

## О ФАКТОРАХ, ВЛИЯЮЩИХ НА ТОКСИЧНОСТЬ ПРОТРАВИТЕЛЕЙ СЕМЯН ДЛЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ АЗОТФИКСАТОРОВ В СОСТАВЕ БИОПРЕПАРАТОВ\*

Ю.В. КОСУЛЬНИКОВ, Ю.В. ЛАКТИОНОВ

Основой современного производства биопрепаратов азотфиксаторов служат симбиотические микроорганизмы семейства *Rhizobiaceae*, так как свободноживущие микроорганизмы, не проявляющие хозяйской специфичности в отношении вида возделываемой культуры, обладают значительно меньшей азотфиксирующей способностью, чем бобово-ризобийный симбиоз, формируемый видоспецифичными клубеньковыми бактериями. Однако распространению предпосевной инокуляции семян бобовых и более широкому применению биопрепаратов клубеньковых бактерий мешает ряд объективных недостатков таких препаратов, например сравнительно низкая устойчивость ризобий к неблагоприятным факторам среды. К таким факторам относится прямой контакт бактерий с агрессивными веществами, например с химическими фунгицидами, используемыми для протравливания семян. Мы впервые показали, что выживаемость ризобий зависит от температуры баковых растворов, а метод производства протравителя существенно влияет на совместимость инокулянтов и протравителей на основе одного и того же действующего вещества. Нашей целью было определение влияния марки протравителя, его концентрации в растворе, времени выдержки раствора и температурного режима на количество выживших в растворе клубеньковых бактерий сои, люпина, гороха и чечевицы. Были изучены бактериальные суспензии клубеньковых бактерий сои (*Bradyrhizobium japonicum* 6346), люпина (*Bradyrhizobium lupini* 367a), гороха (*Rhizobium leguminosarum* 2616), чечевицы (*Rhizobium leguminosarum* 712) и химические фунгициды Максим, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; «Syngenta International AG», Швейцария), Протект, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; ООО «Агро Эксперт Групп», Россия, «Agro Expert Group Kft.», Венгрия), Протект Форте, ВСК (д.в. флудиоксонил, 40 г/л + флутриафол, 30 г/л; ООО «Агро Эксперт Групп», Россия, «Agro Expert Group Kft.», Венгрия). Совместимость определяли после приготовления баковых растворов биопрепаратов и протравителей с последующей оценкой процента выживших ризобий в зависимости от вида протравителя, его концентрации (10 и 20 %), времени выдержки раствора (2, 4, 8 ч) и температурного режима (2-5, 16-18, 27 °С). Показано, что устойчивость клубеньковых бактерий разных зернобобовых культур к пестицидам неодинаковой и уменьшается в последовательности соя > люпин > горох > чечевица. Токсичность пестицидов увеличивалась в порядке Максим > Протект > Протект Форте. Нахождение ризобий в одном растворе с протравителями негативно сказывалось на выживаемости бактерий: чем дольше выдерживали смесь, тем меньше в ней оставалось жизнеспособных ризобий. С ростом температуры смеси и концентрации протравителей в растворе их токсичность увеличивается. Низкие температуры (2-5 °С) значительно повышали выживаемость ризобий. Протравители Максим и Протект, приготовленные на основе одного и того же действующего вещества с одинаковой его концентрацией, резко различались по токсичности.

Ключевые слова: симбиотические азотфиксаторы, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, биопрепараты, протравители семян, совместимость и токсичность.

Бобовые культуры — это главный источник растительного белка (1). Средняя урожайность бобовых в России сильно уступает (иногда в разы) аналогичному показателю в странах Европы и в США (2, 3). Одна из существенных причин — малая эффективность технологий, применяемых в большинстве случаев. Парадоксальность ситуации в том, что именно в суровых климатических условиях, которые характерны для большей части российских сельскохозяйственных угодий (Урал, Сибирь), необходимость в самых современных агротехнических приемах многократно возрастает (4, 5). К ним, в частности, относится использование препаратов симбиотических клубеньковых бактерий, которые, заселяя корневую систему растения, обеспечивают ему способность фиксировать атмосферный азот (6-8). На российском рынке они представлены, но пока не получили широкого распространения. В числе прочих причин — отсутствие обоснованных регла-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.607.21.0178, RFMEF160717X0178).

