

ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *BRADYRHIZOBIUM* НА ПОВЕРХНОСТИ ИНОКУЛИРОВАННЫХ СЕМЯН ПРИ ХРАНЕНИИ

Астахов М. М., аспирант, научный сотрудник лаборатории микробиологической защиты растений, astahov.91@inbox.ru. ORCID ID: 0000-0003-3712-1343;

Томашевич Н. С., кандидат сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научной работе, tom-s2@yandex.ru. ORCID ID: 0000-0002-7297-5929

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений», 350039. г. Краснодар, ул. им. Калинина, д. 62

Инокулянты на основе бактерий рода *Bradyrhizobium* длительное время используются при выращивании сои с целью обеспечения растений азотом и повышения урожайности. При этом инокулянты являются экономически и экологически обоснованной альтернативой азотным минеральным удобрениям. В отличие от них применение инокулянтов позволяет снизить экономические затраты на производство и экологические риски. Однако в сельскохозяйственной практике существует ряд факторов, которые снижают эффективность инокуляции семян, что приводит к нарушению формирования бобово-ризобияльного симбиоза. Одним из таких факторов является снижение количества клубеньковых бактерий на поверхности инокулированных семян к моменту посева. В связи с этим цель исследования – изучить жизнеспособность бактерий рода *Bradyrhizobium*, являющихся действующим веществом применяемых в Российской Федерации жидких инокулянтов, в процессе длительного хранения инокулированных семян. Исследование показало, что после инокуляции количество бактерий *Bradyrhizobium* составило $3,2\text{--}8,0 \times 10^6$ КОЕ/семя в зависимости от применяемого препарата. Через 14 суток хранения семян при $24\text{--}28$ °С количество жизнеспособных клеток составило $4,0 \times 10^4\text{--}1,4 \times 10^6$ КОЕ/семя, после чего началось существенное падение жизнеспособности. Хранение инокулированных семян в течение трех месяцев приводило к полному или практически полному снижению численности ризобий и не превышало 82 КОЕ/семя. Исследуемые инокулянты обладали высоким титром $1,0\text{--}4,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл, что превышало показатель, заявленный производителем.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium*, инокулянты сои, инокуляция семян, жизнеспособность бактерий.

Для цитирования: Астахов М. М., Томашевич Н. С. Изучение жизнеспособности бактерий рода *Bradyrhizobium* на поверхности инокулированных семян при хранении // Зерновое хозяйство России. 2025. Т. 17, № 4. С. 63–68. DOI: 10.31367/2079-8725-2025-99-4-63-68.



STUDY OF THE VIABILITY OF BACTERIA OF THE GENUS *BRADYRHIZOBIUM* ON THE SURFACE OF INOCULATED SEEDS DURING STORAGE

M. M. Astakhov, postgraduate, researcher of the laboratory for microbiological protection of plants, astahov.91@inbox.ru. ORCID ID: 0000-0003-3712-1343;

N. S. Tomashevich, Candidate of Agricultural Sciences, deputy director in science, tom-s2@yandex.ru. ORCID ID: 0000-0002-7297-5929

Federal Research Center of Biological Plant Protection, 350039, Krasnodar, Kalinin Str., 62

Inoculants based on bacteria of the genus *Bradyrhizobium* have long been used in soybean cultivation to provide plants with nitrogen and improve crop productivity. At the same time, inoculants are an economically and environmentally sound alternative to nitrogen mineral fertilizers. In contrast, the use of inoculants allows reducing economic costs of production and environmental risks. However, in agricultural practice, there are several factors that reduce the efficiency of seed inoculation, which disrupts the formation of legume-rhizobium symbiosis. One of these factors is a decrease in the number of nodule bacteria on the surface of inoculated seeds by the sowing time. In this regard, the purpose of the current work was to study the viability of bacteria of the genus *Bradyrhizobium*, which are the active substance of liquid inoculants used in the Russian Federation, during long-term storage of inoculated seeds. The study has shown that after inoculation, the number of *Bradyrhizobium* bacteria was $3.2\text{--}8.0 \times 10^6$ CFU/seed depending on the applied product. After 14 days of seed storage at $24\text{--}28$ °C, the number of viable cells was $4.0 \times 10^4\text{--}1.4 \times 10^6$ CFU/seed, after which there was a significant viability decrease. Storage of inoculated seeds for three months resulted in a complete or almost complete reduction in the number of rhizobia and did not exceed 82 CFU/seed. The studied inoculants had a high titer of $1.0\text{--}4.6 \times 10^{10}$ CFU/ml, which exceeded the indicator declared by the manufacturer.

