

**В.П. Патика<sup>1</sup>, О.Л. Овсієнко<sup>2</sup>, А.В. Калініченко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна,

<sup>2</sup>Інститут сільського господарства Криму НААН України,  
вул. Київська, 150, Сімферополь, 95453 АР Крим, Україна,

<sup>3</sup>Опольський університет,  
ul. Dmowskiego 7-9, 45-365 Opole, м. Ополь, Польща

## **СЕЛЕКЦІЯ ШТАМІВ *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ДЛЯ ЕФЕКТИВНОЇ БАКТЕРИЗАЦІЇ *MELILOTUS ALBUS MEDIK.***

Наведено дані з аналітичної селекції бульбочкових бактерій буркуну з метою одержання бактеріального препарату для передпосівної інокуляції насіння буркуну й утворення ефективного бобово-ризобіального симбіозу. З природних популяцій буркуну виділено ряд нових штамів, інокуляція якими сприяє зростанню висоти, фітомаси *Melilotus albus Medik.*, а також нітрогеназної активності нодуляційного апарату порівняно з дією існуючих виробничих штамів. Проведено ідентифікацію найефективніших штамів *Sinorhizobium meliloti*.

**Ключові слова:** аналітична селекція, бульбочкові бактерії *Sinorhizobium meliloti*, буркун *Melilotus albus Medik.*, симбіотична азотфіксація.

В Україні, зокрема в зоні Степу, добування корисних копалин проводиться відкритим способом. У результаті порушуються великі площі родючих земель, змінюється структура ґрунту та на поверхню виносяться гірські породи, що є не придатними для вирощування мегатрофних культур та потребують подальшої рекультивациі [13].

Основна причина низької родючості гірських порід полягає у нестачі основних елементів живлення, необхідних для росту та розвитку рослин. В першому мінімумі знаходяться сполуки азоту, вміст якого у таких породах, як лесоподібні суглинки, становить близько 0,02-0,025 %, що у декілька разів менше, ніж у гумусному горизонті зональних чорноземів. Здатність бобових рослин цілком задовольняти свої потреби в азоті за рахунок симбіотичної азотфіксації та формувати на гірських породах велику надземну біомасу та масу коренів зумовлює використання їх як основних фітомеліоративних культур у степовій чорноземній зоні України [1,2].

Трав'янисті бобові, серед яких провідна роль належить люцерні, еспарцету та буркуну, не лише здатні рости на деградованих ґрунтах, але й можуть значно покращувати стан та структуру останніх. Завдяки утворенню симбіотичних взаємовідносин із бульбочковими бактеріями, відбувається накопичення біологічного азоту. В умовах цілеспрямованої біологічної рекультивациі і при спонтанному заростанні техногенних земель буркун є однією з пріоритетних рослин, яка на 1 га посівів накопичує до 300-500 кг азоту та за 7-8 років створює умови для заселення інших, менш стійких рослин [9,11,12].

Як відомо, для функціонування ефективного ризобіально-бобового симбіозу необхідні активні і конкурентоспроможні штами відповідних бульбочкових бактерій для подальшої інокуляції насіння рослин, зокрема бобових фіторекультивантів [4-6].

Метою наших досліджень був пошук, виділення та перевірка ефективності штамів азотфіксуючих бактерій для формування активного симбіозу з буркуном.

**Матеріали і методи.** Об'єктами дослідження були: штам *Sinorhizobium meliloti* 1110 (282), а також високоефективний еталонний виробничий (згідно з Географічною сіткою дослідів із ризоторфіном) штам 1117 (з колекції ГНЗ Всеросійського НДІСГМ АН Росії, С.-Петербург) та еталонний штам *S. meliloti* RMA-30 (з колекції Дніпропетровського державного аграрного університету). Крім того використані в дослідженні 35 ізолятів, що виділені нами з бульбочок природних популяцій буркуну білого та жовтого. Виділення штамів до чистої культури (1 бульбочка – 1 штам) проводили за загальноприйнятими методиками [4,5,8]. Загалом було одержано 35 штамів *Sinorhizobium meliloti*. Ефективність визначали у вегетаційних посудинах із вмістом 0,5 кг стерильного безазотного вермикулітного субстрату. Повторність дослідів –

