

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ К РЕКОМЕНДУЕМЫМ ХИМИЧЕСКИМ ФУНГИЦИДАМ¹

Ю. В. Лактионов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий, laktionov@list.ru, ORCID ID: 0000-0001-6241-0273;

Ю. В. Косульников, инженер-исследователь лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий, kullavayn@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-1134-3503;

Д. В. Дудникова, инженер-исследователь лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий, daryanikolaenko94@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4319-1957;

В. В. Яхно, ORCID ID: 0000-0001-7953-3405;

А. П. Кожемяков, кандидат биологических наук, зав. лабораторией экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий, ORCID ID: 0000-0002-9657-2454

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, 196608, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, шоссе Подбельского, 3

В работе определена устойчивость различных штаммов клубеньковых бактерий сои к рекомендуемым химическим фунгицидам в условиях бакового раствора и при нанесении на семенную поверхность. В качестве опытных ризобий изучены бактерии сои вида *Bradyrhizobium japonicum* следующих штаммов: 634б, 640, ВР-648, ВР-733. В качестве протравителей были использованы фунгициды следующих марок: Максим, Протект, Протект Форте. В условиях бакового раствора совместимость определяли путем смешения биопрепарата и протравителя, выдержки смеси в темноте при комнатной температуре с последующим определением процента выживших ризобий в зависимости от вида протравителя и времени выдержки раствора. Установлено, что различные штаммы ризобий сои практически не отличаются по устойчивости к протравителям в условиях бакового раствора, однако протравители отличаются разной степенью токсичности по отношению к изучаемым штаммам, что позволило выстроить протравители в ряд в порядке увеличения токсичности для ризобий: Максим, Протект, Протект Форте. Так как взятые для исследования штаммы практически не отличались по своей устойчивости к протравителям в условиях бакового раствора, то для определения динамики гибели ризобий на протравленных семенах был исследован только штамм *B. japonicum* 634б. Определение токсичности протравителей было осуществлено методом посева на чашки с питательной средой смывов с обработанных семян. Обработанные семена выдерживали в темноте при комнатной температуре. Отбор навесок обработанных семян осуществляли спустя 2, 4, 8 ч после обработки. Характер построенных кривых сокращения численности ризобий на семенах показал, что на семенной поверхности самым токсичным для бактерий оказался Протект Форте, а самым «мягким» – Максим. Данное исследование позволит оптимизировать процесс инокуляции семян сои с их одновременным протравливанием химическими протравителями.

Ключевые слова: соя, семена, протравители, биопрепараты, совместимость.



ESTIMATION OF STABILITY OF SOYBEAN ROOT NODULE BACTERIAL STRAINS TO THE RECOMMENDED CHEMICAL FUNGICIDES

Yu. V. Laktionov, Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the laboratory for ecology of symbiotic and associative rhizobacteria, laktionov@list.ru, ORCID ID: 0000-0001-6241-0273;

Yu. V. Kosulnikov, engineer-researcher of the laboratory for ecology of symbiotic and associative rhizobacteria, kullavayn@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-1134-3503;

D. V. Dudnikova, engineer-researcher of the laboratory for ecology of symbiotic and associative rhizobacteria, daryanikolaenko94@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4319-1957;

V. V. Yakhno, ORCID ID: 0000-0001-7953-3405;

A. P. Kozhemyakov, Candidate of Biological Sciences, head of the laboratory for ecology of symbiotic and associative rhizobacteria, ORCID ID: 0000-0002-9657-2454

FSBSI All-Russian RI of Agricultural microbiology, 196608, Saint-Petersburg, Pushkin-8, Podbelsky Highway, 3

