

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП Д03680, Украина

## ВЛИЯНИЕ ГЛИНИСТЫХ МИНЕРАЛОВ НА РОСТ И НОДУЛЯЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ *BRADYRHIZOBIUM* *JAPONICUM*

Изучено влияние палыгорскита, монтмориллонита и бентонита на ростовую активность клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 634б и 604к. Показано, что глинистые минералы при исходном содержании в суспензии  $10^4$  и  $10^5$  мг/бактериальную клетку в разной степени стимулировали рост этих штаммов клубеньковых бактерий. Бактеризация семян сои суспензией *B. japonicum* 634б, содержащей  $10^5$  мг бентонита/бактериальную клетку сопровождалась снижением на 21,8 % численности клубеньков на корнях и увеличением их массы на 35,5 %.

**Ключевые слова:** *Bradyrhizobium japonicum*, соя, глинистый минерал, ростовая активность, формирование клубеньков.

Значительная роль в обеспечении почв азотными соединениями биологического происхождения принадлежит симбиотическим азотфиксирующим системам [2, 8]. Поэтому исследование разных аспектов формирования и функционирования растительно-микробных азотфиксирующих ассоциаций, в том числе бобово-ризобияльного симбиоза остается актуальным. Значительная часть микроорганизмов в почве функционирует в гетерофазных условиях, будучи прикрепленными к ее твердым частицам, одну из фракций которых составляют глинистые минералы [1, 4]. Они часто оказывают заметное стимулирующее влияние на ростовую активность ряда видов бактерий [4, 6], в частности ризобий [5], а также на другие показатели физиологической активности почвенных микроорганизмов [10, 13, 14].

В предыдущих исследованиях было показано, что внесение глинистых минералов в суспензию клубеньковых бактерий сопровождалось повышением их ростовой активности [4, 5]. Однако динамика роста *Bradyrhizobium japonicum* при длительном их инкубировании в присутствии высокодисперсных материалов остается неизученной, хотя в условиях почвы взаимодействие микроорганизмов с твердыми компонентами происходит на протяжении всего времени их функционирования. Кроме того, было показано, что взаимодействие клубеньковых бактерий с глинистыми минералами сопровождается снижением хемотаксиса этих микроорганизмов [11]. Возможно, что этот процесс будет воздействовать на формирование бобово-ризобияльного симбиоза.

Учитывая указанное, целью работы было изучение влияния глинистых минералов палыгорскита, монтмориллонита и бентонита, отличающихся свойствами частиц, на ростовую активность клубеньковых бактерий, а также эффективность формирования нодуляционного аппарата бактериями *B. japonicum* 634б и растениями сои под действием бентонита.

**Материалы и методы.** Объектами исследований были штаммы клубеньковых бактерий: *Bradyrhizobium japonicum* 634б (вирулентный, активный), который был получен из Украинской коллекции культур микроорганизмов; *B. japonicum* 604к (вирулентный, неактивный), любезно представленный к.б.н. Н.З. Толкачевым (Крымский филиал Института сельскохозяйственной микробиологии УААН). Для создания модельных бобово-ризобияльных систем использовали растения сои *Glycine max* L. (Merr.) сорта Чернобурая, семена которой были любезно предоставлены к.б.н. В.Ф. Марьюшкиным (Институт физиологии растений и генетики НАН Украины). В экспериментах использовали глинистые минералы палыгорскит, монтмориллонит и бентонит Дашуковского месторождения бентонитовых глин (Украина) [9].