Keywords: *Bradyrhizobium*, soybean inoculants, seed inoculation, bacterial viability.

Введение. Использование ризобий для инокуляции бобовых культур началось в Австралии более 100 лет назад, и препараты на их основе получили название инокулянты (Mendoza-Suárez et al., 2020). Сначала иноку-

лянты производились на основе инертного носителя, чаще всего торфа, что вызывало сложности с его стерилизацией. Затем началось производство жидких инокулянтов в пластиковых пакетах. Данная форма инокулянтов по-

лучила широкое распространение благодаря своей технологичности, что обеспечивает эффективный газообмен и поддержание высокого титра клубеньковых бактерий на протяжении двух лет (de Souza et al., 2019).

Несмотря на то, что существует несколько способов внесения инокулянтов в агроценоз, наиболее экономически обоснованным и распространенным способом является предпосевная обработка семян, позволяющая достичь высокой численности клубеньковых бактерий непосредственно в зоне ризосферы. Наличие достаточного количества инфекционного штамма ризобий в корневой зоне проростков – важнейший фактор эффективного образования клубеньков у бобовых культур. Однако численность ризобий в данном случае определяется качеством самого инокулянта и процесса инокуляции.

Качество инокулянтов определяется различными факторами, среди которых одним из важнейших является жизнеспособность клубеньковых бактерий после обработки семян. В Австралии контроль качества инокулянтов осуществляется более 50 лет. Австралийская исследовательская группа по инокулянтам (AIRG) установила, что минимальная численность ризобий на семенах сои составляет 10^5 КОЕ/семя (колониеобразующих единиц на одно семя) для эффективного формирования симбиоза. При этом титр жидких инокулянтов должен составлять не менее 5×10^9 КОЕ/мл (Farquharson et al., 2022). В Бразилии, для того чтобы увеличить количество активных клубеньков и урожайность сои, инокуляция семян должна обеспечивать не менее $1,2 \times 10^6$ КОЕ/семя (Hungria et al., 2017).

Высокая численность ризобий при инокуляции семян в Бразилии и Австралии, а также ряде других стран обосновывается тем, что соя выращивается длительное время и в почве содержится множество местных адаптированных штаммов ризобий, эффективность азотфиксации которых незначительна. При этом данные штаммы приспособлены к условиям агроценоза и вступают в конкуренцию с интродуцированными штаммами клубеньковых бактерий, что сводит к минимуму мероприятия по инокуляции семян. Кроме того, ризобии зачастую подвергаются неблагоприятным почвенно-климатическим условиям, которые также снижают их жизнеспособность (Farquharson et al., 2022; Ledermann et al., 2021). В связи с этим высокая численность ризобий на поверхности семян является важнейшим индикатором инокуляции и эффективности данного агроприема.

В рамках нашего исследования изучается влияние задержки с посевом инокулированных семян на численность клубеньковых бактерий. В сельскохозяйственной практике задержка происходит в связи с климатическими условиями, например, когда нет возможности провести посев в переувлажненную почву, что особенно актуально для зоны Дальнего Востока и Центрального региона. Задержки возникают

и в связи с технологическими трудностями, например, при необходимости ремонта сельскохозяйственной техники или при больших площадях высеваемой культуры (Разумова и др., 2016; Сурин и др., 2022). Поэтому для корректировки посевных мероприятий важно понимать численность и жизнеспособность клубеньковых бактерий, находящихся на поверхности инокулированных семян.