The work determines the resistance of various strains of soybean nodule bacteria to the recommended chemical fungicides in the tank solution applied to the seed surface. As experimental rhizobia there were studied such soybean bacteria of the *Bradyrhizobium japonicum* of the following strains as 634b, 640, BR-648, BR-733. The fungicides "Maksim", "Protekt", "Protekt Forte" were used as disinfectants. In the tank solution there was determined compatibility by mixing the biopreparation and the disinfectant, keeping the mixture at room temperature in the dark, with further determining percentage of the survived rhizobia depending on the disinfectant type and the keeping time of the solution. It has been established that different soya rhizobia strains do not practically differ in resistance to disinfectants in the tank solution. However, the disinfectants possess different degrees of toxicity to the studied strains, which made it possible to arrange the disinfectants due to their increasing toxicity for rhizobia "Maksim", "Protekt", "Protekt Forte". Since the strains taken for the study practically did not differ in their resistance to disinfectants in the tank solution, there was investigated only the strain *B. japonicum* 634b to determine the dynamics of rhizobia death on the treated seeds. Determination of the disinfectants' toxicity was carried out by placing the washes from treated seeds on the plates with nutrient medium. The treated seeds were kept at room temperature in the dark. The selection of the treated seeds was carried out after 2, 4 and 8 hours after treatment. The nature of the curves for rhizobia reduction on seeds showed that "Protekt Forte" was the most toxic to bacteria on the seed surface, and "Maksim" was the most "soft". This study will allow optimizing the process of soybean seeds inoculation with their simultaneous treatment with chemical disinfectants.

Keywords: soybean, seeds, disinfectants, bio preparations, compatibility.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.607.21.0178, RFMEFI60717X0178).

Введение. В отечественном земледелии предпосевная инокуляция семян бобовых культур препаратами клубеньковых бактерий получает все большее признание как эффективный прием повышения урожайности (Кожемяков, 1989; Емцев и Мишустин, 2005; Oldroyd and Dixon, 2014). Однако зачастую в целях экономии времени и ресурсов хозяйства осуществляют инокуляцию семян совместно с их протравливанием путем приготовления общего бакового раствора биопрепарата и протравителя, которым в дальнейшем обрабатывают семена. В этом случае ризобии биопрепарата оказываются в исключительно неблагоприятных условиях, так как в состав протравителей входят поверхностно-активные вещества, угнетающие бактерии, и действующие начала, зачастую также токсичные для бактерий (Лактионов и др., 2016; Якименко и Бегун, 2016). В связи с этим научный и практический интерес представляет изучение динамики сокращения числа ризобий в смеси с протравителями в условиях бакового раствора и на семенной поверхности. Актуальные данные по совместимостям того или иного штамма ризобий с тем или иным протравителем семян позволит оптимизировать технологию одновременной обработки семян инокулянтами и химическими протравителями. Целью проведенных исследований было определение влияния марки протравителя (Максим, Протект, Протект Форте) и времени контакта с ризобиями сои (*B. japonicum* шт. 6346, 640, ВР-648, ВР-733) на выживаемость бактерий инокулянта в условиях бакового раствора и семенной поверхности (семена сои сорта Белгородская).

Материалы и методы исследования. В качестве бактериальных суспензий были исследованы препараты на основе клубеньковых бактерий сои *B. japonicum* следующих штаммов: 6346, 640, ВР-648, ВР-733.

Препараты готовили путем инокуляции изучаемыми штаммами полусинтетической среды (табл. 1) с последующим ее недельным культивированием на шейкере при 180 об/мин и месячным выдерживанием в холодильнике.

1. Состав полусинтетической питательной среды

1. The composition of semi-synthetic nutrient medium

Компонент среды	Количество (г/л)
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
NaCl	0,1
Дрожжевой экстракт	1,0
Маннит	10,0

Исследованы следующие марки протравителей семян:

МАКСИМ, КС, ДВ – флудиоксонил 25 г/л (ф. Сингента Кроп Протекшн АГ, Швейцария);
 ПРОТЕКТ, КС, ДВ – флудиоксонил 25 г/л (ООО «Агро Эксперт Груп», Россия, ф. «Agro Expert Group» Kft., Венгрия);
 ПРОТЕКТ ФОРТЕ, ВСК, ДВ – флудиоксонил 40 г/л + флуриафол 30 г/л (ООО «Агро Эксперт Груп», Россия, ф. «Agro Expert Group» Kft., Венгрия).

