

В. П. Пати́ка, Д. В. Крути́ло, О. В. Надкерни́чна,
Т. М. Ковале́вська, В. Г. Спиридо́нов, І. В. Волко́ва

Фенотипні та генотипні ознаки бульбочкових бактерій сої, поширених у ґрунтах України

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

Вперше в ґрунтах України серед мікросимбіонтів сої виявлені штами з інтенсивним ростом. Встановлено, що ці штами проявляють специфічність до рослини-живителя, однак істотно відрізняються від повільнорослих бульбочкових бактерій сої за морфологією колоній, швидкістю росту, чутливістю до антибіотиків, використанням сполук вуглецю. Відмічено подібність жирнокислотних профілів штаму з інтенсивним ростом KB1-1 та повільнорослих штамів 634б і KC2-3. Виявлено, що екзополісахариди штаму KB1-1 відрізняються від екзополісахаридів штамів KC2-3 і 634б наявністю ксилози (2,7%) та підвищеним вмістом рамнози (18,4%). За антигенним складом інтенсивнорослі штами об'єднані в одну серогрупу KB1-1. Аналіз послідовностей генів 16S рРНК дозволив віднести їх до роду *Bradyrhizobium*.

Бульбочкові бактерії (ризобії) — це група ґрунтових мікроорганізмів, які здатні проникати в тканини бобових рослин та індукувати формування спеціалізованих органів — бульбочок, у яких бактерії існують як внутрішньоклітинні азотфіксувальні симбіонти.

На сьогодні бульбочкові бактерії віднесені до класу alpha-Proteobacteria та об'єднані в шість родів: *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium* та *Azorhizobium* [1]. Останнім часом з'являються численні повідомлення про виділення з бульбочок бобових рослин азотфіксувальних бактерій, які належать до філогенетично віддалених від ризобій родів: *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* та *Phyllobacterium* (клас alpha-Proteobacteria), а також *Burkholderia*, *Ralstonia* та *Cupriavidus* (клас beta-Proteobacteria) [2].

За швидкістю росту на живильних середовищах бульбочкові бактерії поділені на дві великі групи — швидко- і повільнорослі, які значно розрізняються за цілою низкою ознак [3]. Серед шести родів бульбочкових бактерій тільки *Bradyrhizobium* є повільнорослими. Їх систематика розроблена не так детально, як для швидкокорослих ризобій. Найбільш вивченими представниками роду *Bradyrhizobium* є бактерії *Bradyrhizobium japonicum* — мікросимбіонти такої важливої бобової культури, як соя.

Відомо, що існує висока мінливість бобових рослин і бульбочкових бактерій за симбіотичними ознаками. Один і той самий вид бобових можуть інфікувати ризобії, які належать до таксономічно віддалених груп бактерій. Так, наприклад, соя здатна вступати в ендосимбіотичні відносини з бульбочковими бактеріями чотирьох видів: *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* та *Sinorhizobium fredii*. За даними багатьох дослідників, типовими мікросимбіонтами культурної сої (*Glycine max*) є в основному повільнорослі ризобії *B. japonicum*, тоді як для дикої сої (*Glycine soja*) характерним є утворення бульбочок із швидкокорослими ризобіями *S. fredii* [2, 3].

Популяційна різноманітність бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України практично не досліджувалася. Вітчизняні вчені основну увагу зосереджували на вивченні симбіотичних

властивостей ризобій сої, зокрема на визначенні активності симбіотичної азотфіксації [4]. Тому метою нашого дослідження було виділити з ґрунтових популяцій ризобій сої різних регіонів нові штами та вивчити їх фенотипні та генотипні ознаки.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були виділені нами штами бульбочкових бактерій сої, а також стандартний (*B. japonicum* 6346 (B-167)) та типовий (*B. japonicum* 1967 (B-209^T)) штами, які зберігаються в Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН. Морфолого-культуральні та фізіологічні властивості вилучених штамів ризобій досліджували за загальноприйнятими методиками [5, 6].

Електронно-мікроскопічні дослідження клітин штамів ризобій сої проводили методом негативного контрастування.

Здатність штамів бульбочкових бактерій сої використовувати різні джерела вуглецю визначали за їх ростом на агаризованому середовищі [7] з додаванням вуглеводів (1,0%). Чутливість виділених штамів до антибіотиків вивчали методом паперових дисків [5].

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів та моносахаридний склад екзополісахаридів (ЕПС) ризобій визначали за раніше описаними методиками [8]. Аналіз метилових ефірів жирних кислот та розділення сумішей нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert.

Антисироватки до бактеріальних штамів отримували за методикою ВНДІСГМ [6] у нашій модифікації. Антигенні властивості штамів ризобій вивчали за допомогою реакції аглютинації (метод Грубера–Відаля) [9].