Цель исследования – изучить жизнеспособность бактерий рода *Bradyrhizobium*, являющихся действующим веществом применяемых в Российской Федерации жидких инокулянтов, в процессе длительного хранения инокулированных семян.

Материалы и методы исследований.

Исследования проводили в 2024 г. в лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ФНЦБЗР с использованием материально-технической базы уникальной научной установки (УНУ) «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (<https://fncbcr.ru/brk-i-unu/unique-installation-2/>).

Для инокуляции использовали семена сои сорта Вилана с массой тысячи семян 179 г. Вилана – среднеранний индетерминантный сорт, рекомендованный для возделывания в Северо-Кавказском, Нижневолжском и Дальневосточном регионах, который устойчив к почвенным засухам и отзывчив к орошению. Для эксперимента выбраны нестерильные откалиброванные семена одного размера без видимой симптоматики заболеваний и повреждений семенной оболочки.

В исследование выбраны жидкие инокулянты на основе бактерий *Bradyrhizobium*, внесенные в каталог агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации: Нитрофикс, Нитрофорс, Оптимайз 400, Хайкоут Супер Соя, Органит Ризо, а также лабораторный образец инокулянта производства научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма на основе *B. ottawaense* – Ризобин Агро (Государственный каталог..., 2025).

При выборе прилипателей (экстендеров) мы руководствовались рекомендациями производителей инокулянтов, которые предлагают данные препараты для повышения жизнеспособности клубеньковых бактерий на поверхности семян. В случае инокулянтов Оптимайз 400 и Хайкоут Супер Соя использовались прилипатели из комплекта с инокулянтом, в случае Нитрофикс и Нитрофорс – препарат Адьюгрейн (ПАВ), в случае препарата Органит Ризо и лабораторного образца Ризобин Агро – без прилипателя.

Инокулянты и прилипатели отбирали из герметичной заводской упаковки. Титр инокулянтов оценивали методом серийных разведений, где 0,1 мл инокулянта наносили на чашку и равномерно распределяли жидкость по поверхности шпателем (Нетрусов, 2005). Культивирование проводили

при 28 °С на плотном маннитно-дрожжевом агаре с добавлением Конго красного в концентрации 0,025 г/л для дифференциации колоний клубеньковых бактерий от колоний посторонних бактерий (Gitonga et al., 2021). Поверхностный рост бактерий оценивали на 10-е сутки.

Для инокуляции семян готовили рабочие растворы препаратов в стерильной дистиллированной воде. Нормы применения инокулянтов и прилипателей и концентрация рабочей жидкости соответствовали нормам, рекомендованным производителями инокулянтов для предпосевной обработки семян сои. Инокуляцию семян проводили ручным способом, а инокулированные семена перед закладкой на хранение просушивали на воздухе 24 часа. Семена помещали на хранение в стерильные бумажные крафт-пакеты, заворачивали и закрывали зажимами. Пакеты хранили в темноте при температуре 24–28 °С.

Количество жизнеспособных ризобий на поверхности инокулированных семян определяли стандартным методом смыва с поверхности. Стерильным пинцетом отбирали по 10 семян и помещали в колбу со 100 мл стерильной дистиллированной воды. Перемешивали в шей-

кере-инкубаторе при 180 об./мин в течение 20 мин. Титр полученных суспензий определяли методом серийных разведений на маннитно-дрожжевом агаре аналогично титру инокулянтов (Лактионов и др., 2018).

Повторность опытов трехкратная. Контроль – питательная среда без нанесения микроорганизмов. Количество жизнеспособных бактерий переводили в десятичные логарифмы. Статистический анализ данных проводили методом дисперсионного анализа (ANOVA) с применением критерия Дункана ($p < 0,05$) в программе Statistica Version 13.5.0.17. Графическое представление результатов с указанием погрешностей и доверительных интервалов выполнено в Microsoft Excel 2016.

