

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛАСТИВОСТЕЙ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ НУТУ, ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ ЛІСОСТЕПОВОЇ ТА СТЕПОВОЇ ЗОН УКРАЇНИ

О. В. Логоша, Ю. О. Воробей, Т. О. Усманова, В. М. Стрекалов

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: olga.logosha94@gmail.com

**Мета.** Дослідити морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні та симбіотичні властивості штамів бульбочкових бактерій нуту, виділених з різних ґрунтово-кліматичних зон України. **Методи.** Мікробіологічні, мікроскопічні, газохроматографічні, статистичні. **Результати.** З бульбочок рослин нуту сортів Скарб, Адмірал, Одисей, Буджак, Тріумф, Пам'ять, вирощених у зоні степу України (Одеська область), де сформувалась активна популяція ризобій завдяки тривалому вирощуванню цієї культури, виділено 58 ізолятів бактерій; 11 ізолятів виділено з бульбочок рослин сортів Тріумф і Пам'ять, відібраних у Лісостеповій зоні (Львівська область) на полях, де нут вирощували вперше. За результатами вегетаційних дослідів для подальшої роботи відібрано 3 штами, що характеризувалися найвищою ефективністю, та за культурально-морфологічними і фізіолого-біохімічними ознаками ідентифіковані як *Mesorhizobium* sp. Штами *Mesorhizobium* sp. 1 та *Mesorhizobium* sp. 2, виділені з бульбочок рослин нуту, вирощених у Степовій зоні на полях з активною популяцією ризобій цієї культури, на бобовому агарі мають помірну швидкість росту. За їх використання для передпосівної бактеризації насіння нуту збільшується маса бульбочок (у 2–3 рази) та нітрогеназна активність (у 1,4–4 рази), порівнюючи з показниками, отриманими за умови застосування референтного штаму *Mesorhizobium ciceri* Н-12. Використання для інокуляції насіння нуту бактерій *Mesorhizobium* sp. 11 (виділених з Лісостепової зони), що характеризувалися швидким ростом на бобовому агарі, сприяло збільшенню кількості бульбочок на коренях рослин (на 40,5 %), їх маси (на 31 %), але підвищення нітрогеназної активності було незначним. **Висновки.** Штами *Mesorhizobium* sp., виділені з бульбочок рослин нуту, вирощених у різних ґрунтово-кліматичних зонах України, мають схожу морфологію клітин, але відрізняються за швидкістю росту, біохімічними та симбіотичними властивостями.

Ключові слова: бобово-ризобіальний симбіоз, бульбочкові бактерії, *Mesorhizobium ciceri*, нут.

**Вступ.** Рослини нуту здатні вступати в симбіотичні взаємовідносини зі специфічними бульбочковими бактеріями *Mesorhizobium ciceri*, унаслідок чого на коренях формуються бульбочки недетермінованого типу. В ґрунтах більшості ґрунтово-кліматичних зон України немає аборигенних бульбочкових бактерій нуту [1], тому для формування та функціонування ефективного бобово-ризобіального симбіозу з метою отримання високих урожаїв цієї культури виникає необхідність передпосівної бактеризації насіння активними та високоефектив-

ними штамами *M. ciceri*.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** У 1994 р. ризобії нуту було описано як *Rhizobium ciceri* французькими вченими С. М. Нур, Д.-К. Клійет-Марел, Ф. Норман-дом та М. П. Фернандес [2]. Через три роки, за даними Б. Д. Джарвіс зі співав. [3] вид *Rhizobium ciceri* віднесено до роду *Mesorhizobium*, представники якого характеризуються середньою швидкістю росту («meso-growers»), на відміну від переважно повільнорослих бактерій («slow-growers») роду *Bradyrhizobium* та швидкорослих («fast-grow-

wers») — роду *Rhizobium*.

