

УДК 581.1:576.851.155

## ЕФЕКТИВНІСТЬ, КОНКУРЕНТОСПРОМОЖНІСТЬ І ТЕХНОЛОГІЧНІСТЬ НОВИХ АНАЛІТИЧНО СЕЛЕКЦІОНОВАНИХ ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ

С.М. МАЛІЧЕНКО, С.В. ОМЕЛЬЧУК, П.М. МАМЕНКО, С.Я. КОЦЬ

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Досліджено можливість використання непрямого методу визначення відносної конкурентоспроможності активних штамів *Bradyrhizobium japonicum* за масою сухих рослин за змішаної інокуляції активним і висококонкурентним, але неактивним штамми. Встановлено, що всі проаналізовані штами висококонкурентоспроможні, а саме від 73 до 95 %, тобто на рівні штаму-стандарту 6346. Разом із високими ефективністю, конкурентоспроможністю нові аналітично селекціоновані штами характеризуються високою технологічністю, добре розмножуються і зберігаються на твердому носії, що задовольняє вимоги до виготовлення біопрепаратів.

*Ключові слова:* бульбочкові бактерії, конкурентоспроможність, технологічність.

Відомо, що конкурентоспроможність ризобій разом із азотфіксувальною активністю і вірулентністю визначають ефективність симбіозу бобових рослин і бульбочкових бактерій [2, 6, 10, 12, 18]. Тому важливо, щоб нові селекціоновані штами ризобій, які використовуються для виготовлення бактеріальних добрив, характеризувалися високою азотфіксувальною здатністю й були достатньо конкурентоспроможними, тобто мали перевагу за даним показником над місцевими популяціями цих бактерій, які є в ґрунті. У ризобій визначають різні типи конкурентоспроможності: нодуляційну, ризосферну і сапрофітну. В одного й того самого штаму прояв типів конкурентоспроможності може бути різним [11].

Взаємодія між штамми в боротьбі за проникнення в корені бобової рослини й утворення бульбочок є складним комплексом зв'язків, які залежать від біологічних особливостей штаму, генотипу рослини-хазяїна, достатнього інфекційного навантаження, способу внесення інокулюма та виживаності в ґрунті — сапрофітної конкурентоспроможності.

Чимало авторів вважають, що така властивість, як конкурентоспроможність ризобій, детермінована в бактеріях і за оптимальних умов є одним із важливих чинників конкурентних взаємовідносин штамів під час формування бульбочок. Крім того, вона визначається генетичною сумісністю партнерів симбіозу [10, 11, 20]. Отже, конкурентоспроможність з одного боку пов'язана з біологічними властивостями бульбочкових бактерій, з іншого — з вибірковістю макросимбіонта [11].

Для визначення конкурентоспроможності бульбочкових бактерій здебільшого застосовують прямі методи. Найпоширеніший із них серологічний [13], що дає змогу ідентифікувати штами ризобій за антиген-

ним складом, а також резистентний, основою якого є мітка на підвищену стійкість до антибіотиків [8, 9]. Обидва методи мають певні обмеження. Зокрема, обмежувальним чинником резистентного методу є можлива зміна симбіотичних характеристик у деякої частини утворених спонтанних мутантів, стійких до антибіотиків [5].

Стосовно серологічного методу слід зазначити, що близький антигенний склад бульбочкових бактерій одного й того самого виду не завжди дає змогу достеменно ідентифікувати, який саме штам утворив бульбочки [13]. Наприклад, він непридатний для дослідження конкурентоспроможності повільнорослих ризобій люпину і сої, оскільки природні раси цих бактерій мають близький антигенний склад і він ще не достатньо добре вивчений. У зв'язку з цим для встановлення конкурентоспроможності окремих штамів ризобій цілком прийнятним може бути запропонований Лагашері та співавт. [19] непрямий метод, який полягає в інокуляції бобових культур сумішшю активного й неактивного, але висококонкурентного штаму ризобій. Критерієм оцінки при цьому є приріст вегетативної маси рослин, прямо пропорційно пов'язаний з кількістю бульбочок, утворених активним штамом. У науковій літературі є посилання на праці, в яких застосовано непрямий метод визначення конкурентоспроможності ризобій люпину [8], гороху [1], кормових бобів [12], люцерни [3].