Результаты и их обсуждение. Для того чтобы убедиться в соответствии препаратов заявленным техническим характеристикам, был определен их первоначальный титр. Исследование показало, что все инокулянты не были загрязнены посторонними микроорганизмами, а титр бактерий *Bradyrhizobium* составлял от $1,0\text{--}4,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на миллилитр), что соответствовало или было выше показателя, заявленного производителем (рис. 1).

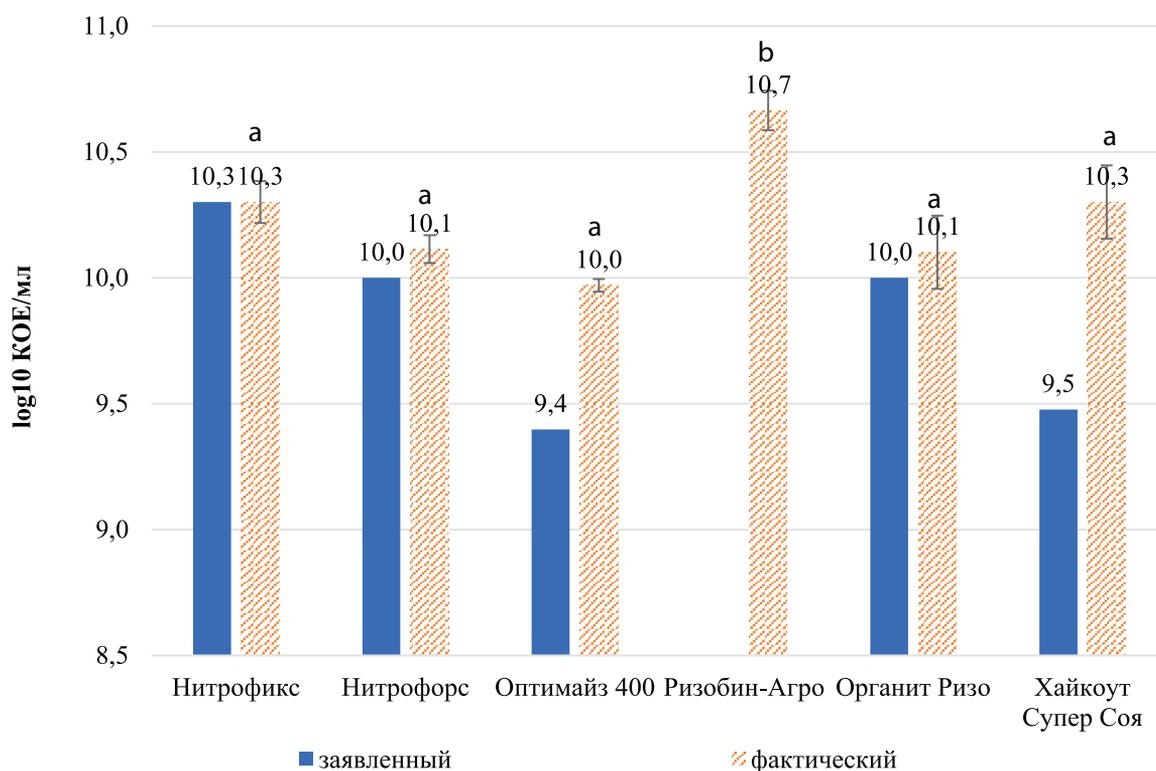


Рис. 1. Титр бактерий рода *Bradyrhizobium* в составе инокулянтов
Fig. 1. Titer of *Bradyrhizobium* bacteria in the composition of inoculants

В данном исследовании мы изучали влияние осмотического стресса на клетки клубеньковых бактерий, возникающего при хранении инокулированных семян при комнатной темпе-

ратуре. Исследование показало, что активные штаммы рода *Bradyrhizobium* в составе инокулянтов обладают различной устойчивостью клеток. Спустя сутки после инокуляции коли-

чество жизнеспособных ризобий на поверхности семян составило от $3,2-8,0 \times 10^6$ КОЕ/семя. Статистически достоверное максимальное количество клеток отмечено в варианте Ризобин-

Агро, что согласуется с тем, что данный препарат обладал изначально наиболее высоким титром (рис. 2).

