

СКРИНІНГ АБОРИГЕННИХ БАКТЕРІЙ *BRADYRHIZOBIUM* З ҐРУНТУ ТА ЇХ СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

І.І. Гуменюк, С.Ю. Грузінський, І.С. Бровко, Я.В. Чабанюк

Інститут агроекології і природокористування НААН

*Висвітлено результати скринінгу ізолятів бульбочкових бактерій сої та їх морфолого-культуральних властивостей за допомогою загальноприйнятих ідентифікаційних тестів. Виділено 34 ізоляти, з яких 11 віднесено до повільнорослих ризобій та 10 — до швидкорослих. За активністю формування та функціонування азотфіксувальної симбіотичної системи сої ізоляти LG 2, LG 3 та LG 5 віднесено до бактерій роду *Bradyrhizobium*. Для перевірки азотфіксувального потенціалу цих ізолятів визначали нітрогеназну активність сформованих ними бульбочок. Активність ізоляту *B. japonicum* LG 5 була найвищою, що переважало активність виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* eko/001 на 14,3%.*

Ключові слова: *бульбочкові бактерії, симбіотична система, нітрогеназна активність, *Bradyrhizobium japonicum*, соя.*

Останнім часом в Україні прослідковується тенденція до збільшення посівів сої, а разом з розвитком та поширенням біологізації сільського господарства — підвищення попиту на біопрепарати. Інокулянти на основі агрономічно-корисних штамів мікроорганізмів, які використовують молекулярний азот як джерело живлення та перетворюють його у доступну для рослин форму, сприяють підвищенню врожайності рослин [1]. Застосування інокулянтів є невід'ємною частиною агротехнології вирощування сої та інших бобових культур у більшості господарств світу (Китай, Аргентина, Бразилія, Індія та США). Відомо, що за сприятливих умов бобова культура може накопичувати у ґрунті близько 320 кг/га азоту [2].

Наразі технологія вирощування сої передбачає передпосівну обробку насіння мікробними препаратами, основою яких є високоефективні штами бульбочкових бактерій. Продуктивність симбіозу з азотфіксувальними бактеріями визначається активністю та конкурентоспроможністю штаму в конкретних ґрунтово-кліматичних умовах, його комплементарністю до певного сорту рослин, а також генетичними особливостями макросимбіонта. Тому створення високоефективних азотфіксу-

вальних систем *Bradyrhizobium japonicum* — *Glycine max* має велике теоретичне значення та практичну цінність.

Керуючись загальними стереотипами, українські аграрії надають перевагу препаратам закордонних марок. Проте сучасні дослідження підтверджують ефективність та доцільність використання українських біопрепаратів, оскільки вони не поступаються якостю зарубіжним аналогам та мають низку переваг (доступність, аргументована ціна-якість), а головне — адаптованість основного біологічного агента до погодних та ґрунтових умов території України.

Відбувається постійний пошук аборигенних бактерій роду *Bradyrhizobium* та модифікування їх методами генетичної інженерії для створення симбіотичних характеристик, таких як вірулентність, специфічність, комплементарність, активність, ефективність, конкурентоспроможність та технологічність [3].

Тому метою дослідження є пошук нових, конкурентоспроможних, високоефективних ізолятів бульбочкових бактерій сої як потенційних складових мікробних біологічних препаратів, що надзвичайно важливо у наш час.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Пошук і добір ефективних штамів ризобій сої здійснювали загальноприйнятими

методами аналітичної селекції на ділянці перелогу, що впродовж 30 років не використовувався під вирощування сільськогосподарських культур [4].

Бульбочки на рослинах сої відбирали у фазу цвітіння. Їх стерилізацію та подальшу обробку проводили із застосуванням етилового спирту та засобу Мікробак (BODE Chemie GmbH, Німеччина) [5].

Розтерту масу поверхнево стерилізованих бульбочок сої висівали на манітно-дріжджовий агар (МДА), що має такий склад (г/л): маніт – 8,0; дріжджовий екстракт – 2,0; глюкоза – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; K_2HPO_4 – 0,35; KH_2PO_4 – 0,35; MgSO_4 – 0,2; агар-агар – 20,0; рН 7,2.

Визначення основних культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей ізолятів здійснювали за допомогою експрес-систем для ідентифікації бактерій API[®] (bioMérieux, США) та за ідентифікаційними ознаками визначника Берджі [6, 7]. Морфологію клітин ізолятів вивчали за допомогою світлового мікроскопа фірми ОПТИКА SRL Microscopes-B-383PLi (Італія). Технологічні параметри росту культур бактерій сої визначали за Г.А. Нікітіним [8].