ментов применения микробиологических препаратов совместно с химическими средствами защиты растений. На практике это неизбежно снижает эффективность и рентабельности биопрепаратов, ведет к прямым экономическим потерям и необоснованно дискредитирует метод, который признается одним из важных элементов биологизации, экологизации и повышения устойчивости современного сельскохозяйственного производства.

В состав протравителей входят токсичные для микроорганизмов вещества, поэтому бактерии, на основе которых готовятся микробиологические препараты, попадают в неблагоприятные условия. К сожалению, изучение совместимости биопрепаратов и протравителей явно отстает от появления новых потенциально пригодных для практики штаммов, форм биопрепаратов (9, 10) и изменений в технологии производства протравителей под одной и той же маркой (11, 12). Протравители (гербициды, фунгициды, инсектициды и т.д.) уже давно показали эффективность, технологии их применения отработаны (13, 14) и закрепились в отечественном сельском хозяйстве. Поэтому, если существуют сомнения в результативности совместного применения биологических и химических препаратов, на практике предпочтение отдается последним (15, 16). Иными словами, дефицит научных работ по оценке совместимости микробиологических и химических методов обработки семян зернобобовых (17, 18) может стать причиной отказа от биопрепаратов, несмотря на их экологичность (19, 20), экономичность (21) и эффект (22, 23) при повышении урожайности зернобобовых. Следует отметить, что отечественные публикации по этой проблеме крайне немногочисленны (24, 25).

В настоящем исследовании впервые представлены результаты, подтверждающие, что на совместимость инокулянтов и протравителей на основе одного и того же действующего вещества существенно влияет метод производства протравителя, то есть качественный и количественный состав (формуляция) дополнительных компонентов (полимеры-пленкообразователи, адъюванты, поверхностно-активные вещества и т.д., которые, по мнению производителей, повышают технологичность протравителя), а также температурный режим бакового раствора. Эти данные дополняют те ограниченные сведения, которые касаются совместимости препаратов клубеньковых бактерий и химических средств защиты бобовых.

Нашей целью было определение влияния марки протравителя, его концентрации в растворе, времени выдержки раствора и температурного режима на количество выживших в растворе клубеньковых бактерий сои, люпина, гороха и чечевицы.

*Методика.* Штаммы клубеньковых бактерий сои (*Bradyrhizobium japonicum* 634б), люпина (*Bradyrhizobium lupini* 367а), гороха (*Rhizobium leguminosarum* 261б) и чечевицы (*Rhizobium leguminosarum* 712) были получены из ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Препараты готовили на полусинтетической среде (0,5 г/л  $K_2HPO_4$ , 0,2 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 г/л NaCl, 1,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л маннита) с последующим культивированием (28 °С, 170 об/мин, орбитальный шейкер-инкубатор ES-20/60, «BioSan», Латвия).

Были использованы следующие химические фунгициды: Maxim, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; «Syngenta International AG», Швейцария), Протект, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; ООО «Агро Эксперт Групп», Россия, «Agro Expert Group Kft.», Венгрия), Протект Форте, ВСК (д.в. флудиоксонил, 40 г/л + флутриафол, 30 г/л; ООО «Агро Эксперт Групп», Россия,

«Agro Expert Group Kft.», Венгрия).

Фунгициды и клубеньковые бактерии смешивали (20 % раствор бактериальной суспензии с 10 % и 20 % растворами протравителя каждой исследуемой марки). Через определенные интервалы (0, 1, 2, 4 и 8 ч) титры бактерий определяли высевом на чашки Петри с полусинтетической средой (состав указан выше) с добавлением 20 г/л агар-агара. Смеси культур и фунгицидов выдерживали в холодильной камере (2-5 °С), при комнатной температуре в условиях лаборатории (16-18 °С) и в термостате (27,5 °С). Через 10 сут (время роста клубеньковых бактерий на чашках Петри) подсчитывали образовавшиеся колонии (КОЕ).