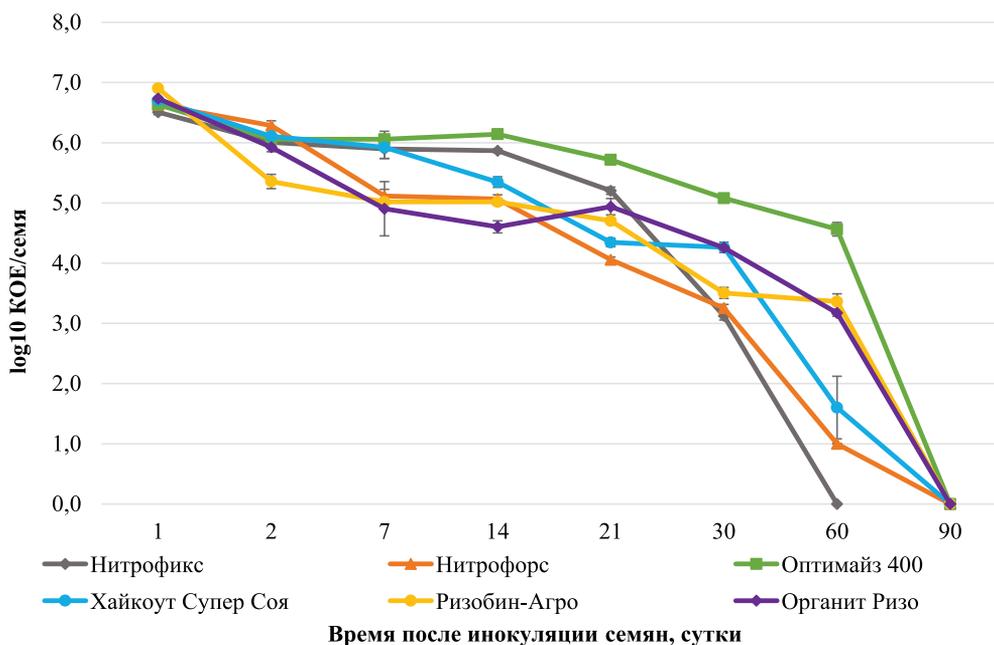


Рис. 2. Жизнеспособность бактерий рода *Bradyrhizobium* на поверхности инокулированных семян сои в процессе хранения

Fig. 2. Viability of *Bradyrhizobium* bacteria on the surface of inoculated soybean seeds during storage

Несмотря на то, что инокулянт Органит Ризо и лабораторный образец Ризобин-Агро наносились на семена без прилипателя, данные варианты показали достаточно высокую жизнеспособность клеток, что может указывать на осмотическую устойчивость данных коммерческих штаммов либо присутствие в культуральной жидкости осмопротекторов.

Хранение инокулированных семян при комнатной температуре без доступа света оказывало негативное влияние на жизнеспособность клубеньковых бактерий. Спустя семь суток хранения количество ризобий на семенах в вариантах Органит Ризо, Нитрофорс и Ризобин-Агро составляло около 10^5 КОЕ/семя. Существенное падение численности происходило после 21 суток хранения. Хранение семян в течение 60 суток привело к резкому снижению численности клубеньковых бактерий. По прошествии трех месяцев бактерии рода *Bradyrhizobium* во всех вариантах либо полностью погибли, либо их численность существенно снизилась и не превышала 82 КОЕ/семя.

Максимальная стабильность клеток и устойчивость к высыханию отмечена в варианте Оптимайз 400, где спустя 30 суток титр составил $1,2 \times 10^5$ КОЕ/семя, 60 суток – $3,6 \times 10^4$ КОЕ/семя.