4-х кратна. Відповідні штами *Sinorhizobium meliloti* вирощували при 27°C протягом 4-6 діб у пробірках на агаризованому середовищі, потім змивали стерильною водою і готували суспензію. Інокуляційне навантаження складало 10<sup>6</sup> КУО/насінину. Для інокуляції насіння буркуну у польових умовах використовували вермикультурну форму препарату бульбочкових бактерій з титром 0,95 · 10<sup>9</sup> КУО/г препарату.

Тест-рослиною слугував буркун білий сорту Еней. Критеріями ефективності симбіозу були висота, фітомаса та нітрогеназна активність бульбочок бактеризованих рослин. Ефективність штамів оцінювали порівняно з дією штаму *S. meliloti* 1110 (282). Цей штам у наших попередніх дослідженнях з інокуляцією буркуну за вирощування на лесоподібному суглинку не проявив своєї ефективності [10]. Нітрогеназну активність визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «CHROM-5» [7].

Визначення основних культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей нових штамів ризобій проводили згідно з методичними рекомендаціями [8] та визначника Бергі [14]. Для виявлення характерних ознак досліджених штамів використовували ряд селективних поживних середовищ: Козера, Гільтая, Кінга, м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), гліцериново-пептонний агар (ГПА), м'ясо-пептонну желатину (МПЖ).

Окрім вивчення вищеназаних властивостей штамів, що є необхідним етапом їх ідентифікації, нами використано також молекулярно-біологічні методи. Експрес-методом фенол-хлороформної екстракції виділено ДНК ризобій [3]. Ампліфікацію проводили в термоциклері P5000HL Omn-E (Hybaid Instruments, Великобританія) в 25 мкл реакційної суміші з наступним складом: 2,5 мкл буферу для полімерази; по 0,2 мМ кожного з нуклеотидів; 2,8 мМ MgCl<sub>2</sub>; по 5 пМ кожного праймеру; 1 одиниця термостабільної ДНК-полімерази DiaTaq (Амплиценс, Росія); ≈ 20 нг цільової ДНК; компоненти реакції доводили до необхідної концентрації деіонізованою водою, отриманою за допомогою приладу Purelab Ultra (Elga, Англія). Умови проведення ПЛР: початкова денатурація ДНК: 94°C – 5 хв.; ампліфікація впродовж 35 циклів: денатурація при 94°C – 30 сек., відпал праймерів 55°C – 30 сек., синтез ДНК при 72°C – 1 хв.; закінчення синтезу ДНК: 72°C – 5 хв. Використано праймери: FGPL 132-38: CCG GGT TTC CCC ATT CGG, FGPS 1490-72: TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT [15] Візуалізацію продуктів ПЛР проводили у 1 % агарозному гелі в буфері TAE з бромистим етидієм [3]. Маркер молекулярної ваги GeneRuler Mix (Fermentas, США)

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Statistica 6.0. У таблицях наведена найменша ймовірна різниця з рівнем значущості 5 % (НІР<sub>05</sub>).

**Результати та їх обговорення.** За результатами вегетаційних досліджень більшість нових виділених нами штамів ризобій виявились активними та утворювали на коренях буркуну велику кількість бульбочок рожевого кольору. Інокуляція сприяла збільшенню висоти рослин, фітомаси та нітрогеназної активності нодуляційного апарату бульбочок порівняно з контролем.