До роду *Mesorhizobium* відносять бульбочкові бактерії, які нодулюють нут, лядвенець, акацію, астрагал та деякі інші види рослин [4–6]. Бактерії цього роду відрізняються між собою за швидкістю росту, розміром колоній на агаризованому середовищі та використовують як джерела карбону різні вуглеводні сполуки. Представники роду *Mesorhizobium* грамнегативні, аеробні, спор не утворюють, рухливі, зазвичай з одним полярним або субполярним джгутиком, на агаризованому середовищі утворюють колонії від 1 до 4 мм на 3–7-у добу культивування. Максимальна температура для росту більшості штамів становить 40 °С. Бактерії здатні рости за значень рН від 5,0 до 10,0 [2–4].

За даними низки досліджень, штами ризобій, виділені з бульбочок нуту, можуть відрізнитися між собою за своїми фенотиповими особливостями залежно від місця вирощування [7–11].

**Мета досліджень** — вивчити морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні та симбіотичні властивості штамів бульбочкових бактерій нуту, виділених з бульбочок рослин, що вирощувались у різних ґрунтово-кліматичних зонах України на полях, де вже сформувалась активна популяція ризобій нуту, і ґрунтах, де раніше не вирощували дану культуру.

**Матеріали та методи досліджень.** Морфологічні особливості клітин бактерій визначали за використання світлової (мікроскоп Micros MC 200T) та електронної (Tesla BS 540) мікроскопії. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штамів вивчали згідно із загальноприйнятими мікробіологічними та біохімічними методами [12]. Для порівняння використовували референтні штами *Mesorhizobium ciceri* H-12 [13] та *Mesorhizobium ciceri* 522 [14]. Вирощування та зберігання бульбочкових бактерій нуту здійснювали на бобовому агарі такого складу, г/л:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,2;  $\text{CaCO}_3$  — 1,0; сахароза (цукор) — 10,0; відвар гороху — 1 л (100 г гороху в 1 л води відварюється протягом 40 хв., після чого відвар фільтрується), агар-агар — 10,0 г, рН = 6,8–7,0. Стерилізація середовища — 1,0 атм., 30 хв.

Здатність ризобій нуту асимілювати вуглеводи та засвоювати джерела нітрогену до-

сліджували на мінеральному середовищі Козера [15]. Симбіотичні властивості бактерій вивчали в умовах польових дослідів за відсутності в ґрунті (чорнозем вилугуваний неглибокий легкосуглинковий на лесовидних суглинках, вміст гумусу в орному шарі — 3,6 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) — 210–240 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$ , обмінного калію (за Кірсановим) — 160–170 мг  $\text{K}_2\text{O}$  на 1 кг ґрунту, рН водне — 6,5) аборигенних бульбочкових бактерій нуту. Облікова площа ділянок польових дослідів складала 8 м<sup>2</sup>. Повторність дослідів 4-разова, розміщення варіантів рендомізоване. Попередник — овес ярий. Протруйники та гербіциди не застосовували, бур'яни знищували вручну. Польові досліді проводили за такою схемою:

#### Сорт Скарб:

1. Контроль (без інокуляції насіння).
2. Інокуляція *M. ciceri* H-12 (позитивний контроль).
3. Інокуляція *Mesorhizobium sp.* 1 (штам виділений з бульбочок нуту сорту Скарб).
4. Інокуляція *Mesorhizobium sp.* 2 (штам виділений з бульбочок нуту сорту Пам'ять).

#### Сорт Тріумф:

1. Контроль (без інокуляції насіння).
2. Інокуляція *M. ciceri* H-12 (позитивний контроль).
3. Інокуляція *Mesorhizobium sp.* 2 (штам виділений з бульбочок нуту сорту Пам'ять).
4. Інокуляція *Mesorhizobium sp.* 11 (штам виділений з бульбочок нуту сорту Тріумф).

Для інокуляції насіння нуту використовували бактеріальну суспензію. Культури вирощували на качалці при 220 об./хв. протягом 3 діб. Інокулюм розбавляли стерильною водою для отримання розрахункового титру 10<sup>6</sup> клітин/насінину.

Нітрогеназну активність бульбочок визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яно-іонізаційним детектором [16].