Выводы. Инокулянты сои на основе бактерий *Bradyrhizobium* обладали высоким титром – более 10^{10} КОЕ/мл, что превышало титр, заявленный производителем, подтвердив высокое качество препаратов. Штаммы клубеньковых бактерий обладали различной устойчивостью к осмотическому стрессу в зависимости от препарата. Сразу после инокуляции количество клубеньковых бактерий, закрепившихся на семенах, составило $3,2-8,0 \times 10^6$ КОЕ/семя. Спустя 14 суток титр смывов с поверхности семян составил $4,0 \times 10^4-1,4 \times 10^6$ КОЕ/семя, и началось падение жизнеспособности клеток. К 21 суткам хранения инокулированных семян титр составил $2,2 \times 10^4-5,2 \times 10^5$ КОЕ/семя. Хранение инокулированных семян в течение трех месяцев полностью или существенно снижает количество жизнеспособных бактерий рода *Bradyrhizobium* на поверхности семян, способных вступить в симбиоз с соей. Штамм *B. japonicum* 61A273 в составе препарата Оптимайз 400 проявил максимальную жизнеспособность – спустя 60 суток отмечен титр $3,7 \times 10^4$ КОЕ/семя.

Финансирование. Исследования выполнены согласно государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № FGRN-2025-0003.

Библиографический список

1. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. М., 2025.
2. Лактионов Ю. В., Косульников Ю. В., Дудникова Д. В. Влияние водорастворимых полимеров на выживаемость клубеньковых бактерий люпина (*Rhizobium lupini*) // Зерновое хозяйство России. 2018. № 3(57). С. 17–26. DOI: 10.31367/2079-8725-2018-57-3-22-26
3. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие. М.: Академия, 2005. 608 с.
4. Разумова Н. В., Разумов В. В., Молчанов Э. Н. Переувлажнение и подтопление почв и земель в Центральном регионе России // Бюллетень Почвенного института им. В. В. Докучаева. 2016. № 82. DOI: 10.19047/0136-1694-2016-82-3-27
5. Сурин Р. О., Кузнецов Е. Е., Щитов С. В. Сравнительный анализ способов агрегатирования комбинированных машин с полурамным трактором // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2022. № 3(95). С. 177–182.
6. de Souza G. K., Sampaio J., Longoni L., Ferreira S., Alvarenga S., Beneduzi A. Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control // Brazilian Journal of Microbiology. 2019. Vol. 50, Iss. 1. P. 205–211. DOI: 10.1007/s42770-018-0028-z
7. Farquharson E. A., Ballard R. A., Herridge D. F., Ryder M. H., Denton M. D., Webster A., Yates R. J., Seymour N. P., Deaker R. J., Hartley E., Gemmel L. G., Hackney B., O'Hara G. W. Inoculating Legumes: Practice and Grains Research and Development Corporation, Science. 2022. Australia.
8. Gitonga N. M., Njeru E. M., Cheruiyot R., Maingi J. M. Genetic and Morphological Diversity of Indigenous *Bradyrhizobium* Nodulating Soybean in Organic and Conventional Family Farming Systems // Frontiers in Sustainable Food Systems. 2021. Vol. 4, Article number: 606618. DOI: 10.3389/fsufs.2020.606618
9. Hungria M., Araujo R. S., Silva-Junior E. B., Zilli J. E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions // Agronomy Journal. 2017. Vol. 109, № 3. P. 1–7. DOI: 10.2134/agronj2016.11.0641
10. Ledermann R., Schulte C. C. M., Poole P. S. How Rhizobia Adapt to the Nodule Environment // Journal of Bacteriology. 2021. Vol. 203, № 12, Article number. e00539-20. DOI: 10.1128/jb.00539-20
11. Mendoza-Suárez M. A., Geddes B. A., Sánchez-Cañizares C., Ramírez-González R. H., Kirchhelle C., Jorrián B., Poole P. S. Optimizing *Rhizobium*-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. Article number: 201921225. DOI: 10.1073/pnas.1921225117