Для проведения опыта использованы семена сои сорта Белгородская, которые инокулировались клубеньковыми бактериями в смеси с химическими фунгицидами.

Влияние фунгицидов на клубеньковые бактерии в условиях бакового раствора определяли путем смешения исследуемых препаратов (20% раствор исследуемой бактериальной суспензии и 20% раствор исследуемого протравителя), выдержки раствора в темноте при комнатной температуре и периодического посева его разведений через определенные интервалы времени на чашки Петри с агаризированной питательной средой (табл. 1). По прошествии десяти дней с момента посева осуществляли подсчет образовавшихся колониеобразующих единиц (КОЕ) клубеньковых бактерий. Изменение числа колоний позволило определить динамику числа жизнеспособных бактериальных клеток в смеси с фунгицидами в условиях бакового раствора и влияние на нее следующих факторов: штамм бактерий, марка протравителя, прошедшее с момента смешения время. Повторность опыта – четырехкратная.

Определение влияния фунгицидов на клубеньковые бактерии в условиях семенной поверхности было осуществлено только для *B. japonicum* штамма 6346. Приготовление растворов бактериальной суспензии и протравителей было выполнено ранее описанным способом. Приготовленные растворы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут с последующей обработкой навесок семян в чашке Петри (0,25 мл раствора на 25 г семян), выдержкой семян при комнатной температуре и периодическом приготовлении смывов с семян, осуществляемых взбалтыванием 8 обработанных семян с 8 мл стерильной среды на вортексе в течение 1 минуты. Смывы были приготовлены спустя 2, 4 и 8 ч после обработки семян, разведения смывов были посеяны на чашки Петри с агаризированной питательной средой (табл. 1). Подсчет образовавшихся колоний позволил определить динамику числа жизнеспособных бактериальных клеток *B. japonicum* шт. 6346 в смеси с фунгицидами в условиях одновременной обработки семян данным баковым раствором. Повторность опыта – четырехкратная.

Дисперсионный анализ полученных результатов проведен по методике Б. А. Доспехова (2012). Разница по сравнению с контролем в вариантах с применением фунгицидов существенная, так как превышает значение $HC_{0,5}$.

Результаты и их обсуждение. Определение динамики сокращения числа живых ризобий различных штаммов в смеси с фунгицидом Максим показало, что, во-первых, фунгицид Максим характеризуется сравнительно низкой токсичностью для исследованных бактерий (в течение 8 ч в смеси с 20% протравителя выживает более половины ризобий всех 4 изученных штаммов), а во-вторых, сами штаммы практически не отличаются между собой по устойчивости к фунгициду (рис. 1).

В свою очередь, фунгицид Протект определен как значительно более токсичный для клубеньковых бактерий, так как выдержка последних в контакте с фунгицидом в течение 8 ч привела к значительному сокращению числа выживших ризобий, причем бактерии штамма ВР-648 полностью погибли, а число выживших бактерий трех остальных штаммов сократилось почти на порядок (рис. 2). Интересно, что токсичный для бактерий Протект и малотоксичный Максим приготовлены на основе одного и того же действующего вещества с одной и той же его концентрацией в протравителе (25 г/л флудиоксонил).

В условиях бакового раствора фунгицид Протект Форте определен как наиболее токсичный для исследованных штаммов, так как в течение 8 ч контакта бактерий с 20% протравителя все исследованные штаммы полностью погибли (рис. 3).