**Результати та їх обговорення.** Протягом 2016–2017 років нами з бульбочок рослин нуту сортів Скарб, Адмірал, Одисей, Буджак, Тріумф, Пам'ять, вирощених у зоні степу України, де в ґрунтах сформувалась активна популяція бульбочкових бактерій цієї культури завдяки тривалому її вирощуванню, виділено 58 ізолятів бактерій [17]. Ще 11 ізолятів виділено з бульбочок рослин сортів Тріумф, Пам'ять, відібраних у лісо-

степовій зоні на полях, де нут вирощували вперше.

Дослідження здатності отриманих ізолятів утворювати бульбочки на коренях нуту в умовах вегетаційних дослідів свідчать, що бактерії, які викликають формування бульбочок, відповідають морфологічним характеристикам роду *Mesorhizobium*. Електронно-мікроскопічні дослідження демонструють подібність морфології бактерій, ізольованих з бульбочок рослин нуту різних сортів, що вирощувались у різних регіонах України.

Клітини аеробні, спор не утворюють, рухливі, паличкоподібної форми (рис. 1, а–в), розмір коливається в межах  $1,0\text{--}2,0 \times 0,3\text{--}0,5$  мкм. За культивування *Mesorhizobium sp. 1* та *Mesorhizobium sp. 2* в рідкому бобовому середовищі бактерії утворюють скупчення

по 2–6 клітин, що досить часто розташовані паралельно (рис. 1, а, б).

За культуральними властивостями всі виділені бактеріальні ізоляти поділено нами на дві групи. Представники першої групи — швидкорослі, на бобовому агарі на 2–3-у добу культивування утворюють відносно великі колонії діаметром 2–4 мм (рис. 2). Представники другої групи характеризуються помірною швидкістю росту — формують на бобовому агарі невеликі колонії (1–2 мм) на 4–7-у добу культивування (рис. 3). Слід зазначити, що значну частину ізолятів, отриманих з регіонів тривалого вирощування нуту, становлять штами з помірною швидкістю росту. Референтні штами *M. ciceri* 522 та *M. ciceri* Н-12 на бобовому агарі також утворюють колонії діаметром 1–3 мм на 5–7-у добу.

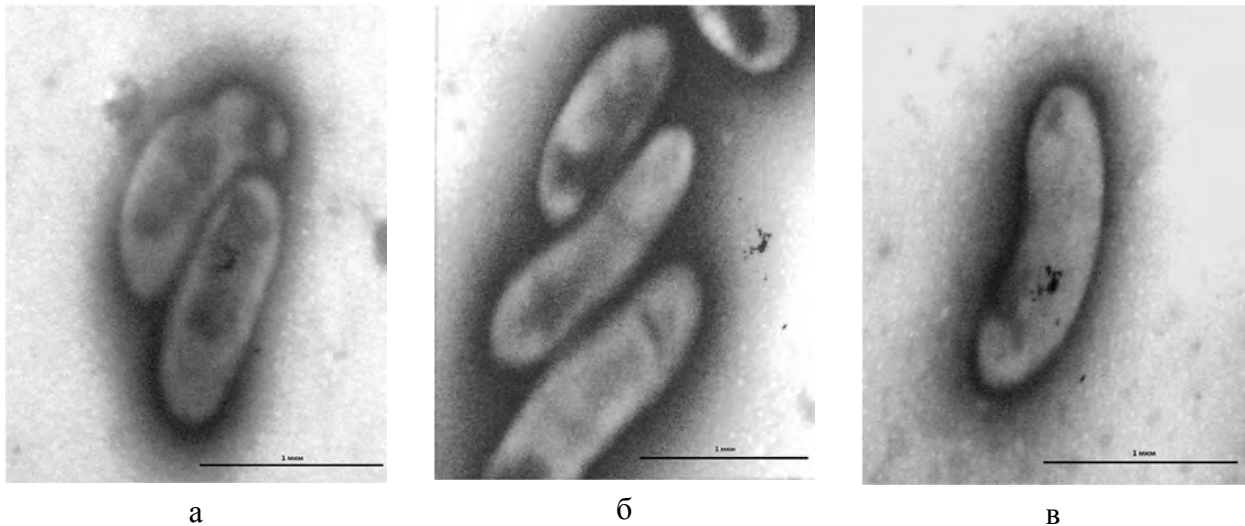


Рис. 1. Морфологія клітин *Mesorhizobium sp. 1* (а, б) та *Mesorhizobium sp. 2* (в) (за збільшення в 16 000 разів).