Клубеньковые бактерии культивировали в периодических условиях на качалке при 160 об/мин и температуре 28°C в колбах Эрленмейера объемом 700 мл, содержащих по 100 мл маннитно-дрожжевой среды [5]. В нее вносили по 0,1 г или 1,0 г стерильного глинистого минерала и по 1 мл суспензии микроорганизмов, полученной при смыве микробной биомассы с поверхности агаризованной маннитно-дрожжевой среды. Численность ризобий во вносимой суспензии составляла  $10^7$  клеток/мл. Таким образом, исходное содержание глинистых минералов в суспензии составляло  $10^5$  или  $10^4$  мг/бактериальную клетку. В конт-

© И.К. Курдиш, Н.Н. Мельникова, 2011

рольном варианте глинистые минералы не вносили в среду культивирования. Численность микроорганизмов определяли методом их высева на агаризованную маннитно-дрожжевую среду из серийных десятикратных разведений с последующим подсчетом выросших колоний после 10 суток инкубирования при 28 °С. Отбор образцов для учета количества бактерий осуществляли на 1, 3, 5 и 7 сутки культивирования.

Изучение влияния глинистого минерала бентонита на формирование нодуляционного аппарата проводили в песчаной культуре в условиях вегетационных экспериментов при естественных освещении и температуре (вегетационный домик Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины). Период проведения опытов охватывал июнь и июль. При этом в керамические сосуды емкостью 3 кг, предварительно простерилизованные 16 % раствором пероксида водорода и наполненные стерильным песком, вносили питательную среду Гельригеля со стартовой дозой азота 0,25 нормы. Влажность песка поддерживали на уровне 60 % от полной влагоемкости. Семена сои, простерилизованные 10 %-м раствором пероксида водорода, тщательно промывали стерильной водой, инокулировали и высевали. Инокуляцию семян в опытных вариантах проводили суспензией трехсуточной культуры *B. japonicum* 6346 с титром  $10^7$  клеток/мл, полученной при выращивании микроорганизмов в жидкой маннитно-дрожжевой среде, в которую вносили бентонит из расчета  $10^{-5}$  мг/бактериальную клетку (исходная концентрация глинистого минерала). Нагрузка на семя составляла  $10^6$  бактериальных клеток. Полученные в опытах данные обрабатывали статистически [7].

**Результаты и их обсуждение.** Показано, что внесение в питательную среду исследованных глинистых минералов в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  мг/ бактериальную клетку задерживало рост *B. japonicum* 6346 на протяжении первых 24 часов культивирования и не влияло на накопление клеток *B. japonicum* 604к (табл. 1, 2). Дальнейшее культивирование этих бактерий с глинистыми минералами сопровождалось стимуляцией роста популяций. Так, при внесении в среду палыгорскита, монтмориллонита и бентонита в количестве  $10^{-4}$  мг/ бактериальную клетку численность *B. japonicum* 6346 и 604к после трех суток культивирования возрастала по сравнению с контролем (без глинистых минералов) в 6–13 раз (табл. 1).

Динамика накопления микробных клеток при наличии в среде глинистых минералов зависела от их типа и штамма ризобий. В питательной среде с палыгорскитом после трех суток культивирования численность *B. japonicum* 604к увеличивалась по сравнению с контролем более чем на порядок, а *B. japonicum* 6346 – в 6,7 раз (табл. 1). В то же время в присутствие монтмориллонита и бентонита численность этих бактерий возрастала в 10-24 раза (табл. 1). Однако данные минералы оказывали менее выраженное влияние на рост *B. japonicum* 604к. При их внесении в суспензию этого штамма численность бактерий возрастала по сравнению с контролем в 7–8 раз (табл. 1).

Таблица 1

Динамика численности бактерий *Bradyrhizobium japonicum* под влиянием глинистых минералов (начальная концентрация  $10^{-4}$  мг/ бактериальную клетку).

Вариант опыта	Численность бактерий (кл/мл) при культивировании в течение, сутки		
	1	3	5
<i>B. japonicum</i> 6346			
Контроль	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^{10}$
Палыгорскит	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^6$	$(8,7 \pm 1,6) \times 10^9$	$(3,9 \pm 0,5) \times 10^{11}$
Монтмориллонит	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^6$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{10}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{10}$
Бентонит	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{10}$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^{11}$
<i>B. japonicum</i> 604к			
Контроль	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^6$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^7$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^8$
Палыгорскит	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^8$	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^{10}$
Монтмориллонит	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^6$	$(7,0 \pm 1,0) \times 10^7$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{10}$
Бентонит	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(8,0 \pm 1,0) \times 10^7$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^{10}$

**Примечания:** Здесь и в табл. 2 средние арифметические и стандартные ошибки получены из шести повторностей. Численность бактерий в суспензии в начале инкубирования составляла  $10^5$  клеток/мл.