Нині добре відомо, що обов'язковим агроприйомом у технологіях вирощування бобових має бути передпосівна обробка насіння біопрепаратами на основі селекційних штамів специфічних бульбочкових бактерій, яка підвищує азотфіксувальний потенціал бобово-ризобіального симбіозу. Існують загальні вимоги щодо створення бактеріальних добрив на основі високоактивних штамів мікроорганізмів. Зокрема, це встановлення їх технологічності, тобто здатності накопичувати високий титр клітин у стандартних і виробничих поживних середовищах, субстратах [15]. Отже, однією з умов ефективності біопрепаратів є висока функціональна ефективність, конкурентоспроможність і технологічність бульбочкових бактерій, які використовують під час їх виготовлення.

Метою наших досліджень було встановлення можливості використання непрямого методу визначення конкурентоспроможності та оцінка технологічності нових аналітично селекціонованих культур *Bradyrhizobium japonicum* із високою азотфіксувальною активністю, які в разі позитивних результатів можуть бути застосовані під час виготовлення бактеріальних добрив під сою.

## Методика

Конкурентну спроможність аналітично селекціонованих штамів *B. japonicum* визначали в умовах вегетаційного досліду, який проводили на промитому річковому піску в пластикових посудинах (3,5 кг субстрату). У субстрат вносили поживну суміш Гельригеля, збіднену на азот (0,2 норми). У кожній із посудин вирощували по 4 рослини до початку цвітіння. Повторність досліду — десятиразова. Насіння сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Мар'яна перед посівом стерилізували 16,5 %-м розчином перексиду водню, після чого промивали під проточною водою. Об'єктами досліджень були чотири нові аналітично селекціоновані нами штами *B. japonicum*: PC1-07, PC2-07, PC-08 і PC-09, що мали високу азотфіксувальну активність [7].

Для створення модельної конкуренції насіння після стерилізації інокулювали кожним штамом окремо (моноінокуляція) або сумішшю двох штамів — активного і неактивного (змішана інокуляція). Як неактивний був використаний наданий нам М.З. Толкачевим штам *B. japonicum* 604к, який має високу конкурентоспроможність і утворює неактивні бульбочки [14]. За моноінокуляції суспензія бактерій містила  $10^7$  клітин в 1 мл, за змішаної інокуляції кількість бактерій активного штаму залишали такою ж, а неактивного брали  $10^{10}$  клітин в 1 мл; при цьому створювалось співвідношення штамів 1 : 1000. Контролем слугували варіант із неінокульованими рослинами та рослини, інокульовані неактивним 604к штамом. Азотфіксувальну активність визначали ацетиленовим методом [17].

Конкурентоспроможність нових аналітично селекціонованих культур ризобій сої встановлювали непрямим методом за різницею накопичення маси рослинами за моно- та змішаної інокуляції, розраховували за формулою Амаргер [16]. Кількість клітин бактерій в 1 мл середовища або в 1 г препарату при встановленні їх технологічності визначали методом граничних розбавлень і подальшим висіванням у чашки Петрі з манітно-дріжджовим агаризованим середовищем.

Результати експерименту оброблено за Доспеховим [4] із використанням програми Excel.

### Результати та обговорення

Для встановлення конкурентоспроможності ризобій сої в умовах вегетаційного дослідження визначали надземну масу рослин за моноінокуляції активним штамом (шт<sup>+</sup>) та за змішаної інокуляції активним і неактивним штамми (шт<sup>+</sup>+шт<sup>-</sup>). Крім того, аналізували нітрогеназну активність утворених за такої інокуляції бульбочок та вивчали вплив змішаної інокуляції на масу і кількість останніх.

Дані табл. 1 свідчать, що за моно- і змішаної інокуляції кількості утворених на рослині бульбочок значно відрізнялись. Неактивний штам *B. japonicum* 604к утворював значно більшу кількість невеликих за

ТАБЛИЦЯ 1. Формування симбіозу за моно- та змішаної інокуляції сої активним і неактивним штамми *Bradyrhizobium japonicum*

Інокулянт	Кількість бульбочок, шт/рослину	Маса бульбочок, г/рослину
Контроль (без інокуляції)	0	0
634б	62±10	0,862±0,063
604к	214±53	0,445±0,056
634б+604к	277±20	0,902±0,046
РС1-07	60±5	0,722±0,075
РС1-07+604к	298±57	0,942±0,103
РС2-07	75±12	0,794±0,076
РС2-07+604к	150±22	0,860±0,120
РС-08	57±7	0,784±0,086
РС-08+604к	165±14	0,826±0,029
РС-09	119±24	0,606±0,091
РС-09+604к	176±19	0,948±0,075

розміром бульбочок порівняно з активними штамами. За змішаної інокуляції він істотно впливав на кількість бульбочок, характер їх розміщення та розмір. Так, за змішаної інокуляції кількість бульбочок майже в усіх варіантах була більшою у 2–5 разів (див. табл. 1), ніж за моноінокуляції, тоді як їх маса збільшувалась лише на 5–56 %. Порівняно з варіантами інокуляції лише одним активним штамом при застосуванні змішаної інокуляції значна частина бульбочок утворювалась не на головному корені, а на бічних, і ці бульбочки були меншого розміру, що й спричинило невелике збільшення маси за значного зростання загальної їх кількості у цих варіантах.