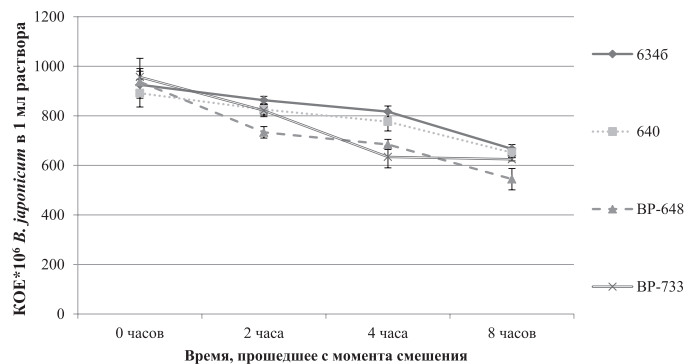


Рис. 1. Динамика сокращения числа КОЕ различных штаммов *B. japonicum* в растворе с фунгицидом Максим в концентрации 20%

Fig. 1. The reducing dynamics of CFU numbers of different *B. japonicum* strains in a 20% solution with the fungicide "Maksim"

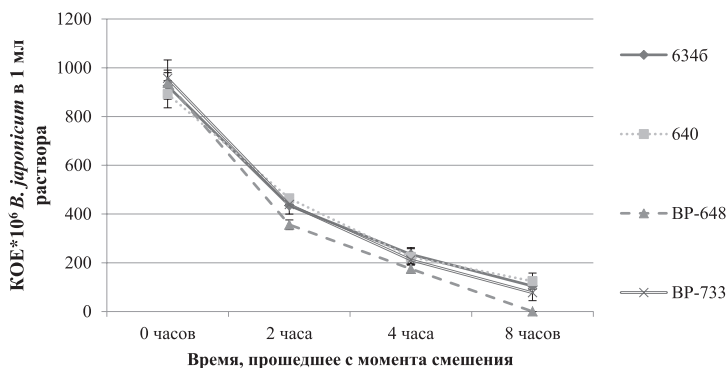


Рис. 2. Динамика сокращения числа КОЕ различных штаммов *B. japonicum* в растворе с фунгицидом Протект в концентрации 20%

Fig. 2. The reducing dynamics of CFU numbers of different *B. japonicum* strains in a 20% solution with the fungicide "Protect"

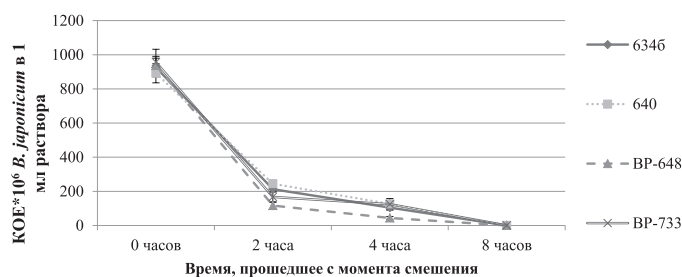


Рис. 3. Динамика сокращения числа КОЕ различных штаммов *B. japonicum* в растворе с фунгицидом Протект Форте в концентрации 20%

Fig. 3. The reducing dynamics of CFU numbers of different *B. japonicum* strains in a 20% solution with the fungicide "Protect Forte"

Как показано, все исследуемые штаммы клубеньковых бактерий характеризуются очень похожими, практически сливающимися друг с другом, кривыми сокращения числа живых бактерий в смеси с фунгицидами. Заметная разница в устойчивости штаммов к протравителям определена лишь в случае фунгицида Протект (гибель бактерий штамма BP-648 спустя 8 ч после смешения с протравителем при остаточных количествах выживших бактерий остальных исследованных штаммов). В связи с этим выживаемость бактерий на семенах, обработанных баковым раствором, содержащим ризобии и фунгицид, была определена лишь для штамма 6346.

Достаточно любопытной выглядит динамика гибели ризобий штамма 6346 на семенах, протрав-

ленных фунгицидом Максим. Спустя 2 ч после обработки число ризобий на протравленных семенах даже несколько больше, чем в контроле. По-видимому, это связано с тем, что поверхностно-активные вещества протравителя позволяют ризобиям более равномерно покрыть семена, при том что сам фунгицид Максим, как было определено для условий бакового раствора, характеризуется низкой токсичностью для ризобий. Однако в дальнейшем бактерии стали погибать со скоростью несколько большей контроля, а через 8 ч число выживших бактерий на протравленных семенах оказалось в 2 раза ниже контрольного. Примечательно, что концентрация фунгицида Максим не оказала замет-

ного влияния на выживаемость ризобий на протравленных семенах (рис. 4; табл. 2).