При проведенні скринінгу 35 ізолятів з бульбочок буркуну встановлено, що 10 з них виявились активними та позитивно вплинули на ріст і розвиток рослин. За даними аналітичної селекції найбільш ефективними були ізоляти: Д-5, Д-14, Д-15, Д-17, Д-20, Д-22, Д-24, Д-30, Д-31, Д-33, бактеризація якими сприяла збільшенню фітомаси буркуну на 106-139 %, а висоти – на 171-185 % порівняно з варіантом інокуляції неактивним штамом *S. meliloti* 1110 (табл. 1).

У ході досліджень було виявлено, що нові штами ризобій мають високу нітрогеназну активність у симбіозі з рослинами буркуну. Вона становила 69,1 – 90,2 нМоль С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>/рослину за годину, що у 5,6–7,3 рази перевищувало показник контрольного варіанту (табл. 1).

Як свідчать отримані результати, нові штами виявились більш ефективними, ніж існуючі виробничі. Так, штам *S. meliloti* RMA-30 в наших дослідженнях значно поступився новим ефективним штамом. До того ж, за ефективністю деякі нововиділені штами значно перевищували за продуктивністю еталонний виробничий штам *S. meliloti* 1117. Наприклад, інокуляція буркуну штамом *S. meliloti* Д-5 сприяла збільшенню висоти рослин майже на 18,4 %, фітомаси – на 8 %, а нітрогеназної активності – 31,5 % порівняно з дією штаму *S. meliloti* 1117 (табл. 1).

Таким чином нами виділено 35 ізолятів ризобій із бульбочок природних популяцій буркуну, з яких 10 виявились ефективними і сприяли збільшенню висоти та фітомаси інокульованих рослин буркуну білого сорту Еней порівняно з дією неактивного штаму *S. meliloti* 1110. Штами Д-5, Д-14, Д-15, Д-17, Д-22, Д-33 були найбільш ефективними і позитивно вплинули на морфометричні показники рослин буркуну та активність нітрогенази.

Таблиця 1

**Вплив штамів ризобій буркуну на ріст, розвиток та показники нітрогеназної активності бульбочок буркуну білого сорту Еней (вегетаційний дослід, вермикуліт)**

Штами	Суха фітомаса		Висота рослин		Нітрогеназна активність нМоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / рослину за годину
	г	%	см	%	
1110 – контроль неактивний	0,97	100	17,5	100	12,3
1117– еталонний виробничий	1,89	195	27,2	255	68,6
RMA-30– еталонний	1,85	191	25,7	247	59,8
Д-5	2,04	210	32,2	284	90,2
Д-14	2,00	206	32,0	283	82,6
Д-15	2,00	206	32,3	285	70,6
Д-17	2,05	211	29,9	271	85,4
Д-20	2,17	224	<b>31,5</b>	280	80,8
Д-22	2,18	225	32,3	284	74,6
Д-24	2,08	214	31,1	278	69,1
Д-30	2,04	210	30,1	272	72,2
Д-31	2,08	214	30,1	272	81,1
Д-33	2,32	239	32,4	285	79,6
НІР <sub>05</sub>	1,03		6,40		10,16

Дослідження морфологічних ознак нових штамів показало, що вони є грамнегативними, облігатними аеробними паличками, які не утворюють спор. В 3-добовій культурі палички рухливі, розміром 0,5-0,9×1,2-3,0 мкм, утворюють колонії 2-х типів: округлі, опуклі, до 1 мм в діаметрі, білі, слизисті до 2 мм в діаметрі.

Фізіолого-біохімічні властивості нових штамів встановлювали за характером росту культур, використанням поживних речовин, утворенням метаболітів, ферментативною активністю на диференціально-діагностичних середовищах (табл. 2).

Так, виявлено, що досліджені штами добре ростуть на середовищах з органічним (МПА, капустяний агар, ГПА), а також мінеральним (середовище Козера) [8] джерелом азоту. На МПБ вони утворювали значну муť та осад; добре росли на картопляній скибочці, викликаючи легке побуріння.