Нітрогеназну активність бульбочок сої визначали за допомогою хроматографа Chrom-4 ацетилен-редуктазним методом

і виражали у кількості мікромолей C_2H_4 , що утворилася з C_2H_2 на 1 рослину за 1 год. Перерахунок здійснювали за калібрувальним графіком, побудованим згідно з розведенням еталону етилену [9].

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили за допомогою стандартних комп'ютерних програм Statistica 10.0, Microsoft Excel 16.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для пошуку нових корисних в агрономічному сенсі ізолятів бульбочкових бактерій упродовж вегетаційного періоду було виділено 34 бактеріальні ізоляти. Проведення морфологічних досліджень колоній та клітин мікроорганізмів, їх забарвлення за Грамом дало змогу поділити бактерії на кілька груп (табл. 1). Серед отриманих ізолятів виявили епіфітні мікроорганізми, швидкорослі та повільнорослі бактерії.

За результатами досліджень 10 ізолятів умовно позначили як SF (12–21). Вони були грамнегативними аеробними паличками, що не формували спор; у 3-добовій культурі визначали рухливі бактерії розміром $2,3\text{--}2,5 \times 0,4\text{--}0,5$ мкм. Мікроорганізми на твердих поживних середовищах МДА та м'ясо-пептонного агару (МПА) утворювали кремово-білі колонії від 1,0 мм до 7 мм у діаметрі, які з часом зливались між собою.

Таблиця 1

Морфолого-культуральна характеристика виділених ізолятів

№	Група бактерій	Присвоєна назва	Фарбування за Грамом	Морфологія колоній, доба появи	Розміри, мкм	Спори	Рухливість
1	<i>Rhizobium</i> (повільнорослі ризобії)	LG 1–11	Грам (–)	Біло-кремові, круглі, 1,0–2,0 мм колонії, рівний край 7–10 доба	$0,5\text{--}0,9 \times 1,2\text{--}3,0$	–	+
2	<i>Rhizobium</i> (швидкорослі ризобії)	SF 12–21	Грам (–)	Біло-прозорі, круглі, 1,0–7,0 мм колонії, рівний край, 3–4 доба	$2,3\text{--}2,5 \times 0,4\text{--}0,5$	–	+
3	<i>Bacillus</i> (епіфітні бактерії)	BP 22–34	Грам (+)	Кремово-рожеві, зморшкуваті, 3,0–20,0 мм, нерівний край, 2 доба	$2,0\text{--}5,0 \times 0,6\text{--}0,8$	+	+

На основі отриманих даних нами було віднесено їх до роду *Ensifer* (*Sinorhizobium*).

Інші 13 ізолятів, що умовно були позначені нами як РР (22–34), було класифіковано як епіфітні бактерії, адже вони є грампозитивними аеробними бактеріями паличкоподібної форми та утворюють ендоспору. Це дало можливість зробити висновок про належність вказаних ізолятів до роду *Bacillus*. Ізоляти SF 12–21 та РР 22–34 ми не використовували у подальших дослідженнях.

Для подальших досліджень нами обрано 11 ізолятів, які за попередньою оцінкою було віднесено до роду *Rhizobium*. Ці ізоляти були грамнегативними, облігатними аеробними паличками та не утворювали спор. У 3-добовій культурі мали рухливі палички розміром $0,5\text{--}0,9 \times 1,2\text{--}3,0$ мкм, на твердому МДА утворювали колонії 2-х типів: біло-кремові – округлі, опуклі, близько 1 мм у діаметрі та білі – слизові, круглі, до 2 мм у діаметрі, що не росли на середовищі МПА.

Під час подальшого вивчення морфологічних ознак ізолятів було зафіксовано, що більша їх частина за наступного пересівання на скошений МДА мала більший розмір, інший колір та з часом набувала здатності зливатися, що не характерно для роду *Bradyrhizobium*. Такі ізоляти були вибракувані та не підлягали наступним біохімічним дослідженням.

Періодичне культивування ізолятів у рідкому МДА засвідчило, що початок експоненційної фази росту культур у ізолятів LG 2 та LG 3 наставав на 66-у год, а LG 5 – на 72-у. Аналіз росту досліджуваних ізолятів дає підстави стверджувати, що оптимальним культивування вказаних бульбочкових бактерій є 90–96-а год, коли спостерігається максимальна чисельність клітин у культуральній рідині (рис.).