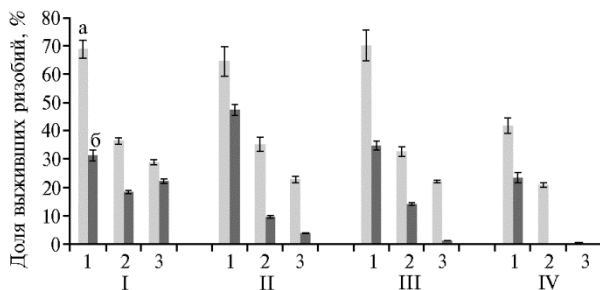


Рис. 1. Доля выживших ризобий *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (I), *Bradyrhizobium lupini* 367a (II), *Rhizobium leguminosarum* 2616 (III) и *Rhizobium leguminosarum* 712 (IV) в смеси с 10 % (а) и 20 % (б) растворами фунгицидов Maxim (1), Протект (2) и Протект Форте (3) (смесь культур и фунгицидов выдерживалась 8 ч при 16-18 °С).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 10. Для подтверждения достоверности различий между вариантами на рисунках и в таблице представлены средние значения ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Различия оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Повторность опыта 3-кратная.

*Результаты.* Выбор штаммов микроорганизмов был обусловлен наибольшей практической значимостью культур (соя, люпин, горох, чечевица) в современной России и странах СНГ. В России на основе этих штаммов выпускают биопрепараты для бобовых под коммерческим наименованием Ризоторфин® (производитель ВНИИСХМ).

Смешивание химических протравителей с препаратами ризобий негативно влияло на выживаемость последних. Устойчивость клубеньковых бактерий разных зернобобовых культур к пестицидам была различной и уменьшалась в последовательности клубеньковые бактерии сои, люпина, гороха, чечевицы. Токсичность пестицидов увеличивалась в таком порядке: Maxim, Протект, Протект Форте (рис. 1).

Выживаемость ризобий в смеси с протравителями также в значительной степени зависела от температуры, при которой выдерживали смесь. Чем токсичнее для ризобий был протравитель (рис. 2), тем нагляднее проявлялось положительное влияние низких температур на выживаемость клубеньковых бактерий. Роль температурного фактора возрастала с увеличением концентрации протравителя. Так, доля выживших клубеньковых бактерий сои в смеси с 10 % раствором фунгицида Maxim спустя 8 ч после смешения при 2-5 и 16-18 °С составляла соответственно 72,02 и 68,88 %. В то же время для 20 % раствора фунгицида получили значения 65,73 и 31,12 %. Выявленная закономерность оказалась справедлива для каждой исследованной пары биопрепарат—протравитель.

В ряде случаев действующее вещество фунгицида не было главным фактором, определяющим динамику сокращения числа ризобий. Например, в состав самого малотоксичного для всех исследованных видов ризобий протравителя Maxim входит то же действующее вещество и в той же концентрации, что и в состав значительно более токсичного препарата

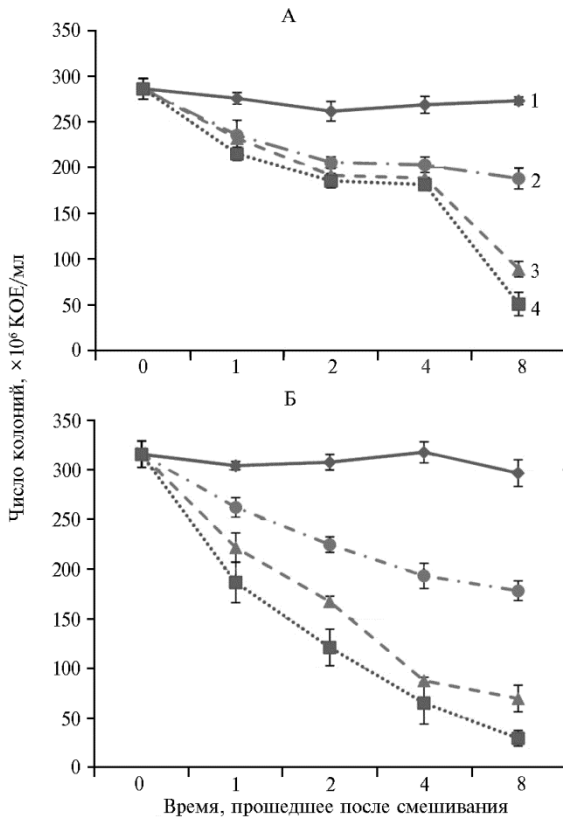


Рис. 2. Число колоний *Bradyrhizobium japonicum* 6346 в растворе с 20 % фунгицидами Максим (А) и Протект Форте (Б) в зависимости от времени выдержки и температурного режима смеси: 1 — комнатная температура (контроль), 2 — 2-5 °С, 3 — 16-18 °С, 4 — 27,5 °С.