Фунгициды Протект и Протект Форте ожидаемо оказались более токсичными для ризобий. Интересно, что превышение числа выживших ризобий на протравленных семенах, по сравнению с контролем, наблюдается только для фунгицида Протект и только для 10% его концентрации. По-видимому, с ростом токсичности протравителя для бактерий его угнетаю-

щее влияние перекрывает способность более равномерно разносить бактерии по семенной поверхности. Также, в отличие от фунгицида Максим, для фунгицидов Протект и Протект Форте заметную роль в плане токсичности для ризобий начинает играть концентрация протравителя. Токсичность протравителей Протект и Протект Форте для ризобий растет почти линейно с ростом их концентрации от 10 до 20% в составе раствора для обработки семян (рис. 5, 6; табл. 2).

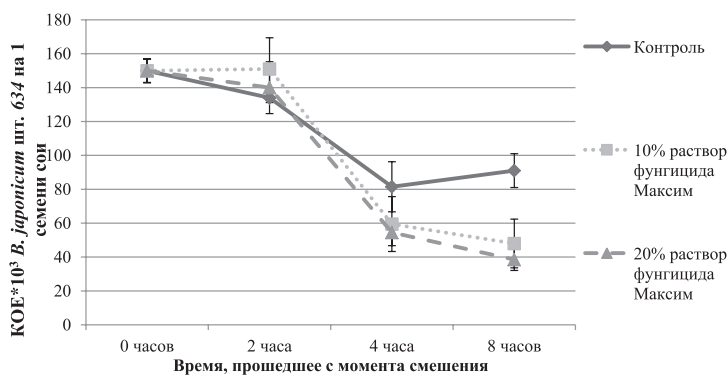


Рис. 4. Динамика сокращения числа КОЕ *B. japonicum* шт. 6346 на 1 семени сои при инокуляции совместно с протравливанием 10% и 20% раствором фунгицида Максим

Fig. 4. The reducing dynamics of CFU numbers of *B. japonicum* strains, pc. 6346 per 1 soybean kernel, when inoculated together with sterilization with 10% and 20% solution of fungicide "Maksim"

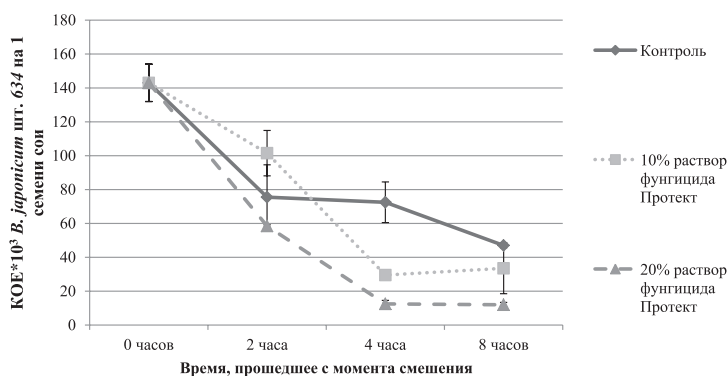


Рис. 5. Динамика сокращения числа КОЕ *B. japonicum* шт. 6346 на 1 семени сои при инокуляции совместно с протравливанием 10% и 20% раствором фунгицида Протект

Fig. 5. The reducing dynamics of CFU numbers of *B. japonicum* strains, pc. 6346 per 1 soybean kernel, when inoculated together with sterilization with 10% and 20% solution of fungicide "Protekt"