Вивчаючи здатність мікроорганізмів метаболізувати вуглецеві сполуки, нами було здійснено порівняння виділених ізолятів з еталоном *Bradyrhizobium japonicum*

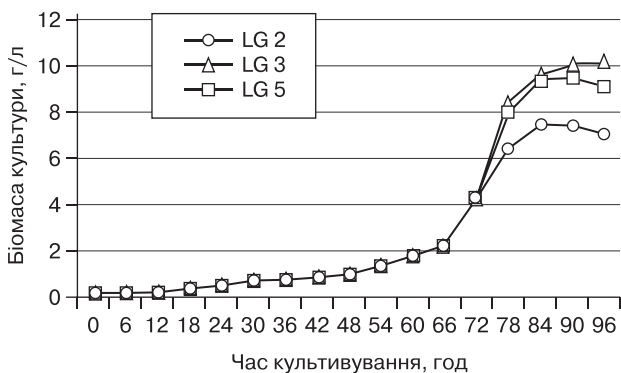
еко/001. Ми дійшли висновку, що ізоляти LG 2, LG 3, LG 5 мали здатність використовувати як субстрат арабінозу, галактозу, глюкозу, рамнозу, сахарозу та маніт, натомість зовсім не використовували сорбіт та інозитол, що є характерним для еталоного штаму. Виділені бактеріальні ізоляти не мали здатності продукувати желатиназу та характеризувалися негативною реакцією Фогес-Проскауера, що є класичною ознакою ризобій [10]. Також було доведено, що ці ізоляти не мали здатності до виділення сірководню та синтезу індолу, а також не утилізували цитрат.

Отже, за результатами аналізу отриманих даних біохімічних тестів та оцінки морфолого-культуральних характеристик три ізоляти (LG 2, LG 3 та LG 5) було віднесено до роду *Bradyrhizobium*.

За інокуляції стерилізованого насіння сої ізолятами утворювали бульбочки на коренях рослин, тому їх умовно віднесли до *B. japonicum*.

Оскільки тестування на ефективність нових ізолятів є обов'язковою умовою перед використанням їх як складової бактеріальних препаратів, нами було закладено вегетаційний дослід. Отримані дані свідчать, що ізоляти можуть формувати симбіотичний апарат і покращувати біометричні показники бактеризованих рослин сої у всіх варіантах досліді (табл. 2).

За дії ізоляту LG 5 утворилася найбільша кількість бульбочок, що перевищило відповідний показник еталоного штаму



Динаміка росту виділених ізолятів

Вплив ізолятів *B. japonicum* на формування симбіотичного апарату та розвиток рослин сої сорту Моравія

Варіант	Висота стебла, см	Маса стебла, г	Довжина кореня, см	Маса кореня, г	Кількість бульбочок, од./рослину	Маса бульбочок, г/рослину
Контроль	15,7±0,36	1,83±0,06	6,5±0,61	0,42±0,03	–	–
Еталон (<i>B. japonicum</i> еко/001)	17,8±0,47	2,02±0,01	8,2±0,56	0,59±0,02	22,5±0,5	0,44±0,05
Ізолят LG 2	18,1±0,23	2,08±0,08	7,7±0,44	0,47±0,01	31,5±0,5	0,62±0,03
Ізолят LG 3	18,3±0,81	2,06±0,04	8,1±0,25	0,56±0,02	20,7±0,4	0,46±0,02
Ізолят LG 5	17,4±0,98	2,11±0,11	8,7±0,53	0,54±0,02	38,6±0,5	0,68±0,02

на 72%, а щодо маси — на 55%. Розвиток рослин у цьому варіанті є оптимальним, адже довжина та маса кореня збільшувалися на 29 та 34% порівняно з контрольним варіантом (без бактеризації); на 6 та на 4%, ніж у варіанті з виробничим штамом *B. japonicum* еко/001, відповідно.

Кількість бульбочок та їх маса за засосування ізоляту LG 2 також у 1,4 раза перевищувала еталонний штам *B. japonicum* еко/001.

Азотфіксувальну активність бульбочок визначали за нітрогеназною активністю. Було встановлено, що два виділені ізоляти, попередньо віднесені до роду *Bradyrhizobium*, характеризувалися високою нітрогеназною активністю, яка навіть дещо перевищувала відповідний показник еталонного штаму — *B. japonicum* еко/001 (табл. 3).

Лише ізолят LG 3 продемонстрував нітрогеназну активність на рівні еталону та становив 1,92 мкмоль C_2H_4 /рослину/год.

Аналізуючи отримані дані зауважимо, що високий азотфіксувальний потенціал мають ізоляти LG 2, LG 3, LG 5 — 1,92–2,18 мкмоль C_2H_4 /рослину/год. Своєю чергою, нітрогеназна активність ізоляту LG 5 була найвищою — перевищувала відповідний показник виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* еко/001 на 14,3%. Активність симбіотичного апарату сої ізоляту LG 2 становила 2,07 мкмоль C_2H_4 /рослину/год, що на 8,6% більше за еталон. На нашу думку, необхідним є подальші випробування ізоляту LG 3, незважаючи на те, що нітрогеназна активність у цьому варіанті перебуває на рівні контролю. Інші ізоляти у ході досліджень мали нижчу нітрогеназну активність.