Протект (табл.). При этом токсичность фунгицида Протект для ризобий сои и люпина оказалась сопоставима с токсичностью препарата Протект Форте, несмотря на то, что у последнего концентрация флудиоксонила практически в 2 раза больше, а также присутствует второе действующее вещество — флутриафол (см. табл.). Контролем служил 20 % рабочий раствор бактериальных суспензий в водопроводной воде; все различия между опытными и соответствующими контрольными вариантами статистически значимы при  $p < 0,05$ .

**Доля выживших ризобий в смеси с 10 и 20 % растворами фунгицидов в зависимости от времени с момента смешивания (смесь выдерживали при температуре 16-18 °С) ( $M \pm SEM$ )**

Время, ч	Ризобии и концентрация фунгицида							
	<i>Bradyrhizobium</i>				<i>Rhizobium</i>			
	<i>japonicum</i> 634		<i>lupini</i> 367a		<i>leguminosarum</i> 2616		<i>leguminosarum</i> 712	
	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %	10 %	20 %
Максим КС								
2	79,02±4,95	67,31±3,56	82,56±5,64	73,76±4,26	83,43±5,23	81,6±5,26	81,67±5,27	63,33±3,21
4	75,52±4,20	65,91±3,24	75,36±4,58	69,92±3,98	74,11±4,13	67,2±3,89	71,67±7,13	60,00±3,14
8	68,88±3,98	31,12±1,72	64,48±3,67	47,36±2,58	70,19±3,98	34,7±1,94	41,67±2,10	23,33±0,79
Протект КС								
2	75,20±4,45	50,30±3,12	60,69±3,33	33,49±1,49	62,58±3,09	31,11±1,21	81,67±5,28	13,41±0,26
4	58,57±2,89	32,47±1,32	48,43±2,98	25,63±0,71	52,02±2,27	22,14±0,76	71,67±7,16	3,66±0,19
8	36,25±1,97	18,23±0,45	35,06±1,73	9,43±0,14	32,52±1,67	13,98±1,05	41,67±2,13	0,00
Протект Форте ВСК								
2	69,73±3,64	52,93±3,16	55,03±3,57	38,76±2,03	39,00±1,99	17,00±0,54	2,62±0,16	0,00
4	46,12±2,31	27,73±0,86	46,64±2,75	18,12±0,41	36,00±1,75	14,00±0,34	1,07±0,12	0,00
8	28,68±0,95	22,03±0,69	22,65±0,74	3,69±0,10	22,00±0,68	1,00±0,12	0,12±0,10	0,00

Примечание. Все различия между опытными и соответствующими контрольными вариантами статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы по факторам токсичности протравителей для бактерий показал, что действующие вещества большинства протравителей (в чистом виде) определены исследователями, как в той или иной степени токсичные по отношению к ризосферным микроорганизмам (26, 27), в том числе к клубеньковым бактериям (28, 29). Сообщается (30), что контакт ризобий сои на инокулированных семенах с такими распространенными фунгицидными веществами, как каптан и тирам (контактные фунгициды), а также беномил, карбендазим, дифеноконазол и тебуконазол (системные фунгициды), вызывает значительное сокращение числа жизнеспособных бактерий. Не все дей-