Відмінність в інтенсивності азотфіксації сої (табл. 2) залежно від умов інокуляції вказує на те, що бульбочкові бактерії неактивного, але висококонкурентного штаму 604к (шт<sup>-</sup>) частково витіснили ризобії активних штамів за змішаної інокуляції (шт<sup>+</sup>+шт<sup>-</sup>), утворивши певну кількість неактивних бульбочок, які практично не фіксують молекулярний азот, що призвело до зменшення наростання вегетативної маси рослин (табл. 3, рисунок). Отже, маса сухих рослин за змішаної інокуляції активним і неактивним штамами (шт<sup>+</sup>+шт<sup>-</sup>) відтворює рівень їх відносної конкурентоспроможності. Ця закономірність виражається формулою [16]

$$K_3 (\text{відн. \%}) = \frac{\text{приріст маси (шт}^+\text{+шт}^-)}{\text{приріст маси (шт}^+)} \cdot 100.$$

Отже, непрямим методом ми визначали відносну конкурентоспроможність чотирьох штамів бульбочкових бактерій сої (див. табл. 3). Усі вони виявились висококонкурентоспроможними. Найбільш конкурентоспроможними були культури *B. japonicum* PC1-07 — 94 % та PC2-07 — 95 %.

Отримані нами результати підтвердили надійність методу визначення відносної конкурентоспроможності *B. japonicum* за масою сухих рослин при змішаній інокуляції активним і неактивним штамами і можливість застосування непрямого методу для визначення цієї характеристики активних штамів ризобій сої. Метод може бути успішно застосований у селекційній роботі з новими штамами ризобій.

Як уже зазначалось, кожен штам, який використовують під час створення бактеріальних препаратів, потребує певних індивідуальних технологічних підходів. Однак існують і загальні вимоги щодо виготов-

ТАБЛИЦЯ 2. Ацетиленвідновлювальна активність (АВА) сої за моно- та змішаної інокуляції сої активним і неактивним штамами *Bradyrhizobium japonicum*

Інокулянт	АВА, мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(рослину·год)
634б	4,88±0,24
604к	0,12±0,05
634б+604к	3,82±0,45
PC1-07	5,27±0,18
PC1-07+604к	2,56±0,29
PC2-07	4,47±0,41
PC2-07+604к	2,40±0,23
PC-08	4,42±0,41
PC-08+604к	3,63±0,24
PC-09	5,11±0,86
PC-09+604к	3,11±0,97

ЭФФЕКТИВНОСТЬ, КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТЬ И ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ

ТАБЛИЦЯ 3. Наростання вегетативної маси рослин і визначення відносної конкурентоспроможності за моно- та змішаної інокуляції сої активним і неактивним штамами *Bradyrhizobium japonicum*

Інокулянт	Маса сухих рослин, г/посудину	Приріст маси сухих рослин від інокуляції, г/посудину		Відносна конкурентоспроможність, %
		шт <sup>+</sup>	шт <sup>+</sup> +шт <sup>-</sup>	
Контроль (без інокуляції)	7,8±0,40			
634б	12,04±0,64	4,24		82
634б+604к	11,28±0,52		3,48	
РС1-07	12,84±0,76	5,04		94
РС1-07+604к	12,52±0,64		4,72	
РС2-07	11,96±0,40	4,16		95
РС2-07+604к	11,76±0,56		3,96	
РС-08	10,24±0,80	2,44		79
РС-08+604к	9,72±0,40		1,92	
РС-09	10,20±0,32	2,40		73
РС-09+604к	9,56±0,44		1,76	



а



б



в



г

Вплив моно- та змішаної інокуляції штамами *B. japonicum* на наростання вегетативної маси сої:  
 а – 37 – активний штам РС1-07; 21 – неактивний штам 604к; 84 – суміш РС1-07+604к; б – 48 – активний штам РС2-07; 21 – неактивний штам 604к; 98 – суміш РС2-07+604к; в – 51 – активний штам РС-08; 21 – неактивний штам 604к; 110 – суміш РС-08+604к; г – 62 – активний штам РС-09; 21 – неактивний штам 604к; 112 – суміш РС-09+604к