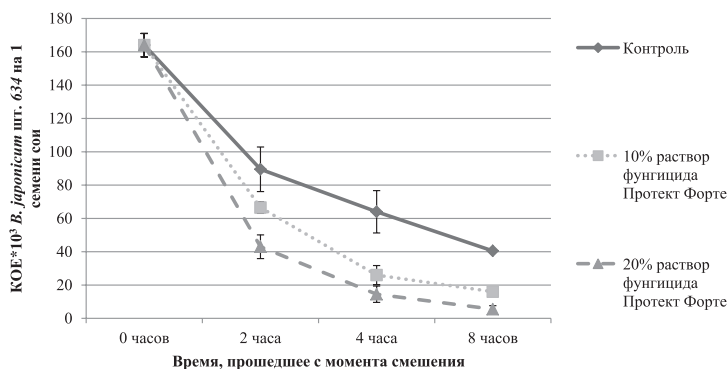


Рис. 6. Динамика сокращения числа КОЕ *B. japonicum* шт. 6346 на 1 семени сои при инокуляции совместно с протравливанием 10% и 20% раствором фунгицида Протект Форте

Fig. 6. The reducing dynamics of CFU numbers of *B. japonicum* strains, pc. 6346 per 1 soybean kernel, when inoculated together with disinfection with 10% and 20% solution of fungicide "Protekt Forte"

**2. Число КОЕ*10³ *B. japonicum* штамм 6346
в растворе с фунгицидами через определенные промежутки времени
2. CFU numbers*10³ *B. japonicum*, 6346 in the solution with fungicides through definite time intervals**

	0 ч	2 ч	4 ч	8 ч
Фунгицид Максим				
Контроль	150	134	81,5	91
10% раствор фунгицида	150	151	59,1	48
20% раствор фунгицида	150	140	54,5	38,5
НСП _{0,5}	0	3,95	4,41	4,43
Фунгицид Протект				
Контроль	143	75,5	72,5	47
10% раствор фунгицида	143	101,5	29,5	33,5
20% раствор фунгицида	143	58,5	12,5	12
НСП _{0,5}	0	6,45	8,16	7,25
Фунгицид Протект Форте				
Контроль	164	89,5	64	40,5
10% раствор фунгицида	164	66,5	26	16
20% раствор фунгицида	164	43	14,5	5,5
НСП _{0,5}	0	2,16	3,11	3,51

В условиях единовременно с инокуляцией протравленной семенной поверхности определены следующие закономерности:

Нахождение ризобий в условиях семенной поверхности, даже без протравливания, явно негативно сказывается на выживаемости бактерий. Единовременное с инокуляцией протравливание значительно ускоряет гибель бактерий с течением времени и тем сильнее, чем токсичнее данный протравитель для ризобий (в течение 8 ч после обработки семян, по сравнению с контролем, в смеси с 20% фунгицидом Максим выживает более половины ризобий, в смеси с 20% фунгицидом Протект – около одной пятой, число же выживших ризобий в смеси с 20% фунгицидом Протект Форте падает почти на порядок по сравнению с контролем).

С ростом концентрации протравителя от 10 до 20% увеличивается и скорость гибели ризобий, причем для малотоксичного для бактерий фунгицида Максим эта «прибавка» лежит в пределах ошибки, а для токсичных фунгицидов Протект и Протект Форте зависимость токсичности от концентрации протравителя почти линейная.

В течение первых 2 ч после обработки наблюдается некоторое превышение числа бактерий на семенах, обработанных баковым раствором, включающим в себя ризобии и фунгицид, по сравнению с семенами,

инокулированными баковым раствором, включающим в себя лишь ризобии, причем превышение тем больше, чем менее токсичен протравитель. Вероятно это связано с тем, что поверхностно-активные вещества в составе протравителя позволяют бактериям более равномерно распределиться по семенной поверхности. С ростом токсичности протравителя этот эффект перекрывается угнетающим действием самого протравителя (для Протект Форте эффект не наблюдается вообще).