ствующие вещества протравителей однозначно токсичны по отношению ко всем видам и штаммам ризобий. Так, в работе М. Tariq с соавт. (31) ризобии гороха определены как устойчивые к бензимидазолам. По данным другого исследования (32), флудиоксонил оказывает значительное токсическое действие на ризобии сои. Авторы утверждают (32), что контакт ризобий сои с флудиоксоном на инокулированных семенах значительно снижает число выживших бактерий по сравнению с контролем через 24 и 48 ч после инокуляции. Добавление к инокулянту полимера альгината значительно повышало выживаемость ризобий в контакте с флудиоксоном (32). Это позволяет предположить, что в нашем опыте лучшая выживаемость ризобий в смеси с протравителем Maxim по сравнению с протравителем Протект связана не с большей токсичностью дополнительных компонентов в составе последнего, а с защитным действием на ризобии полимеров в препарате Maxim. В пользу такого предположения говорит тот факт, что некоторые водорастворимые полимеры действительно повышают общую стойкость ризобий к неблагоприятным условиям среды, в частности добавление в бактериальную суспензию альгината натрия и карбоксиметилцеллюлозы значительно увеличивает сроки хранения бактериального препарата (33). По-видимому, важен не только состав и концентрации действующих веществ протравителя, но и состав и концентрации дополнительных компонентов (полимеры-пленкообразователи, поверхностно-активные вещества — ПАВ, эмульгаторы, антисептики и т.д.), то есть так называемая формуляция препаративной формы протравителя. В ряде исследований подтверждается сильнейшее влияние полимеров-пленкообразователей, адъювантов и ПАВ на выживаемость бактерий в биопрепаратах (34).

Есть сообщения, что разные марки протравителей (35) и различные температурные режимы при хранении баковых растворов заметно влияют на выживаемость бактерий в таких растворах. В ряде работ показана способность ризобий разлагать пестициды (36), что, впрочем, достаточно распространено среди ризосферных микроорганизмов (37). По имеющимся данным (38, 39), медленнорастущие ризобии сои *Bradyrhizobium japonicum* и быстрорастущие ризобии сои *Sinorhizobium fredii* могут расти на минерально-растительной агаризованной среде с добавлением производственной концентрации фунгицида Maxim. При этом интенсивность их роста либо не уступает таковой в контроле (38), либо незначительно снижается (39).

Стоит отметить, что отсутствие явного токсического эффекта протравителя в отношении ризобий в совместном баковом растворе вовсе не гарантирует от негативных последствий для клубенькообразования (40, 41). В ряде работ описано ингибирующее действие фунгицида Maxim на интенсивность формирования клубеньков у инокулированных растений сои (24), при том что протравливание семян и их инокуляция были разделены во времени. В то же время некоторые авторы указывают (39), что инокуляция семян сои с протравливанием фунгицидом Maxim обеспечивает более интенсивное клубенькообразование, прирост надземной массы и достоверную прибавку урожайности по сравнению с инокуляцией «в чистом виде».

Таким образом, мы можем утверждать, что среди исследованных ризобий наиболее устойчивыми к протравителям оказались клубеньковые бактерии сои (*Bradyrhizobium japonicum* 6346), наименее устойчивыми — клубеньковые бактерии чечевицы (*Rhizobium leguminosarum* 712). В свою очередь, среди использованных протравителей самым малотоксичным для ризобий был фунгицид Maxim, самым токсичным — Протект Форте. Протравители Maxim и Протект, приготовленные на основе одного и того же действующего вещества с одинаковой его концентрацией, резко различа-

