою) - 57,0-58,0 мг; P_2O_5 160,0-165,0 мг і K_2O (за Кірсановим) - 100,0-112,0 мг на 1 кг ґрунту.

Запропонований для інокуляції сої новий штам ідентифікований за визначником Берджі [7] та на основі молекулярно-генетичних досліджень як *Bradyrhizobium diazoefficiens* і депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України (м. Київ) під номером B-8108. Він також зберігається в Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН під реєстраційним номером 289.

Морфолого-культуральні властивості штаму.

Штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 добре росте за температури 26-28 °С на модифікованому живильному бобовому середовищі такого складу, г/л: K_2HPO_4 - 0,5, KH_2PO_4 - 0,5, $MgSO_4$ - 0,2, NaCl - 0,2, $CaSO_4$ - 0,1, $(NH_4)_2MoO_4$ - сліди, маніт - 20,0, агар-агар - 14,0, люпиновий відвар - 150 мл, рН=6,5-7,0, стерилізація - 1 атм. 30 хв.

Культура бактерій повільноросла, неспороносна. Клітини рухливі, мають форму злегка зігнутих паличок, грамнегативні. Штрих на бобовому середовищі (із люпиновим відваром) слизистий, білуватий, опуклий. На 9-10 добу росту на чашках Петрі колонії округлої форми, непрозорі, білуваті, діаметр їх не перебільшує 1 мм. Оптимальна температура росту - 28 °С, рН=6,5-7,0.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму.

Аероб. Молоко з лакмусом не пептонізує, підвищує рН середовища до лужного. Желатину не розріджує.

Відношення до джерел вуглецю. Штам добре росте на середовищах з глюкозою, галактозою, арабінозою, манітом та сорбітом, помірно використовує рамнозу, мальтозу і сахарозу, слабо - ксилозу. Не засвоює дульцит, та рафінозу.

Відношення до джерел азоту. Запропонований штам добре росте на середовищах з амонійними солями, азотнокислим калієм, гліцином та тирозином. Переважно використовує відновлені форми азоту. На м'ясо-пептонному агарі та м'ясо-пептонному бульйоні не росте.

Ознаки штаму стійкі. Штам патогенних властивостей не має (належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи теплокровних тварин).

Штам пересівається один раз у 6 місяців і зберігається в лабораторних умовах на твердому бобовому (люпиновому) середовищі при 4-5 °С.

Генетичні особливості штаму.

Штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 філогенетично наближений до штамів групи USDA 110 (*B. diazoefficiens* USDA 110) (гомологія 99,3 % по міжгенному регіону 16S-23S rPHK). При ампліфікації ділянки міжгенного спейсера 16S-23S rPHK нового штаму утворюється фрагмент розміром ~1000 пар нуклеотидів (п.н.). При обробці цього фрагменту ферментом ендонуклеазою рестрикції *MspI* генерується 5 фрагментів розміром 310, 220, 160, 140 та 110 п.н.

Штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 характеризується здатністю продукувати позаклітинні фітогормони, підвищувати рівень фіксації молекулярного азоту та врожайність сої. Синтез фітогормональних речовин та приклади конкретного застосування штаму.

Приклад 1.

При вивченні здатності штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 до продукування фітогормональних речовин його культивували в колбах об'ємом 750 мл на качалці (220 об/хв) за температури 26-28 °С на рідкому поживному манітно-дріжджовому середовищі наступного складу (г/л): маніт - 10,0; дріжджовий екстракт - 2,0; кальцію глюконат - 1,5; K_2HPO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,1; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,01; pH 7,2. Як посівний матеріал використовували культуру *B. diazoefficiens* у експоненційній фазі росту (92-96 год.), вирощену на цьому ж середовищі. Кількість посівного матеріалу становила 5 % об'єму середовища.

Для відділення біомаси культуральну рідину бактерій центрифугували впродовж 20 хв при 9000 об/хв і температурі +4 °С. Клітини бактерій відмивали від залишків екзополімерів фізіологічним розчином трічі, кожний раз центрифугували за тих же умов. Надосадову рідину використовували для подальших досліджень з метою екстракції фітогормональних сполук, а осад клітин суспендували в дистильованій воді, потім висушували при 103-105 °С у сушильній шафі до постійної маси. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) штаму визначали ваговим методом.