Рис. 2. Колонії *Mesorhizobium sp. 11* на 3-у добу культивування.

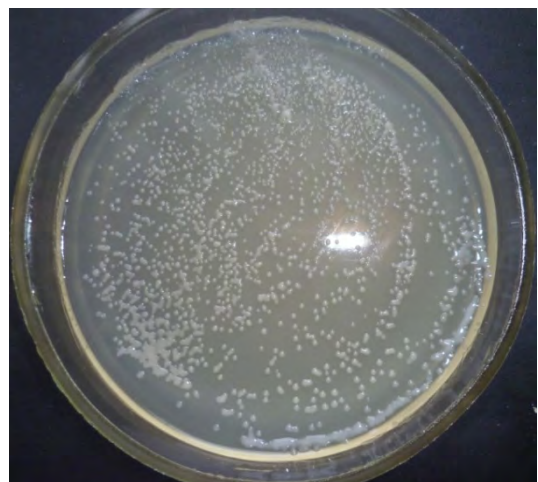


Рис. 3. Колонії *Mesorhizobium sp. 2* на 6-у добу культивування.

Швидкорослі бактерії за культивування на знежиреному стерильному молоці з лакмусом на 7-у добу підкислюють середовище, штами з помірною швидкістю росту на 7-у добу забезпечують незначне підлугування середовища, а після 20 діб культивування — підкислюють його. Встановлено, що всі швидкорослі штами характеризуються рясним ростом на МПА, а штами з помірною швидкістю росту на МПА не ростуть або мають слабкий ріст.

У подальшій роботі дослідження проводили із штамами *Mesorhizobium sp. 1* та *Mesorhizobium sp. 2*, виділеними з корневих бульбочок рослин сортів нуту Скарб та Пам'ять, що вирощувались у південному регіоні країни, а також зі штамом *Mesorhizobium sp. 11*, виділеним з бульбочок рослин сорту Тріумф (відібраних на полях, де нут вирощували вперше).

Зазначені штами характеризувалися найбільшим впливом на приріст кількості бульбочок, вегетативної маси та коренів у вегетаційних дослідах [17].

За вирощування на бобовому агарі штами *Mesorhizobium sp. 1* і *Mesorhizobium sp. 2* характеризуються помірним ростом, бульбочкові бактерії *Mesorhizobium sp. 11* відносяться до швидкорослих штамів.

Встановлено, що всі досліджувані штами активно ростуть на середовищі Козера та засвоюють L-арабінозу, рамнозу, мальтозу, сахарозу, глюкозу, ксилозу, лактозу, продукуючи кислоту (табл. 1).

Нові штами *Mesorhizobium sp. 1* і *Mesorhizobium sp. 2*, як і референтні *M. ciceri* Н-12 та *M. ciceri* 522, не змінюють реакцію середовища з дульцитом, помірно підкислюють середовище з манітом та сорбітом. Бактерії *Mesorhizobium sp. 11* не використовують як джерело вуглецю D-арабінозу і сорбіт, але засвоюють маніт та дульцит, продукуючи кислоту.

В умовах лабораторних дослідів на мінеральному середовищі Козера визначали здатність бульбочкових бактерій роду *Mesorhizobium* використовувати різні джерела нітрогену. Показано, що штами *Mesorhizobium sp. 1* і *Mesorhizobium sp. 2* характеризуються помірним ростом на середовищі з амонієм молібденокислим та сірчаноокислим, а *Mesorhizobium sp. 11* має рясний ріст на середовищах з амонієм фосфорнокислим та молібденокислим (табл. 2).