При культивуванні в напіврідкому агаризованому середовищі Козера з додаванням вуглеводів [8] визначено, що досліджувані штами використовували для свого живлення глюкозу, сахарозу, лактозу з підкисленням середовища, зі слабким підкисленням – рафінозу, маніт та сорбіт; газоутворення не спостерігалось (табл. 2).

Органічні кислоти як єдине джерело вуглецю досліджені штами не використовують.

Денітрифікуючу здатність штамів виявлено на середовищі Гільтая [8].

Через два тижні культивування було відмічено його посиніння, тобто відбувалось підлогування. На наявність нітритів провели реакцію з реактивом Гріса та одержали позитивний результат, що вказує на реакцію відновлення нітратів до нітритів.

Виявлено, що штами *S. meliloti* мають залізовмісний фермент – каталазу. Так, досліджувані штами розкладали 10%-й розчин перекису водню з інтенсивним виділенням газоподібного кисню.

При культивуванні на МПА з крохмалем, після обробки розчином Люголю не спостерігали появи чітких безбарвних зон навколо штрихів культур, що свідчить про відсутність амілазної активності.

Показано, що досліджені штами ризобій не мають протеолітичного ферменту – желатинази, та не розріджують поживне середовище з додаванням желатини (МПЖ).

При культивуванні на знежиреному стерильному молоці через 15 діб відбувалось слабке підкислення, спостерігалось відновлення лакмусу.

Таблиця 2

**Основні фізіолого-біохімічні властивості штамів ризобій буркуну**

Ознаки	Штами					
	1117	Д-5	Д-14	Д-17	Д-22	Д-33
Використання вуглеводів:						
моносахаридів	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к
дисахаридів	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к
трисахаридів	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к
цукрових спиртів:						
сорбіту	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к
маніту	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к	+ / к
Засвоєння азоту мінеральних солей	+	+	+	+	+	+
Засвоєння органічного азоту	+	+	+	+	+	+
Засвоєння органічних кислот та їх солей	-	-	-	-	-	-
Ріст на МПА, ГПА	+	+	+	+	+	+
Ріст на МПЖ, розрідження желатини	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -
Культивування на лакмусовому молоці: відновлення лакмусу, продукт асиміляції	+ к	+ к	+ к	+ к	+ к	+ к
Денітрифікувальна здатність (продукт відновлення нітратів)	+ нітри	+ нітри	+ нітри	+ нітри	+ нітри	+ нітри
Каталазна активність	+	+	+	+	+	+
Амілазна активність	-	-	-	-	-	-
Оксидазна активність	-	-	-	-	-	-
Пігментація:						
флуоресціюючі	-	-	-	-	-	-
феназинові пігменти	-	-	-	-	-	-
Ріст при температурі 15-37 °С	+	+	+	+	+	+

**Примітка:** к – підкислює поживне середовище.

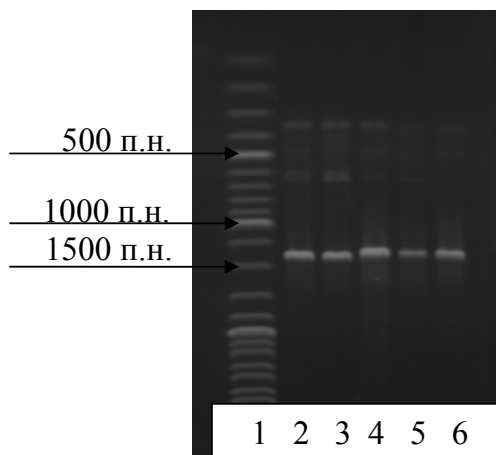
На агаризованому середовищі Кінга [8] відмічали нормальний ріст штамів *S. meliloti*, але не спостерігали наявності феназинових та флуоресціюючих пігментів.

При тестуванні штамів ризобій на наявність оксидазної активності за допомогою додавання до бактеріальної маси 1 % розчину тетраетил-параметиленадіаміну не спостерігали підфарбовування у червоно-фіолетовий колір, що свідчить про відсутність ферменту цитохром-оксидази.