Позаклітинні фітогормони виділяли із супернатанту бульбачкових бактерій методом, описаним у [8]. Визначення кількісного вмісту фітогормонів у культуральній рідині проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) на рідинному хромаатографі Agilent 1200 LC (США) із діодно-матричним детектором Agilent G 1956 B.

Стандартами були синтетичні фітогормони Sigma-Aldrich (Німеччина) і Acros Organic (Бельгія): ауксини індоліл-3-оцтова кислота, індол-3-масляна кислота, індол-3-карбоксилова кислота, індол-3-карбінол, індол-3-оцтової кислоти гідрозид, індол-3-карбоксальдегід; цитокініни - зеатин, зеатин-рибозид, кінетин, ізопентеніл-аденін, ізопентеніл-аденозин, абсцизова кислота; гібереліни – ГК₃, ГК₄.

Хроматограми обраховували за допомогою програмного забезпечення ChemStation. Кількість позаклітинних фітогормонів розраховували в мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

HPLC аналіз показав, що за культивування у манітно-дріжджовому середовищі штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 синтезував фітогормональні речовини ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи (табл. 1).

У культуральній рідині штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 ідентифіковані такі індолині сполуки як індол-3-оцтова кислота (ІОК - фізіологічно активний для рослин ауксин) (1,6 мкг/г АСБ), індол-3-карбоксальдегід (5,4 мкг/г АСБ), індол-3-карбоксилова кислота (6,3 мкг/г АСБ) та індол-3-оцтової кислоти гідрозид (10,0 мкг/г АСБ).

У супернатанті штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 виявлено чотири фітогормони цитокінінової природи: кінетин (1,6 мкг/г АСБ), зеатин (0,6 мкг/г АСБ), ізопентеніл-аденін (0,7 мкг/г АСБ) і ізопентеніл-аденозин (2,0 мкг/г АСБ).

Таблиця 1

Продукування позаклітинних фітогормонів штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108

Фітогормони	Кількість фітогормонів, мкг/г абсолютно сухої біомаси
-------------	---

Ауксини, у тому числі:	23,3
Індоліл-3-оцтова кислота	1,6
Індол-3-карбінол	-
Індол-3-масляна кислота	-
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	10,0
Індол-3-карбоксальдегід	5,4
Індол-3-карбоксилова кислота	6,3
Цитокініни, у тому числі:	4,9
Кінетин	1,6
Зеатин	0,6
Зеатин-рибозид	-
Ізопентеніл-аденин	0,7
Ізопентеніл-аденозин	2,0
Гібереліни, у тому числі:	495,1
ГК ₃	490,2
ГК ₄	4,9
Абсцизова кислота	-

Примітка. «-» фітогормони не виявлено.

Варто зазначити, що пропонований штам продукував значну кількість біологічно активних гіберелінів, які відіграють важливу роль у формуванні та функціонуванні симбіозу. У культуральній рідині штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 ідентифіковані гіберелінові кислоти ГК₃ і ГК₄ (490,2 мкг/г АСБ та 4,9 мкг/г АСБ, відповідно).

Досліджуваний штам не синтезував абсцизової кислоти, яка є фітогормоном-інгібітором.

Отже, пропонований штам нового для України виду *B. diazoefficiens* IMB B-8108, на відміну від відомих штамів *B. japonicum* 24108 [4], *B. japonicum* KH10 [5], *B. japonicum* 6346 і *B. japonicum* M-8 [6], є продуцентом широкого спектра фітогормонів-стимуляторів: ауксинів (23,3 мкг/г АСБ), цитокінінів (4,9 мкг/г АСБ) та гіберелінів (495,1 мкг/г АСБ), які впливають на процеси формування та функціонування симбіотичних систем, ріст і розвиток рослин, їх продуктивність.

Приклад 2. Конкурентоспроможність штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 та вплив інокуляції сої цим штамом на симбіотичні показники і продуктивність рослин вивчали у польових дрібноділянкових дослідях у ґрунтово-кліматичних умовах Полісся України (дослідне поле Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, м. Чернігів). Тип ґрунту-дерново-підзолистий. У ґрунті наявна численна місцева популяція специфічних бульбочкових бактерій. Перед посівом насіння обробляли культуральною рідиною досліджуваного штаму. Інокуляційне навантаження становило 200-300 тис. клітин на 1 насінину. У контрольному варіанті насіння обробляли водою. Вирощували сою сорту Титан (насіння надано Інститутом кормів та сільського господарства Поділля НААН). Повторність дослідження чотириразова. Площа облікової ділянки 6 м². Розміщення ділянок рандомізоване.