лись по токсичности. Вероятно, токсичность этих фунгицидов для клубеньковых бактерий связана не только и не столько с действующими веществами в их составе, сколько с теми дополнительными компонентами (полимеры-пленкообразователи, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, антисептики и т.д.), которые производители добавляют в протравитель той или иной марки для улучшения ее технологических свойств (формуляция препаративной формы протравителя). Нахождение ризобий в одном растворе с протравителями негативно сказывается на выживаемости бактерий: чем дольше выдерживалась смесь, тем меньше оставалось жизнеспособных ризобий. С ростом температуры смеси и концентрации протравителей в растворе их токсичность увеличивается. Низкие температуры (2-5 °С) значительно повышают выживаемость ризобий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Зотиков В.И., Грядунова Н.В., Наумкина Т.С., Сидоренко В.С. Зернобобовые культуры в экономике России. *Земледелие*, 2014, 4: 6-8.
2. John R.P., Tyagi R.D., Brar S.K., Prevost D. Development of emulsion from rhizobial fermented starch industry wastewater for application as *Medicago sativa* seed coat. *Eng. Life Sci.*, 2010, 10(3): 248-256 (doi: 10.1002/elsc.201000002).
3. Suzaki T., Yoro E., Kawaguchi M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cel. Mol. Bio.*, 2015, 316: 111-158 (doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004).
4. Никитин С.Н., Завалин А.А. Влияние удобрений и биопрепаратов на продуктивность зернопарового севооборота, потоки элементов питания и свойства чернозема выщелоченного в лесостепи среднего Поволжья. *Агрехимия*, 2017, 6: 12-29.
5. Жеруков Б.Х. Биологический азот в сельском хозяйстве: проблемы, решения и перспективы развития. *Известия Горского государственного аграрного университета*, 2010, 47(2): 43-47.
6. Миркин Б.М., Наумова Л.Г. *Основы общей экологии*. М., 2003.
7. Beveridge C.A., Mathesius U., Rose R.J., Gresshoff P. Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007, 10(1): 44-51 (doi: 10.1016/j.pbi.2006.11.011).
8. Marra L.M., Fonsecas Sousa Soares C.R., Oliveira S.M., Avelar Ferreira P.A., Soares B.L. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil*, 2012, 357: 289-307 (doi: 10.1007/s11104-012-1157-z).
9. Кожемяков А.П., Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Орлова А.Г., Кокорина А.Л., Вайшла О.Б., Агафонов Е.В., Гужвин С.А., Чураков А.А., Яковлева М.Т. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(3): 369-376 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.369rus).
10. Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Андреев О.А., Ибатуллина Р.П., Кожемяков А.П. Создание стабильной формы ростстимулирующих микробиологических препаратов и их эффективность. *Сельскохозяйственная биология*, 2011, 3: 116-118.
11. Rashmi P.A., Dayana J. Isolation of pesticide tolerating bacteria from cultivated soil in Kerala and the study of the role of plasmid in pesticide tolerance. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2015, 3(1): 109-114.
12. Налиухин А.Н., Лактионов Ю.В. Эффективность применения микроэлементного комплекса Аквамикс-Т при возделывании козлятника восточного в северной части Нечернозёмной зоны. *Земледелие*, 2015, 2: 25-27.
13. Лаптев А.Б., Кунгурцева О.В. Предпосылки и основы химической защиты гороха от болезней. *Зернобобовые и крупяные культуры*, 2016, 2: 99-103.
14. Пимохова Л.И., Царапнева Ж.В. Комплексная защита люпина белого от антракноза. *Зернобобовые и крупяные культуры*, 2016, 3: 89-94.
15. Potera C. Agriculture: pesticides disrupt nitrogen fixation. *Environ. Health Persp.*, 2007, 115(12): A579 (doi: 10.1289/ehp.115-a579a).
16. Moorman T. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* Strains. *Weed Sci.*, 1986, 34(4): 628-633 (doi: 10.1017/S0043174500067564).
17. Reganold J.P., Papendick R.I., Parr J.F. Sustainable agriculture. *Scientific American*, 1990, 262: 112-120 (doi: 10.1038/scientificamerican0690-112).
18. Vance C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorous acquisition. Plant nutrition in the world of declining renewable resources. *Plant Physiol.*, 2001, 127: 390-397.
19. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L.L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 2015, 5(4): 355-377 (doi: 10.1007/s13205-014-0241-x).
20. Эседуллаев С.Т., Шмелева Н.В. Особенности аккумуляции азота многолетними бобовыми травами в чистых и смешанных посевах в Верхневолжье. *Плодородие*, 2016, 6(93): 16-18.