References

1. Gosudarstvennyi katalog pestitsidov i agrokhimikatov, razreshennykh k primeneniyu na territorii Rossiiskoi Federatsii [State catalog of pesticides and agrochemicals approved for use in the Russian Federation]. Ministerstvo sel'skogo khozyaistva Rossiiskoi Federatsii. M., 2025.
2. Laktionov Yu. V., Kosul'nikov Yu. V., Dudnikova D. V. Vliyanie vodorastvorimyykh polimerov na vyzhivaemost' kluben'kovykh bakterii lyupina (*Rhizobium lupini*) [The effect of water-soluble polymers on the survival of lupine nodule bacteria (*Rhizobium lupini*)] // Zernovoe khozyaistvo Rossii. 2018. № 3(57). S. 17–26. DOI: 10.31367/2079-8725-2018-57-3-22-26
3. Netrusov, A. I. Praktikum po mikrobiologii: ucheb. posobie [Microbiology workshop: textbook]. M.: Akademiya, 2005. 608s.
4. Razumova N. V., Razumov V. V., Molchanov E. N. Pereuvlazhnenie i podtoplenie pochv i zemel' v Tsentral'nom regione Rossii [Waterlogging and flooding of soils and lands in the Central region of Russia] // Byulleten' Pochvennogo instituta im. V. V. Dokuchaeva. 2016. № 82. DOI: 10.19047/0136-1694-2016-82-3-27
5. Surin R. O., Kuznetsov E. E., Shchitov S. V. Sravnitel'nyi analiz sposobov agregirovaniya kombinirovannykh mashin s poluramnym traktorom [Comparative analysis of aggregating methods of combines with a semi-frame tractor] // Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2022. № 3(95). S. 177–182.
6. de Souza G. K., Sampaio J., Longoni L., Ferreira S., Alvarenga S., Beneduzi A. Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control // Brazilian Journal of Microbiology. 2019. Vol. 50, Iss. 1. P. 205–211. DOI: 10.1007/s42770-018-0028-z
7. Farquharson E. A., Ballard R. A., Herridge D. F., Ryder M. H., Denton M. D., Webster A., Yates R. J., Seymour N. P., Deaker R. J., Hartley E., Gemmel L. G., Hackney B., O'Hara G. W. Inoculating Legumes: Practice and Grains Research and Development Corporation, Science. 2022. Australia.
8. Gitonga N. M., Njeru E. M., Cheruiyot R., Maingi J. M. Genetic and Morphological Diversity of Indigenous *Bradyrhizobium* Nodulating Soybean in Organic and Conventional Family Farming Systems // Frontiers in Sustainable Food Systems. 2021. Vol. 4, Article number: 606618. DOI: 10.3389/fsufs.2020.606618
9. Hungria M., Araujo R. S., Silva-Junior E. B., Zilli J. E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions // Agronomy Journal. 2017. Vol. 109, № 3. P. 1–7. DOI: 10.2134/agronj2016.11.0641
10. Ledermann R., Schulte C. C. M., Poole P. S. How Rhizobia Adapt to the Nodule Environment // Journal of Bacteriology. 2021. Vol. 203, № 12, Article number. e00539-20. DOI: 10.1128/jb.00539-20
11. Mendoza-Suárez M. A., Geddes B. A., Sánchez-Cañizares C., Ramírez-González R. H., Kirchhelle C., Jorrián B., Poole P. S. Optimizing *Rhizobium*-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. Article number: 201921225. DOI: 10.1073/pnas.1921225117

Поступила: 26.03.25; доработана после рецензирования: 14.06.25; принята к публикации: 16.06.25.

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.

Авторский вклад. Астахов М. М. – проведение лабораторных опытов, сбор, анализ данных и их интерпретация, подготовка рукописи; Томашевич Н. С. – концептуализация исследований, редактирование рукописи.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.