Вивчення симбіотичних властивостей штамів роду *Mesorhizobium* проводили в умовах польового досліді на чорноземі вилугуваному. Слід зазначити, що на коренях

Таблиця 1. Використання джерел карбону представниками роду *Mesorhizobium*

Вуглеводи	<i>M. ciceri</i> 522	<i>M. ciceri</i> Н-12	<i>Mesorhizobium</i> <i>sp. 1</i>	<i>Mesorhizobium</i> <i>sp. 2</i>	<i>Mesorhizobium</i> <i>sp. 11</i>
Контроль (без вуглеводів)	н	н	н	н	н
L-арабіноза	к	к	к	к	к
D-арабіноза	к	к	к	к	н
Рамноза	к	к	к	к	к
Мальтоза	к	к	к	к	к
Дульцит	н	н	н	н	к
Сахароза	к	к	к	к	к
Глюкоза	к	к	к	к	к
Ксилоза	к	к	к	к	к
Лактоза	к	к	к	к	к
Маніт	п/к	п/к	п/к	п/к	к
Сорбіт	п/к	п/к	п/к	п/к	н

Примітка: к — підкислюють середовище; п/к — помірно підкислюють середовище; н — не змінюють рН середовища.

Таблиця 2. Використання нітрогену штамами *Mesorhizobium sp.*

Джерела нітрогену		<i>M. ciceri</i> 522	<i>M. ciceri</i> Н-12	<i>Mesorhizobium</i> sp. 1	<i>Mesorhizobium</i> sp. 2	<i>Mesorhizobium</i> sp. 11
Аспарагін	Ріст	помірний	помірний	слабкий	слабкий	помірний
	ЕПС	++	++	+++	+++	+++
Сечовина	Ріст	слабкий	слабкий	слабкий	слабкий	слабкий
	ЕПС	+	+	+	+	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Ріст	помірний	помірний	слабкий	слабкий	рясний
	ЕПС	+	+	++	++	+++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub>	Ріст	слабкий	слабкий	помірний	помірний	рясний
	ЕПС	+	+	+	+	+
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	Ріст	слабкий	помірний	помірний	помірний	помірний
	ЕПС	++	+	+	++	+
NH <sub>4</sub> Cl	Ріст	слабкий	слабкий	слабкий	слабкий	помірний
	ЕПС	+	+	+	+	+
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ріст	слабкий	слабкий	слабкий	слабкий	слабкий
	ЕПС	+++	++	++	++	+
NaNO <sub>3</sub>	Ріст	помірний	помірний	слабкий	слабкий	слабкий
	ЕПС	+	+	++	++	++

Примітка: +++ — інтенсивне продукування екзополісахаридів (ЕПС); ++ — помірне продукування ЕПС; + — незначне продукування ЕПС.

нуту всіх досліджуваних нами сортів у контрольному варіанті бульбочок не виявлено. Це підтверджує дані С. В. Дідович та М. З. Толкачова [1] про відсутність бульбочкових бактерій нуту в зонах, де раніше не вирощували цю культуру.

Інокуляція насіння нуту сорту Скарб штамами *Mesorhizobium sp.* 1 та *Mesorhizobium sp.* 2, які характеризуються помірною швидкістю росту, сприяла збільшенню маси бульбочок на коренях нуту у 2–3 рази відповідно, якщо порівняти з інокуляцією виробничим штамом *M. ciceri* Н-12 (табл. 3). Кількість бульбочок за інокуляції *Mesorhizobium sp.* 1 зростала на 14 %, нітрогеназна активність — на 38 %. У варіанті з *Mesorhizobium sp.* 2 кількість бульбочок була на 77 % більшою за показник позитивного контролю, а нітрогеназна активність підвищилася в 2 рази.

За інокуляції насіння нуту сорту Тріумф штамом *Mesorhizobium sp.* 2 кількість бульбочок зростала на 57 %, їх маса збільшувалась у 2 рази проти позитивного контролю. За інокуляції штамом *Mesorhizobium sp.* 11, виділеним з Лісостепової зони, кількість бульбочок зростала на 40,5 %, їх маса на 31 % щодо показників позитивного контролю.