Відмінностей між ростом при 22°C та 37°C не виявлено. Температурний оптимум – 25-30°C.

За результатами молекулярного аналізу ДНК досліджених ризобій нами визначена довжина міжгенного регіону гена рРНК нових ефективних штамів ризобій. Виявлено, що досліджені штами мають гомологічну ділянку в інтервалі 1350-1400 пар нуклеотидів, яка збігається з референтним штамом *S. meliloti* 1117 (рис. 1).

Таким чином, досліджені ефективні штами ризобій (Д-5, Д-17, Д-22; Д-33) за культурально-морфологічними, фізіолого-біохімічними властивостями та довжиною міжгенного регіону гена рРНК подібні між собою та збігаються з еталонним виробничим штамом *S. meliloti* 1117. За одержаними ознаками нові штами бульбочкових бактерій буркуну віднесено до виду *Sinorhizobium meliloti*.



**Рис. 1. Электрофореграма продуктів ампліфікації міжгенного регіону рДНК штамів бульбочкових бактерій буркуну:**

**1 – ДНК-маркер 1000 bp; 2 - *S. meliloti* 1117; 3 - *S. meliloti* Д-5;  
4 - *S. meliloti* Д-17; 5 - *S. meliloti* Д-22; 6 - *S. meliloti* Д-33.**

Отже, в результаті скринінгу нами виявлено ряд активних та ефективних штамів бульбочкових бактерій буркуну для утворення ефективного бобово-ризобіального симбіозу. Нові штами *S. meliloti* надалі можуть використовуватись як біоагенти екологічно безпечних біопрепаратів для інюкуляції буркуну, в тому числі і за вирощування на рекультивованих землях.

**В.Ф. Патыка<sup>1</sup>, О.Л. Овсиенко<sup>2</sup>, А.В. Калиниченко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев,

<sup>2</sup>Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины, Симферополь, Украина,

<sup>3</sup>Опольский университет, г. Ополе, Польша

### **СЕЛЕКЦИЯ ШТАММОВ *SINORHIZOBIUM MELILOTI* ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ БАКТЕРИЗАЦИИ *MELILOTUS ALBUS MEDIK.***

Резюме

Приведены данные по аналитической селекции клубеньковых бактерий донника с целью получения бактериального препарата для предпосевной инокуляции донника и образования эффективного бобово-ризобіального симбіоза. Из природных популяций донника выделен ряд новых штаммов, инокуляция которыми способствовала увеличению высоты, фитомассы *Melilotus albus* Medik., а также нитрогеназной активности клубеньков в сравнении с действием существующих производственных штаммов. Проведена идентификация перспективных штаммов *Sinorhizobium meliloti*.

Ключевые слова: аналитическая селекция, клубеньковые бактерии *Sinorhizobium meliloti*, донник *Melilotus albus* Medik., симбиотическая азотфиксация.

**V.P. Patyka<sup>1</sup>, O.L. Ovsienko<sup>2</sup>, A.V. Kalinichenko<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv,

<sup>2</sup>Institute of agriculture of the Crimea NAAS, Simferopol, Ukraine,

<sup>3</sup>Opole University, m. Opole, Poland

### ***SINORHIZOBIUM MELILOTI* STRAINS SCREENING FOR EFFICIENT BACTARIZATION OF *MELILOTUS ALBUS MEDIK.***

Summary

The data presents about analytical selection of root nodule bacteria of *Melilotus* to obtain bacterial fertilizer under sweet clover, presowing inoculation of it seeds and form a legume-rhizobial effective symbiosis. From natural melilot population a number of new strains had been allocated, inoculation of them was contributed to

an increase of height, biomass *Melilotus albus Medik.*, and nitrogenase activity in comparison to the influence of the existing production strains. The identification of most effective strains *Sinorhizobium meliloti* had been determined.