Встановлено, що незважаючи на значне спонтанне інфікування коренів сої у контрольному варіанті (23-96 бульбочок/рослину, залежно від фази розвитку), починаючи із фази стеблуння і протягом усієї вегетації, пропонований штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 утворював більше бульбочок, що може свідчити про його високу конкурентоспроможність (табл. 2). У фазі цвітіння та наливу бобів обробка насіння сої новим штамом сприяла достовірному збільшенню кількості бульбочок проти контролю на 10,4-29,8 % (залежно від фази розвитку).

Важливим показником активності симбіотичної взаємодії бобової рослини з бульбочковими бактеріями є маса кореневих бульбочок. Як свідчать отримані дані, від фази стеблуння до фази наливу бобів штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 забезпечив збільшення маси бульбочок на 17,1-32,1 %.

Таблиця 2

Вплив інокуляції новим штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108 на симбіотичні показники сої сорту Титан (польовий дослід, 2024 р.)

Варіанти дослідів	Кількість бульбочок, од./рослину			Маса бульбочок, г/рослину		
	Фази росту					
	1	2	3	1	2	3
Без інокуляції (контроль)	23,33±1,30	84,17±6,91	95,50±4,09	0,22±0,01	0,81±0,04	1,29±0,02

Інокуляція <i>B. diazoefficiens</i> IMB B-8108 (що заявляється)	25,75±2,25	109,25±5,12	119,25±3,59	0,27±0,01	1,07±0,05	1,51±0,02
---	------------	-------------	-------------	-----------	-----------	-----------

Примітки: 1 - фаза стеблування, 2 - фаза цвітіння, 3 - фаза наливу бобів.

На фіг. 1 - Активність симбіотичної азотфіксації сої сорту Титан за інокуляції штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108 (польовий дослід, 2024 р.). НІР₀₅ фази: стеблування (2,05), цвітіння (4,08), наливу бобів (2,82).

На фіг. 2. Частка штамів у бульбочках сої за інокуляції штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108 (польовий дослід, 2024 р., Н - індекс різноманіття Шеннона).

Нітрогеназна активність бульбочок, утворених представниками ґрунтової популяції брадїризобій, була достатньо високою (14,69-24,25 мкг N на рослину за годину) протягом вегетації рослин (фіг. 1). Попри це, штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 сприяв формуванню найактивніших симбіотичних систем, достовірно збільшуючи цей показник проти контролю на 38,4-7,1 % (залежно від фази розвитку).

Слід зазначити, що ефективність штамів бульбочкових бактерій потенційних біоагентів мікробних препаратів, значною мірою залежить від їх конкурентоспроможності та здатності займати свою екологічну нішу.

Серологічний аналіз кореневих бульбочок у контрольному варіанті (фіг. 2) показав, що до складу ґрунтової популяції ризобій сої входять бактерії двох видів: *B. japonicum* (серогрупи HR (42 % бульбочок), 46 (17 %) і KB11 (12 %)) і *B. ottawaense* (серогрупа KC23 (8 % бульбочок)). У 13 % бульбочок ідентифіковані ризобії одразу двох серогруп - KB11 і HR (вид *B. japonicum*). Частка в бульбочках сої бактерій, які не віднесені до відомих серогруп (інші), становила 8 %.

Новий штам-інокулянт *B. diazoefficiens* IMB B-8108 (серогрупа B11) виявився конкурентоспроможним, він приживався у кореневій зоні рослин на фоні численної гетерогенної популяції специфічних бактерій, утворюючи 21 % бульбочок. Його проникнення у корені супроводжувалось істотним зменшенням частки у бульбочках місцевих бактерій *B. japonicum* серогрупи HR (з 42 % до 17 %), бактерій не віднесених до відомих серогруп (група "інші") (з 8 % до 4 %), а також зменшувалась кількість бульбочок, утворених двома штамми *B. japonicum* KB11+HR (з 13 % до 4 %). Разом із тим, відмічено збільшення у бульбочках частки представників серогрупи 46 (з 17 % до 21 %) і KB11 (з 12 % до 25 %).