Проте нітрогеназна активність бульбочок за інокуляції штамом *Mesorhizobium sp.* 2 збільшувалась в 4 рази, а за бактеризації штамом *Mesorhizobium sp.* 11 — лише на 8 % перевищувала позитивний контроль. Показано, що найбільш ефективним мікросимбіонтом до сортів Скарб та Тріумф виявився штам *Mesorhizobium sp.* 2, виділений з бульбочок сорту Пам'ять.

Отже, у результаті проведених досліджень показано, що штами *Mesorhizobium sp.*, виділені з бульбочок рослин нуту, вирощених у різних ґрунтово-кліматичних зонах України, мають схожу морфологію клітин, але відрізняються за швидкістю росту, культуральними, фізіолого-біохімічними та симбіотичними властивостями. Інокуляція насіння штамом *Mesorhizobium sp.* 11, виділеним у Лісостеповій зоні, сприяла збільшенню кількості бульбочок на коренях рослин (на 40,5 %), їх маси (на 31 %), але нітрогеназна активність була на рівні позитивного контролю. Встановлено, що штами *Mesorhizobium sp.* 1 та *Mesorhizobium sp.* 2, що виділені з бульбочок рослин нуту, вирощених у Степовій зоні на полях з щільною популяцією ризобій цієї культури, сприяють значному

Таблиця 3. Симбіотичні властивості нових штамів бульбочкових бактерій нуту в умовах польового досліду (2018 р.)

Сорт	Варіанти досліду	Середня кількість бульбочок, од./рослину	Середня маса бульбочок, мг/рослину	Нітрогеназна активність, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / рослину за годину
Скарб	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	13,2 ± 1,1	215,0 ± 5,0	266,0 ± 26,0
	Інокуляція <i>Mesorhizobium sp.</i> 1	15,1 ± 2,1	435,0 ± 32,5	369,0 ± 25,0
	Інокуляція <i>Mesorhizobium sp.</i> 2	<b>23,3 ± 2,1</b>	<b>636,0 ± 30,0</b>	<b>541,0 ± 19,0</b>
Тріумф	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	9,2 ± 0,3	381,0 ± 37,0	284,0 ± 16,0
	Інокуляція <i>Mesorhizobium sp.</i> 2	<b>14,5 ± 0,3</b>	<b>853,0 ± 37,0</b>	<b>1128,0 ± 58,0</b>
	Інокуляція <i>Mesorhizobium sp.</i> 11	13,0 ± 0,9	501,0 ± 8,0	310,0 ± 18,0

збільшенню маси бульбочок (у 2–3 рази) та їх нітрогеназної активності (в 1,4–4 рази) проти референтного штаму.

**Висновки.** Штами *Mesorhizobium sp.*, виділені з бульбочок рослин нуту, вирощених у різних ґрунтово-кліматичних зонах України, мають схожу морфологію клітин, але відрізняються за швидкістю росту, культуральними, фізіолого-біохімічними та симбіотичними властивостями.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Дідович С. В., Толкачов М. З., Бутвіна О. Ю. Ефективність симбіотичної азотфіксації в агроценозах України. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2008. Вип. 8. С. 117–125.
2. Nour S. M., Fernandez M. P., Normand Ph., Cleyet-Marel J.-C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994. Vol. 44(3). P. 511–522. <http://doi.org/10.1099/00207713-44-3-511>
3. Jarvis B. D. W., Van Berkum P., Chen W. X., Nour S. M., Fernandez M. P., Cleyet-Marel J.-C., Gillis M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997. Vol. 47. P. 895–898. <http://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>
4. Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Springer. 2005. 1415 p.