Key words: analytical selection, *Sinorhizobium meliloti*, *Melilotus albus Medik.*, symbiotic nitrogen fixation.

1. Бекаревич Н.Е., Горобец Н.Д., Колбасин А.А., Масюк Н.Т., Пистунов Н.И., Сидорович Л.П., Узбек И.Х. О рекультивации земель в Степи Украины / Под общ. ред. Н.Е. Бекаревича. – Днепропетровск: Промінь, 1971. – 220 с.
2. Забалуев В.А., Таририка А.Г., Надтока Р.И. Изменение плодородия искусственных эдафотопов в процессе их биологического освоения // Агрохімія і ґрунтознавство: міжвід. темат. наук. зб. – Харків, 2002. – С. 66–67.
3. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. Учебное издание. – ИПЦ Воронежского гос. ун-та, 2008. – 63 с.
4. Коць С.Я., Моргу́н В.В., Паты́ка В.Ф., Даценко В.К., Кругова Е.Д., Кириченко Е.В., Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз: [монография: в 4-х т.]. – Т. 1. – К.: Логос, 2010. – 508 с.
5. Коць С.Я., Моргу́н В.В., Паты́ка В.Ф., Маличенко С.М., Маменко П.Н., Кири́зий Д.А., Михалкив Л.М., Берегове́нко С.К., Мельникова Н.Н. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобияльный симбиоз: [монография: в 4-х т.]. – Т. 2. – К.: Логос, 2011. – 523 с.
6. Коць С.Я., Моргу́н В.В., Тихоно́вич И.А., Проворо́в Н.А., Паты́ка В.Ф., Петри́ченко В.Ф., Мельникова Н.Н., Маменко П.Н. Биологическая фиксация азота: генетика азотфиксации, генетическая инженерия штаммов: [монография: в 4-х т.]. – Т. 3. – К.: Логос, 2011. – 404 с.
7. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. – Л., 1982. – 12 с.
8. Возняковская Ю.М., Попова Ж.И. Методические указания по идентификации неспорных бактерий, доминирующих в ризосфере растений. – Л., 1985. – 48 с.
9. Савин А.П. Донник белый как компонент биологического земледелия // Земледелие. – 2003. – № 3. – С.23.
10. Смутьська О.Л. Вплив штамів азотфіксуючих та фосфатмобілізуючих мікроорганізмів і мінеральних добрив на ріст, розвиток та продуктивність рослин буркуну білого, вирощеного на лесоподібному суглинку // Проблеми збереження, відновлення та збагачення біорізноманітності в умовах антропогенно зміненого середовища: матер. міжнар. наук. конф. – Кривий Ріг, 2005. – С. 488 – 490.
11. Ступаков В.П., Старостка В.С., Печенюк В.И. О возделывании донника белого на отвалах известковых карьеров в условиях Подолья // Растения и промышленная среда. – Свердловск: Изд-во УрГУ, 1978. – С.68–71.
12. Толкачев Н.З., Забалуев В.А. Роль клубеньковых бактерий в фиторекультивации горных пород Орджоникидзевского ГОКА // Рациональне землевикористання рекультивованих та еродованих земель: досвід, проблеми, перспективи: матер. міжнар. наук.-практ. конф. – Дніпропетровськ, 2006. – С. 58–60.
13. Шемавнев В.И. Рекультивация нарушенных земель: история, содержание, перспективы // Рациональне використання рекультивованих та еродованих земель. – Дніпропетровськ, 2002. – С.3– 13.
14. *Bergey's manual of systematic bacteriology* /Boore D.R., Castenholz R.W. editors, Vol. 2: Garrity G.M., editor-in-chief. – 2nd ed. – New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. – 2, Part C. – 1388 p.
15. Normand P., Cournoyer B., Nazaret S. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. // Gene. – 1992. –Vol. 111, N 1. – P. 119–124.

Отримано 23.09.2013