После пяти суток культивирования *B. japonicum* 6346 в среде без глинистых минералов количество бактерий возрастало до  $4,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл, тогда как в присутствии палыгорскита

и бентонита этот показатель был на порядок выше. Еще более существенные различия наблюдались при культивировании в течение этого времени *B. japonicum* 604к. Численность бактерий в среде с монтмориллонитом и бентонитом была почти на два порядка выше, чем в контроле (табл. 1).

При внесении в суспензию *B. japonicum* 634б высокодисперсных материалов в количестве  $10^{-5}$  мг/ бактериальную клетку также наблюдалось существенное увеличение их ростовой активности. В среде с палыгорскитом и бентонитом после трех суток культивирования количество бактерий возросло почти на порядок и еще заметнее при внесении монтмориллонита. После пяти суток культивирования этих микроорганизмов наибольший прирост клеток отмечался в среде с палыгорскитом и бентонитом.

Необходимо отметить, что на седьмые сутки культивирования клубеньковых бактерий в контрольном варианте (без внесения глинистых минералов) численность микроорганизмов существенно снижалась, тогда как в вариантах с глинистыми минералами количество микробных клеток уменьшалось незначительно (табл. 2), а при наличии в среде монтмориллонита наблюдалось даже определенное увеличение численности ризобий.

**Таблица 2**

**Влияние глинистых минералов в концентрации  $10^{-5}$  мг/ бактериальную клетку на ростовую активность клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* 634б**

Вариант опыта	Численность бактерий (кл/мл) при культивировании в течение, сутки			
	1	3	5	7
Контроль	$(8,4 \pm 1,6) \times 10^6$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^8$	$(5,0 \pm 0,4) \times 10^{10}$	$(5,0 \pm 0,8) \times 10^9$
Палыгорскит	$(2,4 \pm 0,4) \times 10^6$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^9$	$(8,2 \pm 0,2) \times 10^{11}$	$5,5 \pm 0,5 \times 10^{11}$
Монтморил-лонит	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^6$	$(5,3 \pm 1,0) \times 10^9$	$(2,5 \pm 0,6) \times 10^{11}$	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^{11}$
Бентонит	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^9$	$(6,3 \pm 0,6) \times 10^{11}$	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^{11}$

Ранее было установлено, что высокодисперсные материалы, в том числе некоторые глинистые минералы, способны повышать ростовую активность клубеньковых бактерий сои и ряда других ризосферных микроорганизмов [4–6]. В условиях наших исследований показано, что глинистые минералы палыгорскит, монтмориллонит и бентонит не только обладали ростостимулирующим действием по отношению к бактериям *B. japonicum* на определенном этапе развития популяции микроорганизмов, но также вызывали увеличение численности ризобий по сравнению с контролем в фазе стационарного роста и последующего периода культивирования (табл. 1, 2).

Таким образом, глинистые минералы, представляющие фракцию неорганических компонентов почв, стимулируют ростовую активность популяции этих бактерий и способствуют поддержанию ее численности. Это, по-видимому, может влиять на формирование бобово-ризобиального симбиоза [15].

Нашими исследованиями показано, что глинистые минералы отличаются по степени действия на ростовую активность разных по симбиотическим свойствам штаммов бактерий *B. japonicum*. Такой эффект может определяться рядом факторов, в том числе физиологическими особенностями штаммов бактерий и строением частиц глинистых минералов, а также физико-химическими процессами, происходящими на поверхности последних. Форма и свойства частиц этих минералов существенно влияет на распределение заряда на их поверхности, а также, очевидно, на степень контактного взаимодействия с компонентами внешнего слоя бактерий [12]. Разные типы глинистых минералов, обладающие характерными физико-химическими свойствами, в частности ионообменной и сорбционной способностью, могут определять степень их стимулирующего влияния на физиологическую активность микроорганизмов [4].