ТАБЛИЦЯ 4. Інтенсивність росту *Bradyrhizobium japonicum* на середовищах із різними джерелами азоту і вуглеводів

Культура	Поживне середовище	Тривалість інкубації, доба		
		1	3	7
		КУО/мл		
		$\times 10^7$	$\times 10^9$	$\times 10^{12}$
6346	МД	240±8	261±18	10±19
	КМ	104±8	134±10	22±3
РС1-07	МД	93±4	121±15	35±5
	КМ	98±10	296±22	30±5
РС2-07	МД	168±3	205±25	36±3
	КМ	23±2	64±4	16±1
РС-08	МД	115±3	159±5	37±6
	КМ	62±9	132±8	32±4

П р и м і т к а. МД — манітно-дріжджове середовище; КМ — кукурудзяно-мелясне середовище; КУО — колонієутворювальні одиниці.

ТАБЛИЦЯ 5. Життєздатність у вермикультурному препараті аналітично селекціонованих ризобій сої залежно від терміну зберігання, КУО млрд/г

Варіант	Термін зберігання, доба		
	1	10	40
6346	0,10±0,002	7,8±0,09	32,5±1,5
РС1-07	0,20±0,009	6,0±0,07	38,5±3,0
РС2-07	0,80±0,03	7,7±0,4	90,5±9,0
РС-08	0,15±0,008	8,9±0,3	46,7±4,2

лення біопрепаратів, тому першим етапом створення препаратів на основі високоактивних штамів мікроорганізмів є визначення технологічності цих штамів, тобто здатності накопичувати високий титр у стандартних виробничих середовищах і поживному субстраті.

Дані табл. 4 ілюструють інтенсивність росту бульбочкових бактерій сої на манітно-дріжджовому (МД) середовищі та дешевшому кукурудзяно-мелясовому (КМ), яке використовують у виробничих умовах для виготовлення ризобіофіту. Від здатності ризобій за короткий термін інкубації формувати високий титр клітин на дешевшому середовищі залежить їх технологічність. З отриманих результатів видно, що всі використані в досліді культури — і штам-стандарт 6346, і нові аналітично селекціоновані штами РС1-07, РС2-07, РС-08 — вже через 1 добу вирощування мали високий титр клітин. Титр бактерій на КМ середовищі був дещо нижчим, ніж за вирощування на МД середовищі. З плином часу ця невелика різниця нівелювалась і на початку стаціонарної фази розвитку культури мали майже однакову кількість клітин в 1 мл обох поживних середовищ. Отже, усі досліджені штами виявились високотехнологічними.

У табл. 5 наведено дані щодо зміни титру *B. japonicum* 6346, РС1-07, РС2-07, РС-08, на основі яких були виготовлені препарати на вермикульті, залежно від терміну зберігання останніх. Слід зазначити, що ризобії добре приживаються і розмножуються на твердому носії — верми-

куліті, збагаченому поживними добавками (глюкоза, меляса, кукурудзяний екстракт). Через 10 діб титр бактерій збільшувався майже на порядок. Протягом наступних 30 діб кількість ризобій у препараті також зростала, хоч і не так інтенсивно, як у перші 10 діб зберігання.

Отже, можна зробити висновок, що нові аналітично селекціоновані штами не тільки за симбіотичними властивостями, азотфіксувальною активністю, вірулентністю та конкурентоспроможністю, а й за технологічністю відповідають вимогам, які ставляться до бульбочкових бактерій для виготовлення бактеріальних препаратів.