<https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5>

5. Rivas R., García-Fraile P., Velázquez E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*. 2009. Vol. 2. P. 51–69. <https://doi.org/10.4137/MBI.S3137>
6. Andrews M., Andrews M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol.18, № 4, p. 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
7. Maatallah J., Berraho E. B., Munoz S., Sanjuan J., Lluch C. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology*. 2002. Vol. 93(4). P. 531–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01718.x>
8. L'taief B., Sifi B., Gtari M., Zaman-Allah M., Lachaal M. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*. 2007. Vol. 53(3). P. 427–434. <https://doi.org/10.1139/w06-127>
9. Rai R., Dash P. K., Mohapatra T., Singh A. Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2012. Vol. 50. P. 340–350.
10. Tena W., Wolde-Meskel E., Degefu T., Walley, F. Genetic and phenotypic diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in soils from southern and central Ethiopia. *Canadian Journal of Microbiology*. 2017. Vol. 63(8). P. 690–707. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0776>
11. Mahmoud M. A., Mart D., Can C. Phenotypic characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in Turkey reveals high diversity. *Legume Research*. 2018. Vol. 42. P. 379–384.

<https://doi.org/10.18805/LR-430>

12. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф. Герхарда. М. : Мир, 1984. Т. 2. 486 с.

13. Штам бульбочковых бактерий *Mesorhizobium ciceri* H-12, активный симбиотичный азотфиксатор, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує врожайність нуту: пат. 17664 Україна. МПК C12N1/00, C12P1/04, М. З. Толкачов, С. В. Дідович, І. О. Каменева; заявник і патентовласник: Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН; заявл. 13.03.06; опубл. 16.10.06, Бюл. № 10.

14. Штам клубеньковых бактерий *Rhizobium spp (cicer)* 522 — активный симбиотический азотфиксатор: а. с. 1128545 СРСР, МПК C05F 11/08, А. Т. Новикова, Л. М. Доросинский, Н. М. Лазарева, В. Л. Князева, А. И. Позднякова.

№3632157/30-15; заявл. 09.08.83; опубл. 30.05.85, Бюл. № 20.

15. Методи культивування та тривалого зберігання бульбочкових бактерій у колекціях : методичні рекомендації. Чернігів : ІСМАВ НААН, 2015. 36 с.

16. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 1968. Vol. 43, No. 8. P. 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>

17. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Романова І. М., Усманова Т. О., Бушулян О. В. Новий штам *Mesorhizobium sp. 1* та його вплив на структурні показники врожаю нуту сорту Скарб. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2018. Вип. 27. С. 40–44.

Отримано 13.03.2019

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.21-28>

UDC 579.64:602.3:631.847.211:635.657

## CHARACTERISTICS OF THE PROPERTIES OF CHICKPEA NODULE BACTERIA EXTENDED IN THE FOREST-STEPPE AND STEPPE ZONES UKRAINE

O. V. Lohosha, Yu. O. Vorobey, T. O. Usmanova, V. M. Strekalov

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv  
e-mail: olga.logosha94@gmail.com

**Objective.** To compare morphological, cultural, physiological, biochemical, and symbiotic properties of strains of nodule chickpea bacteria isolated from different soil and climatic zones of Ukraine. **Methods.** Microbiological, microscopic, gas-chromatographic, statistical. **Results.** From the nodules of chickpea plant of varieties Skarb, Admiral, Odisei, Budzhak, Triumph and Pamiat, grown in the steppe zone of Ukraine (Region of Odessa), where an active rhizobia population was formed due to the continuous cultivation of this crop, 58 isolates of bacteria were isolated; 11 isolates were isolated from the nodules of plants of Triumph and Pamiat varieties selected in the forest-steppe zone (Region of Lviv), in the fields where chickpea was grown for the first time. It has been established that the strains of *Mesorhizobium sp. 1* and *Mesorhizobium sp. 2*, which were isolated from the nodules of chickpea plants grown in the fields with an active rhizobia population of this culture, form colonies of 2–4 mm in size at day 3–4 on the mannitol yeast agar and, according to cultural and morphological properties correspond to the characteristics of the species *Mesorhizobium ciceri*. Their use for pre-sowing chickpea inoculation increases the mass of nodules (2–3 times) and nitrogenase activity (1.4–2 times) compared with the results obtained using the production strain of *Mesorhizobium ciceri* H-12. Inoculation with *Mesorhizobium sp. 11*, isolated from the forest-steppe zone, which on a mannitol yeast agar forms a colony of 1–2 mm in size at day 5–6, contributed to a significant increase in the number of nodules on the roots of plants (by 40.5 %), their mass (by 31 %), but the increase in nitrogenase activity was negligible. **Conclusion.** Strains of *Mesorhizobium sp.* isolated from chickpea nodules grown in different soil-climatic zones of Ukraine, have similar cell morphology, but differ in growth rate, cultural, physiological, biochemical, and symbiotic properties.