Учитывая выраженное стимулирующее влияние глинистых минералов на ростовую активность *B. japonicum* 634б (табл. 1, 2), возможно предположить, что внесение бентонита в суспензию клубеньковых бактерий может влиять на эффективность формирования ими бобово-ризобиального симбиоза. Результаты исследований показали (табл. 3), что при содержании в среде  $10^{-5}$  мг/ бактериальную клетку этого минерала наблюдается уменьшение клубенькообразования на корнях в период активного формирования симбиоза, что привело к

снижению их количества в фазу начала бутонизации растений сои на 21,8 % (35 сутки после всходов).

Таблица 3

**Влияние бентонита на формирование клубеньков *Bradyrhizobium japonicum* 6346 на корнях растений сои**

Вариант опыта	Количество клубеньков, шт (10 дней после инокуляции)	Количество клубеньков, шт (35 дней после инокуляции)	Масса клубенька, мг
<i>B. japonicum</i> 6346 (контроль)	8,2 ± 0,6	18,1 ± 1,1	3,6 ± 0,4
<i>B. japonicum</i> 6346 + бентонит	6,9 ± 0,7	14,2 ± 1,0	4,8 ± 0,5

**Примечания:** 1. Начальное содержание бентонита составляло  $10^5$  мг/бактериальную клетку; 2. В таблице представлены средние арифметические и стандартные ошибки двух отдельных опытов в трехкратной повторности, в каждом из которых было оценено по 20 растений.

В то же время средняя масса одного клубенька при бактериализации семян сои суспензией *B. japonicum* 6346 с бентонитом была больше массы клубенька контрольных растений на 35,5 %. Таким образом, глинистый минерал бентонит при внесении его в суспензию *B. japonicum* 6346 перед инокуляцией семян сои оказывал неоднозначное влияние на клубенькообразующую способность ризобий (табл. 3).

Подобное влияние бентонита на формирование симбиотических взаимоотношений между бактериями *B. japonicum* 6346 и растениями сои, проявляющееся в снижении количества клубеньков на корнях макросимбионта и увеличении их массы, может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, прикрепляясь к ризобиям, частицы глинистого минерала, по-видимому, могут блокировать рецепторы хемотаксиса на поверхности бактериальных клеток, играющего важную роль на первых этапах формирования симбиоза [3,11]. Во-вторых, взаимодействие бактерий с глинистым минералом стимулирует ростовую активность ризобий (табл. 1, 2) и, возможно, синтез ими биологически активных веществ, повышающих массу клубеньков.

Учитывая то, что направленность влияния бентонита на физиологическую активность клубеньковых бактерий отчасти может зависеть также от его концентрации и физиологического состояния культуры микроорганизмов [4], можно предположить, что коррекция этих составляющих действием глинистого минерала приведет к активизации процессов, лежащих в основе формирования и функционирования симбиотических азотфиксирующих систем. Поэтому одним из способов, повышающих потенциал бактерий при их использовании для создания высокоэффективного бобово-ризобияльного симбиоза, может быть инкубирование микроорганизмов с глинистыми минералами, что позволяет существенно повысить численность бактерий и их физиологическую активность.

Таким образом, палыгорскит, монтмориллонит и бентонит в исходной концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  мг/бактериальную клетку повышали ростовую активность *B. japonicum* в логарифмической фазе роста и их жизнеспособность на более поздних стадиях роста. Степень и направленность стимулирующего действия глинистых минералов изменялась в зависимости от количества высокодисперсных материалов в среде и штамма бактерий, используемого в опытах. При внесении в среду бентонита  $10^{-5}$  мг/бактериальную клетку наблюдалось снижение количества клубеньков, сформированных на корнях сои *B. japonicum* 6346 и увеличение их массы.