1. Берестецкий О.А., Новикова А.Г., Князева В.Л. Простой метод оценки конкурентной способности клубеньковых бактерий // Микробиология. — 1983. — 52, № 4. — С. 651—656.
2. Бутвина О.Ю., Толкачев Н.З., Князев А.В. Высококонкурентные штаммы клубеньковых бактерий — основа эффективности биопрепаратов // Микробиол. журн. — 1997. — 59, № 4. — С. 123—131.
3. Воробей Н.А., Коць С.Я., Кудрявченко Л.А. Конкурентоздатність транспозонових мутантів *Bradyrhizobium japonicum* // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. — Т. 1. — К.: Логос, 2009. — С. 453—458.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1985. — 371 с.
5. Имшенецкий А.А., Парийская А.Н., Эррайс Л. Экспериментальное получение мутантов *Rhizobium meliloti* с повышенной активностью // Микробиология. — 1970. — 39, № 2. — С. 343—347.
6. Крутило Д.В., Ковалевська Т.М. Особливості поширення бульбочкових бактерій сої в різних регіонах України // Агроекол. журн. — 2003. — № 3. — С. 59—63.
7. Маліченко С.М., Даценко В.К., Маменко П.М., Омельчук С.В. Дослідження ефективності інокуляції сої окремими штамми ризобій та їх композиціями // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. Т. 1. — К.: Логос, 2009. — С. 421—427.
8. Маліченко С.М., Даценко В.К., Мельникова Н.М. Визначення конкурентоспроможності бульбочкових бактерій люпину при інокуляції активним і неактивним штамми // Фізіологія і біохімія культ. рослин. — 1998. — 30, № 1. — С. 49—53.
9. Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии. Методы исследования клубеньковых бактерий / Науч. ред. Л.М. Доросинский. — Л.: 1981. — 47 с.
10. Новикова А.Г., Князева В.Л., Онищенко Н.Г. Конкурентная способность *Rhizobium*: проблемы и методы // Тр. ВНИИ с.-х. микробиологии. — 1978. — 47. — С. 63—73.
11. Онищук О.П., Курчак О.Н., Шарыпова Л.А. и др. Анализ различных типов конкурентоспособности у Tn5-мутантов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) // Генетика. — 2001. — 37, № 11. — С. 1507—1512.
12. Патыка В.Ф., Толкачев Н.З., Бутвина Ю.З. Основные направления оптимизации симбиотической азотфиксации в современной земледелии Украины // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — 37, № 5. — С. 384—393.
13. Смирнова Т.В., Мавричев П.И., Чундерова А.И. Серологическая характеристика клубеньковых бактерий клевера в почвах Карелии // Бюл. ВНИИ с.-х. микробиологии. — 1981. — № 33. — С. 29—33.
14. Толкачев Н.З., Дубовенко Е.К., Чечельницкая Л.Н. Неактивный штамм клубеньковых бактерий сои // 9-й Баховский коллоквиум по азотфиксации. Тез. докл. (Москва, 24—26 января 1995). — Пушкино, 1995. — С. 28.
15. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе (методические рекомендации). — Л.: Б.и., 1991. — 60 с.
16. Amarger N. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains *Rhizobium meliloti* // Soil Biol. Biochem. — 1981. — 13, N 6. — P. 475—480.
17. 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 Physiol. — 1968. — 43, N 8. — P. 1185—1207.
18. Hynes M.F., O'Connell M.P. Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum* // Can. J. Microbiol. — 1990. — 36, N 12. — P. 864—869.
19. Lagacherie B., Hugot R., Amarger N. Selection de souches de *Rhizobium japonicum* d'après leur compétitivité pour l'infestation // Ann. Agr. — 1977. — 28, N 4. — P. 379—391.

20. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. Г. Спайнка, А. Кондорози, П. Хукаса. Пер. на рус. под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. — СПб., 2002. — 567 с.

Отримано 11.07.2012

ЭФФЕКТИВНОСТЬ, КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТЬ И ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ  
НОВЫХ АНАЛИТИЧЕСКИ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ШТАММОВ  
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ

С.М. Маличенко, С.В. Омельчук, П.Н. Маменко, С.Я. Коць

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована возможность использования непрямого метода определения относительной конкурентоспособности активных штаммов *Bradyrhizobium japonicum* по массе сухих растений при смешанной инокуляции активным и высококонкурентным, но неактивным штаммами. Установлено, что все проанализированные штаммы высококонкурентоспособны, а именно от 73 до 95 %, т.е. на уровне штамма-стандарта 634b. Вместе с высокими эффективностью, конкурентоспособностью новые аналитически селекционированные штаммы характеризуются высокой технологичностью, хорошо размножаются и сохраняются на твердом носителе, что удовлетворяет требованиям к изготовлению биопрепаратов.

EFFICIENCY, COMPETITIVENESS AND TECHNOLOGICAL EFFECTIVENESS OF  
NEW ANALYTICALLY SELECTED STRAINS OF SOYBEAN NODULE BACTERIA

S.M. Malichenko, S.V. Omelchuk, P.M. Mamenko, S.Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The possibility of using of indirect method to study the relative competitiveness of active strains of *Bradyrhizobium japonicum* by measuring plants dry weight under the mixed inoculation with active and highly competitive but inactive strains was investigated. It was established that analyzed strains possessed high competitiveness, notably 73–95 %, which was on the level of the standard strain 634b. Besides of high efficiency and competitiveness new analytically selected strains also have high technological effectiveness, reproduction and preservation abilities on solid carrier that complete the requirements for biopreparations production.

*Key words:* nodule bacteria, competitiveness, technological effectiveness.