Выводы. И в условиях бакового раствора, и в условиях протравленной семенной поверхности самым малотоксичным для всех исследованных ризобий оказался фунгицид Максим, самым токсичным – фунгицид Протект Форте. Токсичность фунгицида Протект оказалась промежуточной между фунгицидами Максим и Протект Форте.

Взятые для исследования штаммы ризобий сои практически не отличаются между собой по устойчивости к протравителям в условиях бакового раствора, за исключением штамма ВР-648, который в отличие от остальных исследованных штаммов полностью погиб в растворе с фунгицидом Протект спустя 8 ч после смешения. За те же 8 ч фунгицид Максим убил не более половины бактерий всех 4 штаммов, а фунгицид Протект Форте убил все бактерии всех 4 штаммов.

Библиографические ссылки

1. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Книга по требованию, 2012. 351 с.
2. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н. Микробиология: учебник для вузов. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2005. 445 с.
3. Кожемяков А. П. Приемы повышения продуктивности азотфиксации и урожая бобовых культур. Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. 1989. С. 15–27.
4. Лактионов Ю. В., Косульников Ю. В., Дудникова Д. В. Влияние водорастворимых полимеров на выживаемость клубеньковых бактерий люпина (*Rhizobium lupini*) // Зерновое хозяйство России. 2018. № 3. С. 17–26. DOI 10.31367/2079-8725-2018-57-3-22-26.
5. Якименко М. В., Бегун С. А., Сорокина А. И. Совместимость коллекционных штаммов ризобий сои с фунгицидами и ростстимулирующими препаратами // Дальневосточный аграрный вестник. 2016. № 2(38). С. 38–41.
6. Якименко М. В., Бегун С. А. Совместное применение штаммов ризобий и некоторых препаратов для предпосевной обработки семян сои // Земледелие. 2016. № 6. С. 46–48.
7. Oldroyd G. E. D., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem // Current Opinion in Biotechnology. 2014. Vol. 26. Pp. 19–24. DOI 10.1016/j.copbio.2013.08.006.

References

1. Dospekhov B. A. Metodika polevogo opyta [Methodology of a field trial]. M.: Kniga po trebovaniyu, 2012. 351 s.
2. Emcev V. T., Mishustin E. N. Mikrobiologiya: uchebnik dlya vuzov [Microbiology: a textbook for high schools]. 5-e izd., pererab. i dop. M.: Drofa, 2005. 445 s.
3. Kozhemyakov A. P. Priemy povysheniya produktivnosti azotfiksacii i urozhaya bobovyh kul'tur [Methods to increase nitrogen fixation productivity and yields of legumes]. Biologicheskij azot v sel'skom hozyajstve SSSR. 1989. S. 15–27.
4. Laktionov Yu. B., Kosul'nikov Yu. V., Dudnikova D. V. Vliyanie vodorastvorimyh polimerov na vyzhivaemost' kluben'kovykh bakterij lyupina (*Rhizobium lupini*) [Effect of water-soluble polymers on the survival of lupine nodule bacteria (*Rhizobium lupini*)] // Zernovoe hozyajstvo Rossii. 2018. № 3. S. 17–26. DOI 10.31367/2079-8725-2018-57-3-22-26.
5. Yakimenko M. V., Begun S. A., Sorokina A. I. Sovmestimost' kollekcionnyh shtammov rizobij soi s fungicidami i roststimuliruyushchimi preparatami [Compatibility of collection strains of soya rhizobia with fungicides and growth-stimulating preparations] // Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik. 2016. № 2(38). S. 38–41.
6. Yakimenko M. V., Begun S. A. Sovmestnoe primeneniye shtammov rizobij i nekotoryh preparatov dlya predposevnoj obrabotki semyan soi [Combined use of rhizobia strains and some drugs for pre-sowing treatment of soybean seeds] // Zemledelie. 2016. № 6. S. 46–48.
7. Oldroyd G. E. D., Dixon R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem // Current Opinion in Biotechnology. 2014. Vol. 26. Pp. 19–24. DOI 10.1016/j.copbio.2013.08.006.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.