Загалом, інокуляція сої штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108 сприяла формуванню збалансованих симбіотичних систем, в яких не спостерігалось різкого домінування окремих штамів. Про це свідчить підвищення значення індексу різноманіття Шеннона з 1,60 у контрольному варіанті до 1,77 - у варіанті з інокуляцією.

Аналіз урожайних даних сої за два роки показав, що штам-інокулянт *B. diazoefficiens* IMB B-8108 позитивно впливав на насінневу продуктивність сої (табл. 3). На фоні численних популяцій брадїризобій він сприяв збільшенню урожайності сої сорту Титан на 17,5-19,6 % (залежно від року досліджень) порівняно з контролем.

Таблиця 3

Урожайність сої сорту Титан за інокуляції штамом *B. diazoefficiens* IMB B-8108 (польові дослід, 2023-2024 рр.)

Варіанти дослід	Урожайність, т/га			Приріст до контролю, %
	2023	2024	середнє за два роки	
Без інокуляції (контроль)	4,16	3,62	3,89	-
Інокуляція <i>B. diazoefficiens</i> IMB B-8108 (що заявляється)	4,89	4,33	4,61	18,5
НІР ₀₅	0,38	0,37		

Таким чином, за результатами польових дослідів новий конкурентоспроможний штам *B. diazoefficiens* IMB B-8108 забезпечив формування активних симбіотичних систем та сприяв стабільному збільшенню врожайності сої сорту Титан на 18,5 % (у середньому за два роки).

Приклад 3. Ефективність інокуляції сої мікробним препаратом Ризогуміном на основі штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 перевіряли у виробничому досліді в ґрунтово-кліматичних умовах центрального Лісостепу України (дослідне поле Інституту кормів та сільського господарства Поділля

НААН, м. Вінниця). Тип ґрунту - сірий лісовий. У ґрунті наявна численна місцева популяція ризобій сої. Перед посівом насіння обробляли біопрепаратом у розрахунку 2 кг на 1 т насіння (інокуляційне навантаження - 200-300 тис. клітин на 1 насінину). Виробничий дослід проводили у 2024 р., використовували сою сортів Кобуко та Титан.

Так, інокуляція насіння сої сорту Кобуко Ризогуміном на основі нового штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 забезпечила формування врожайності на рівні 3,45 т/га, що на 0,30 т/га (9,5 %) більше, ніж у контролі без обробки (табл. 4). За використання Ризогуміну на сої сорту Титан відмічено дещо більший приріст урожайності зерна - 0,34 т/га або 10,5 %.

Таблиця 4

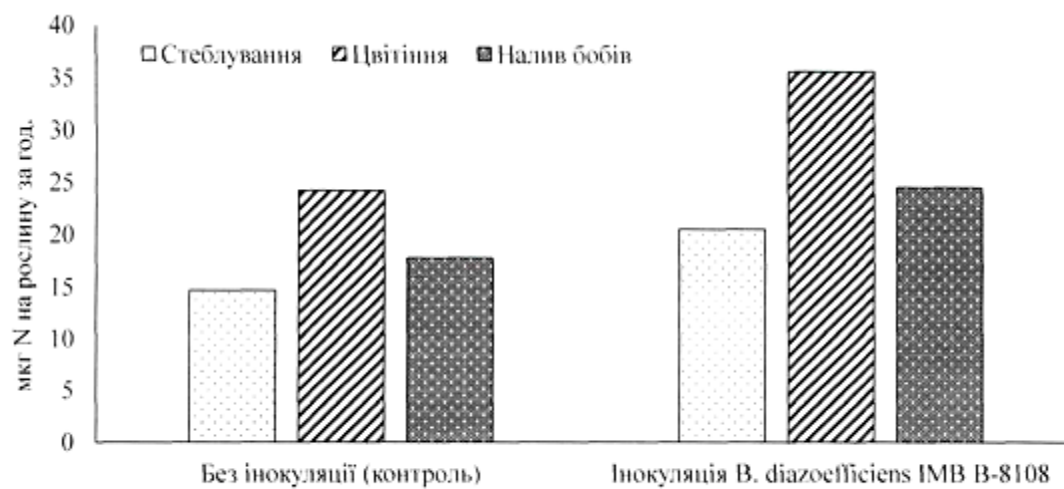
Вплив Ризогуміну на основі штаму *B. diazoefficiens* IMB B-8108 на урожайність зерна сої різних сортів (виробничі умови (60 га), ІКСГП НААН)