Таблиця 3

Нітрогеназна активність бульбочок сої

Варіант	Нітрогеназна активність	
	мкмоль C_2H_4 /рослину/год	%
Еталон (<i>B. japonicum</i> еко/001)	1,91±0,04	–
Ізолят LG 2	2,07±0,18	8,6
Ізолят LG 3	1,92±0,31	0,5
Ізолят LG 5	2,18±0,14	14,3

ВИСНОВКИ

Скринінг бульбочкових бактерій сої та їх властивостей надав змогу виділити три нові активні, корисні в агрономічному аспекті ізоляти бульбочкових бактерій (LG 2, LG 3 та LG 5), які після проведення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних тестів було віднесено до роду *Bradyrhizobium*. Характеризуючи отримані дані, можна зробити висновок, що виділені ізоляти LG 2, LG 3 та LG 5 мають високий азотфіксувальний потенціал і покращують біометричні параметри рослин сої.

ЛІТЕРАТУРА

1. Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina / M. Leggett, M. Diaz-Zorita, M. Koivunen et al. // *Agronomy journal*. — 2017. — Vol. 109, Issue 3. — P. 1031–1038.
2. Ковалёв Ю.Н. Кормопроизводство / Ю.Н. Ковалёв. — М.: Академия, 2004. — 240 с.
3. Біологічний азот: монографія / В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін.; за ред. В.П. Патики. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
4. Бегун С.А. Способы, приёмы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции / С.А. Бегун, В.А. Тильба. — Благовещенск: Зея, 2005. — 70 с.
5. Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium) / S.E. De Meyer, B. Vekeman, T. Braeckman et al. // *Soil Biol. Bioch.* — 2011. — Vol. 43, Issue 12. — P. 2384–2396.
6. Возняковская Ю.М. Методические указания по идентификации неспоровых бактерий, доминирующих в ризосфере растений / Ю.М. Возняковская, Ж.И. Попова. — Л.: Наука, 1985. — 48 с.
7. *Brenner Don J.* The Proteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. — 2nd ed. / J. Brenner Don, R. Krieg Noel, T. Staley James. — New York: Springer, 2005. — 1388 p.
8. *Никитин Г.А.* Биохимические основы микробиологических производств / Г.А. Никитин. — К.: Вища школа, 1981. — 112 с.
9. *Hardy R.W.F.* Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation / R.W.F. Hardy, R.C. Burns, R.D. Holsten // *Soil. Biol. Biochem.* — 1973. — Vol. 5, Issue 1. — P. 41–83.
10. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) / F. Shahzad, M. Shafee, F. Abbas et al. // *The Journal of Animal & Plant Sciences*. — 2012. — Vol. 22, Issue 2. — P. 522–524.

REFERENCES

1. Leggett, M., Diaz-Zorita, M., Koivunen, M., Bowman, R., Pesek, R., Stevenson, C., Leister, T. (2017). Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. *Agronomy journal*, 109 (3), 1031–1038 [in English].
2. Kovalev, Iu. N. (2004). *Kormoproizvodstvo [Fodder production]*. Moskva: Akademiia [in Russian].
3. Patyka, V.P., Kots, S.Ya., Volkohon, V.V., Sherstoboieva, O.V. (2003). *Bioloichnyi azot: monografii [Biological nitrogen: monograph]*. Kyiv: Svit [in Ukrainian].
4. Begun, S.A., Tilba, V.A. (2005). *Sposoby, priemy izucheniia i otbora effektivnykh shtammov klubenykovykh bakterii soi. Metody analiticheskoi selekcii [The methods, techniques of study and selection of effective strains of soybean nodule bacteria. Methods of analytical selection]*. Blagoveshchensk: Zeia [in Russian].
5. De Meyer, S.E, Vekeman, B., Braeckman, T., Van Hoorde, K., Willems, A. (2011). Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol. Bioch.*, 43 (12), 2384–2396 [in English].
6. Vozniakovskaia, Iu.M., Popova, Zh.I. (1985). *Metodicheskie ukazaniia po identifikacii nesporovykh bakterii, dominiruiushchikh v rizosfere rastenii [Guidelines for the identification of nonspore bacteria that dominate the plant rhizosphere]*. Leningrad: Nauka [in Russian].
7. Garrity, George M., Brenner, Don J., Krieg, Noel R., Staley, James T. (2005). *The Proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2d ed.). New York: Springer [in English].
8. Nikitin, G.A. (1981). *Biokhimicheskie osnovy mikrobiologicheskikh proizvodst [Biochemical bases of microbiological productions]*. Kiev: Vishcha shkola [in Russian].
9. Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Holsten, R.D. (1973). Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.*, 5 (1), 41–83 [in English].
10. Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M.M., Ahmad, Z. (2012). Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22 (2), 522–524 [in English].