21. Mmbaga G.W., Mtei K.M., Ndakidemi P.A. Yield and fiscal benefits of rhizobium inoculation supplemented with phosphorus (P) and potassium (K) in climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in Northern Tanzania. *Agricultural Sciences*, 2015, 6(8): 783-797 (doi: 10.4236/as.2015.68076).
22. Лактионов Ю.В., Белоброва С.Н., Кожемяков А.П., Воробьев Н.И., Сергалиев Н.Х., Аменова Р.К., Тлепова А.С. Эффективность бобово-ризобияльного симбиоза нут *Cicer arietinum* L.—бактерии *Mesorhizobium cicer* при использовании минеральных удобрений. *Плодородие*, 2013, 5: 24-25.
23. Тихонович И.А., Завалин А.А., Благовещенская Г.Г., Кожемяков А.П. Использование биопрепаратов — дополнительный источник элементов питания растений. *Плодородие*, 2011, 3: 9-13.
24. Борзенкова Г.А., Васильчиков А.Г. Применение эффективных протравителей и инокулянтов в технологии возделывания различных сортов сои. *Земледелие*, 2014, 4: 37-39.
25. Борзенкова Г.А. Оптимизация технологии предпосевного протравливания и возможность его сочетания с инокуляцией для защиты сои от семенной инфекции. *Зернобобовые и крупяные культуры*, 2014, 1: 22-30.
26. Yousaf S., Khan S., Aslam M.T. Effect of pesticides on the soil microbial activity. *Pakistan J. Zool.*, 2013, 45(4): 1063-1067.
27. Alam S., Kumar A., Kumar A., Prasad S., Tiwari A., Srivastava D., Srivastava S., Tiwari P., Singh J., Mathur B. Isolation and characterization of pesticide tolerant bacteria from brinjal rhizosphere. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2018, Special Issue-7: 4849-4859.
28. Drouin P., Sellami M., Prevost D., Fortin J., Antoun H. Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2010, 45(8): 780-788 (doi: 10.1080/03601234.2010.515168).
29. Deshmukh V.V., Raut B.T., Mane S.S., Ingle R.W., Josh M.S. Compatibility of *Bradyrhizobium japonicum* isolates with agrochemicals. *American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences*, 2014, 6(1): 55-62.
30. Campo R.J., Araujo R.S., Hungria M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. *Symbiosis*, 2009, 48: 154-163.
31. Tariq M., Hameed S., Shahid M., Yasmeen T., Ali A. Effect of fungicides and bioinoculants on *Pisum sativum*. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 2016, 5(2): 36-40.
32. Romero-Perdomo F.A., Camelo M., Bonilla R. Response of *Bradyrhizobium japonicum* to alginate in presence of pelleted fungicides on soybean seeds. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 2015, 18(2): 359-364.
33. Rivera D., Obando M., Barbosa H., Tapias D.R., Buitrago R.B. Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the *Rhizobium*—cowpea interaction. *Universitas Scientiarum*, 2014, 19(3): 265-275 (doi: 10.11144/Javeriana.SC19-3.eplr).
34. Leo Daniel A.E., Venkateswarlu B., Suseelendra D., Praveen Kumar G., Mir Hassan Ahmed S.K., Meenakshi T., Uzma S., Sravani P., Lakshmi Narasu M. Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. *J. Plant Physiol. Pathol.*, 2013, 1: 2.
35. Ahemad M., Khan M.S. Ecotoxicological assessment of pesticides towards the plant growth promoting activities of Lentil (*Lens esculentus*)-specific *Rhizobium* sp. strain MRL3. *Ecotoxicology*, 2011, 20(4): 661-669 (doi: 10.1007/s10646-011-0606-4).
36. Moawad H., Abd El-Rahim W.M., Shawky H., Higazy A.M., Daw Z.Y. Evidence of fungicides degradation by rhizobia. *Agricultural Sciences*, 2014, 5(7): 618-624 (doi: 10.4236/as.2014.57065).
37. McGuinness M., Dowling D. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2009, 6(8): 2226-2247 (doi: 10.3390/ijerph6082226).
38. Якименко М.В., Бегун С.А., Сорокина А.И. Совместимость коллекционных штаммов ризобий сои с фунгицидами и ростостимулирующими препаратами. *Дальневосточный аграрный вестник*, 2016, 2(38): 38-41.
39. Якименко М.В. Совместное применение штаммов ризобий и некоторых препаратов для предпосевной обработки семян сои. *Земледелие*, 2016, 6, 46-48.
40. Gomes Y.C.B., Dalchiavon F.C., Valadão de Assis F.C. Joint use of fungicides, insecticides and inoculants in the treatment of soybean seeds. *Rev. Ceres*, 2017, 64(3): 258-265 (doi: 10.1590/0034-737x201764030006).
41. Fox J.E., Gullledge J., Engelhaupt E., Burow M.E., McLachlan J.A. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *PNAS USA*, 2007, 104(24): 10282-10287 (doi: 10.1073/pnas.0611710104).