Сорт сої	Урожайність, т/га		Приріст до контролю,	
	Без інокуляції (контроль)	Ризогумін	т/га	%
Кобуко	3,15	3,45	0,30	9,5
Титан	3,22	3,56	0,34	10,5

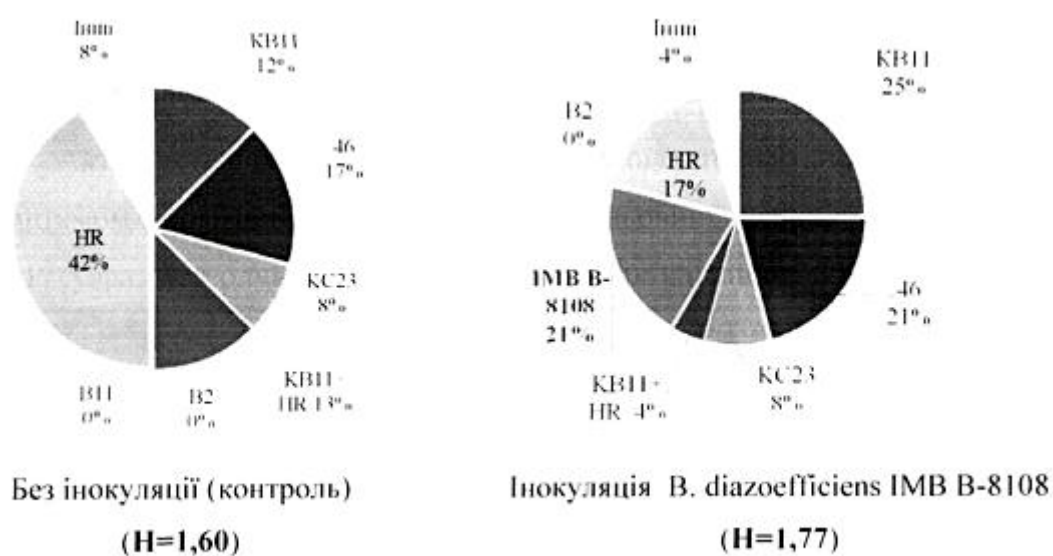
Отже, для отримання стабільно високих врожаїв сої різних сортів запропоновано використовувати для передпосівної інокуляції насіння високоефективний і конкурентоспроможний штам бульбочкових бактерій *B. diazoefficiens* IMB B-8108. Штам є продуцентом широкого спектра фітогормонів-стимуляторів: ауксинів, цитокінінів та гіберелінів, які активно впливають на процеси ініціації бульбочкоутворення та функціонування симбіотичних систем, ріст і розвиток рослин, їх продуктивність.

Джерела інформації:

- Біологічний азот / [Патика В. П., Коць С Я., Волкогон В.В. та ін.]; за ред. В.П. Патики - К.: Світ, 2003. - 424 с.
- Бабич А.О. Сучаєне виробництво і використання сої. - К.: Урожай, 1993. - 432 с.
- Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X. Ecology and Evolution of Rhizobia: Principles and Applications. Singapore: Springer Verlag; 2019.
- Пат. 3324 С1 Україна, C05F 11/08, C12N 1/20. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання добрив під сою / Скочинська Н.М., Антипчук А.Ф., Рангелова В.М., Канцелярук Р.М., Ганцюренко О.В., Заявл. 31.07.90; Опубл. 27.12.94., Бюл.№ 1-6. - 3 с.
- Пат. 69993 А Україна, МКИ C05F 11/08, C12N 1/20. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання бактеріального добрива під сою / Крутило Д.В., Ковалевська Т.М., Заявл. 22.12.03; Опубл. 15.09.04, Бюл. № 9. - 3 с.
- Пат. 39545 А Україна, МКИ C05F 11/08, C12N 1/20. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 Кірсунер, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої / Толкачов М.З., Патика В.П., Каменева І.О... Грітчина Л.Ю., Заявл. 06.10.2000; Опубл. 16.06.01, Бюл. № 5. - 5 с.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A+B+C. 2nd ed. / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Editor-in-chief G.M. Garrity. NewYork, 2005. - 2800 p.
- Методические рекомендации по определению фитогормонов. - К.: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. - 78 с.



Фіг. 1



Фіг. 2