Key words: legume-rhizobial symbiosis, nodule bacteria, *Mesorhizobium ciceri*, chickpeas.

## REFERENCES

1. Didovich, S. V., Tolkachov, M. Z., & Butvina, O. Ju. (2008). Efektyvnist' symbiotychnoi' azotfiktsacii' v agrocenozah Ukrai'ny [The efficiency of symbiotic nitrogen fixation in the agrocenosis of Ukraine]. *Silskogospodarska mikrobiologia — Agricultural Microbiology*, 8, 117–125 [in Ukrainian].
2. Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, Ph., & Cleyet-Marel, J.-C. (1994). Rhizobium ciceri sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 511–522. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-511>
3. Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J.-C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 895–898. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>
4. Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Vol. 2. The Proteobacteria. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5>
5. Rivas, R., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2009). Taxonomy of bacteria nodulating legumes. *Microbiology Insights*, 2, 51–69. <https://doi.org/10.4137/MBI.S3137>
6. Andrews, M., & Andrews, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. (2017). *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
7. Maatallah, J., Berraho, E. B., Munoz, S., Sanjuan, J., & Lluch C. (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 531–540. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01718.x>
8. L'taief, B., Sifi, B., Gtari, M., Zaman-Allah, M., & Lachaal, M. (2007). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(3), 427–434. <https://doi.org/10.1139/w06-127>
9. Rai, R., Dash, P. K., Mohapatra, T., & Singh, A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in India. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50, 340–350.
10. Tena, W., Wolde-Meskel, E., Degefu, T., & Walley, F. (2017). Genetic and phenotypic diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) in soils from southern and central Ethiopia. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(8), 690–707. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0776>
11. Mahmoud, M. A., Mart, D., & Can, C. (2018). Phenotypic characterization of indigenous rhizobia nodulating chickpea in Turkey reveals high diversity. *Legume Research*, 42, 379–384. <https://doi.org/10.18805/LR-430>
12. Gerhard, F. (Ed.). (1984). *Metody obshej bakteriologii* [Methods of general bacteriology]. Moskva: Mir, Vol. 2 [in Russian].
13. Pat. 17664 UA, МПК C12N1/00, C12P1/04. Strain of legume bacterium *Mesorhizobium ciceri* h-12, active symbiotic nitrogen fixer used for preparing bacterial preparation enhancing the yield of chick pea. Tolkachov, M. Z., Didovich, S. V., Kamenjeva, I. O., Publ. 16.10.2006 [in Ukrainian].
14. A. s. 1128545 USSR, МПК C05F 11/08. The strain of nodule bacteria *Rhizobium* spp (*cicer*) 522 — active symbiotic nitrogen fixer. Novikova, A. T., Dorosinskij, L. M., Lazareva, N. M., Knjazeva, V. L., Pozdnjakova, A. I. Publ. 30.05.1985 [in Russian].
15. *Metody kul'tyvuvannja ta tryvaloogo zberigannja bul'bochkovyh bakterij u kolekcijah: metodychni rekomendacii'* [Methods of cultivation and long-term storage of nodule bacteria in collections: guidelines]. (2015). Chernigiv: IAMAM NAAS [in Ukrainian].
16. Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(8), 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
17. Logosha, O. V., Vorobej, Ju. O., Romanova, I. M., Usmanova, T. O., & Bushuljan, O. V. (2018). Novyj shtam *Mesorhizobium* sp. 1 ta jogo vplyv na strukturni pokaznyky vrozhanu nutu sortu Skarb [New *Mesorhizobium* sp. 1 strain and its influence on the structural parameters of yield of chickpea of variety Skarb]. *Silskogospodarska mikrobiologia — Agricultural Microbiology*, 27, 40–44 [in Ukrainian].

Received 13.03.2019