**І.К. Курдиш, Н.М. Мельникова**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ*

**ВПЛИВ ГЛИНИСТИХ МІНЕРАЛІВ НА РІСТ БАКТЕРІЙ І НОДУЛЯЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

**Резюме**

Вивчено вплив палигорськіту, монтморилоніту і бентоніту на ростову активність бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 6346 і 604к. Показано, що глинисті мінерали при вихідному вмісті в суспензії  $10^{-4}$  і  $10^{-5}$  мг/ бактеріальну клітину в різній мірі стимулювали ріст цих штамів бульбочкових бак-

терій. Бактеризація насіння сої суспензією *B. japonicum* 634б, що містила  $10^{-5}$  мг бентоніту/ бактеріальну клітину супроводжувалась зниженням чисельності бульбочок на коренях на 21,8 %, та зростанням їх маси на 35,5 %.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, соя, глинистий мінерал, ростова активність, формування бульбочок.

**I.K.Kurdish, N.M.Melnykova**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **INFLUENCE OF CLAY MINERALS ON GROWTH AND NODULATION ACTIVITY OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM***

### **S u m m a r y**

The influence of a palygorskite, montmorillonite, bentonite on the growth activity of the nodulate bacteria *Bradyrhizobium japonicum* 634b and 604k has been studied. It was shown that clay minerals at the start concentrations of  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  mg/bacterial cell stimulated to different extent the soybean nodule bacteria growth. The soybean seed bacterization by suspension of *B.japonicum* 634b with bentonite at the concentration  $10^{-5}$  mg/bacterial cell was accompanied by a decrease of root nodule number by 21.8 % and increase of nodule weight by 35.5 %.

The paper is presented in Russian.

**К е y w o r d s:** *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, clay mineral, growth activity, shape of nodules.

**T h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Kurdish I.K.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. – Киев : Наук. думка, 1973. – 590 с.
2. Зернобобовые культуры в интенсивном земледелии / В.П. Орлов, А.П. Исаев, С.И. Лосев. – Москва: Агропромиздат, 1986. – 206 с.
3. Коць С.Я., Береговенко С.К., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов. – Киев: Наук. думка, 2007. – 315 с.
4. Курдши И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – Киев : КВЦ, 2001. – 141 с.
5. Курдши И.К., Дробитько А.В., Шевченко Т.В., Марьюшкин В.Ф. Взаимодействие *Bradyrhizobium japonicum* с глинистыми минералами // Микробиол. журн. – 2000. – 62, №2. – С. 45–50.
6. Курдши И.К., Титова Л.В. Использование высокодисперсных материалов при культивировании и получении гранулированных препаратов *Agrobacterium radiobacter* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – 37, №3. – С. 369–373.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1968. – 283с.
8. Старченков Е.П. О состоянии и перспективах исследований азотфиксации бобово-ризобияльными системами // Физиология и биохимия культ. растений. – 1987. – 19, № 1. – С. 3–9.
9. Тарасевич Ю.И., Овчаренко Ф.Д. Адсорбция на глинистых минералах. – Киев: Наук. думка, 1975. – 351 с.
10. Титова Л.В., Антипчук А.Ф., Курдши И.К. и др. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter* // Микробиол. журн. – 1994. – 56, № 3. – С. 60–65.
11. Чуйко Н.В., Курдши И.К. Хемотаксисные свойства *Bradyrhizobium japonicum* в присутствии природных высокодисперсных материалов // Микробиология. – 2004. – 73, № 3. – С. 364–367.
12. Labille J., Thomas F., Milas M., Vanhaverbeke C. Flocculation of colloidal clay by bacterial polysaccharides: effect of macromolecule charge and structure// J. Colloid Interface Science. – 2005. – 284, N1. – P.149–156.
13. Lavie S., Stotzky G. Interactions between clay minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum* // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – 51, N1. – P. 74–79.
14. Lunsdorf H., Erb R.W., Abraham W.R., Timmis K.N. “Clay hitches”: a novel interaction between bacteria and clay minerals// Environ. Microbiol. – 2000. – 2, N2. – P.161–168.
15. Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes// Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57, N1. – P.19–28.

Отримано 14.12.2010