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: Laktionov@list.ru, kullavayn@gmail.com ✉

Поступила в редакцию  
17 июля 2018 года

# DISINFECTANTS TOWARDS BIOLOGICALS BASED ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXERS

Yu.V. Kosulnikov, Yu.V. Laktionov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail laktionov@list.ru, kullavayn@gmail.com (✉ corresponding author)  
ORCID:

Laktionov Yu.V. orcid.org/0000-0001-6241-0273

Kosulnikov Yu.V. orcid.org/0000-0003-1134-3503

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement № 14.607.21.0178, RFMEFI60717X0178)

Received July 17, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2018.5.1037eng

## Abstract

Symbiotic nitrogen fixers of *Rhizobiaceae* family serve as biologicals for agriculture. This is due to the fact that free-living inoculants which are not crop-specific possess much less nitrogen-fixing ability than the legume—rhizobial symbiosis of a plant and its species-specific symbiont. Despite this, the seedbed inoculation and a wider use of biopreparations of nodule bacteria in legumes are hampered by a number of objective deficiencies of such preparations, for example, the relatively low resistance of rhizobia to adverse environmental factors. These factors include direct contact of bacteria with aggressive substances, i.e. chemical fungicides used for seed treatment. This paper is the first to report that the rhizobia survival rate depends on the temperature of tank solutions and may differ under the effect of disinfectants based on the same active ingredient. That is, methods of disinfectant manufacture significantly affect its toxicity towards nodule bacteria. Our goal was to determine the effect of treaters, its concentration in the solution, the time the solution was kept and the temperature mode on the number of nodule bacteria of soybean, lupine, pea and lentils that survived in the solution. Bacterial suspensions studied were root nodule bacteria of soybean (*Bradyrhizobium japonicum* 634b), lupine (*Bradyrhizobium lupini* 367a), pea (*Rhizobium leguminosarum* 261b), lentil (*Rhizobium leguminosarum* 712), and chemical fungicides were Maxim (fludioxonil, 25 g/l; «Syngenta International AG», Switzerland), Protekt, (fludioksonil, 25 g/l; «Agro Expert Group LLC», Russia, «Agro Expert Group Kft.», Hungary), Protekt Forte (fludioxonil, 40 g/l + flutriafol, 30 g/l; «Agro Expert Group LLC», Russia, «Agro Expert Group Kft.», Hungary). Compatibility was determined by preparing tank solutions of biologicals and disinfectants, followed by determining the percentage of rhizobia that survived, depending on the type of disinfectant, its concentration (10 and 20 %), solution holding time (2, 4, 8 hours) and temperature (2-5, 16-18, 27 °C). Our results show that the resistance of nodule bacteria of various leguminous plants to these pesticides differs and decreases among the nodule bacteria of soybean, lupine, pea, lentils. The pesticide toxicity increases in the order Maxim, Protekt, and Protekt Forte. The presence of rhizobia in the same solution with disinfectants negatively affects the bacteria survival. The longer the mixture is kept, the less rhizobia remain alive. With increasing temperature of the mixture and the concentration of disinfectants in the solution, their toxicity increases. Low temperatures (2-5 °C) significantly increase the survival rate of rhizobia. The disinfectants Maxim and Protekt, prepared on the basis of the same active ingredient with the same concentration, differed sharply in toxicity.

Keywords: symbiotic nitrogen fixers, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, biologicals, seed dressing agents, treaters, compatibility and toxicity.

## Научные собрания

### IV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦИИ, СЕМЕHOBOДCTBA И PАЗMHOЖЕНИЯ PАСТЕНИЙ»

Организаторами конференции, которая прошла 3-8 сентября 2018 года в НБС-ННЦ РАН (г. Ялта) выступили РАН, Министерство сельского хозяйства РФ, Министерство науки и высшего образования РФ, Министерство сельского хозяйства Республики Крым, Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН, РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева, Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина. В ее работе Конференция участвовали специалисты из России, Китая, Монголии, Германии, Молдавии, Белоруссии. Обсуждалась концепция стратегического развития семеноводства в России, экологические и генетические основы селекции, проблемы биологически и экологически ориентированного растениеводства. Три рабочие секции конференции были посвящены селекции, генетике и семеноводству полевых растений, защите растений и овощеводству, селекции, семеноводству и размножению садовых и лесных древесных растений. В рамках конференции прошла Школа молодых ученых.

**Информация:** <http://nikitasad.ru/science/o-rabote-konferentsii-po-semenovodstvu/>