Для виділення сумарної ДНК штамів ризобій використовували набір “ДНК-сорб-В” згідно з протоколом виробника. Матриці для сиквенування генів 16S рРНК синтезували за допомогою ПЛР, використовуючи універсальні для більшості еубактерій праймери fD1 та rP2 [10]. ПЛР проводили із застосуванням ампліфікатора GeneAmp PCR System 2720. Сиквенування здійснювали на автоматичному ДНК сиквенаторі ABI PRISM 3130 Genetic Analyser. Послідовності аналізували за допомогою програми BLAST шляхом порівняння з послідовностями з міжнародної бази даних GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Обробку експериментальних даних проводили, використовуючи комп'ютерну програму Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Із ґрунтів різних регіонів України, методом інокуляції стерильних проростків сої, нами отримано 180 штамів бульбочкових бактерій сої. За інтенсивністю росту на агаризованому бобовому середовищі досліджувані штами об'єднані у дві групи: з інтенсивним та повільним ростом. Штами з інтенсивним ростом на 5–6 добу після посіву утворюють на бобовому середовищі великі (2–4 мм) напівпрозорі колонії з матовим відтінком. Повільнорослі штами накопичують бактеріальну масу на 8–10 добу та утворюють дрібні (до 1 мм) колонії білого кольору.

Повільнорослі бульбочкові бактерії сої трапляються в усіх досліджених регіонах, тоді як штами з інтенсивним ростом виявлені в ґрунтах трьох із п'яти районів України. Кількісне співвідношення штамів представників обох груп змінюється залежно від ґрунтово-кліматичної зони, а частка інтенсивнорослих штамів коливається в межах від 32,7 до 52,9% (табл. 1). Штами з інтенсивним ростом виділені з популяцій ризобій сої вперше.

Нами проведено аналіз 45 морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей 30 штамів ризобій сої різного еколого-географічного походження. У табл. 2 наведені біологічні властивості штамів типових представників двох груп ризобій сої та стандартного штамів *B. japonicum* 6346 для порівняння. Виявлено, що інтенсивнорослі штами істотно

відрізняються від повільнорослих ризобій сої за розміром клітин, морфологією колоній, швидкістю росту, чутливістю до антибіотиків і використанням сполук вуглецю.

За даними вивчення динаміки росту виділених нами мікросимбіонтів сої встановлено, що у стаціонарну фазу росту штами з інтенсивним ростом накопичують приблизно в 3 рази більше біомаси, ніж повільнорослі штами [8]. Усі штами з інтенсивним ростом засвоюють сорбіт і помірно використовують сахарозу. Повільнорослі штами, на відміну від них, не ростуть на середовищі з цими джерелами вуглецю.

Відомо, що чутливість до антибіотиків є важливим критерієм у систематиці бульбочкових бактерій. Отримані нами дані свідчать про те, що досліджувані штами істотно різняться

Таблиця 1. Кількісне співвідношення повільнорослих та інтенсивнорослих штамів бульбочкових бактерій сої, виділених з місцевих популяцій ризобій різних регіонів України

Регіон України (тип ґрунту)	Загальна кількість штамів	Кількість штамів з різною інтенсивністю росту, од.	
		з інтенсивним ростом	з повільним ростом
Північний Лісостеп (лучно-чорноземний, темно-сірий)	34	18	16
Центральний Лісостеп (сірий лісовий)	52	17	35
Східний Лісостеп (чорнозем типовий)	40	18	22
Полісся (дерново-підзолистий)	14	0	14
Північний Лісостеп (чорнозем вилугуваний)	40	0	40

Таблиця 2. Біологічні властивості штамів бульбочкових бактерій сої з повільним та інтенсивним ростом

Ознака	<i>B. japonicum</i> 6346	Повільнорослий штам КС2-3	Інтенсивнорослий штам КВ1-1
Розмір клітин, мкм	0,9–1,9	0,7–1,5	0,7–3,6
Діаметр колоній на твердому бобовому середовищі, мм	0,5–1	0,5–1	2–4
Час генерації, год	> 8	> 8	< 6
Ріст на м'ясопептонному агарі	—	—	—
Утворення кислоти на молоці з лакмусом	—	—	—
Джерела вуглецю для росту			
D-глюкоза	++	++	++
D-галактоза	++	++	++
L-рамноза	+	+	+
D-рафіноза	—	—	—
L-арабіноза	++	++	++
Сахароза	—	—	+
D-мальтоза	+	+	+
D-манніт	++	++	++
Дульцит	—	—	—
D-сорбіт	—	—	++
Чутливість до антибіотиків*	3/17	2/17	9/17

* Досліджено чутливість штамів до 17 антибіотиків: 3/17 — штам чутливий до 3 із 17 досліджених антибіотиків.

за цією ознакою. Штами з інтенсивним ростом виявилися чутливими до антибіотиків, подібно до швидкорослих бульбочкових бактерій. 7–9 із 17 досліджених антибіотиків викликали затримку росту цих штамів. Повільнорослі штами були резистентними до більшості (14–15) антибіотичних речовин.

Бульбочкові бактерії сої з інтенсивним ростом виявляють специфічність до рослини-живителя. При повторному пасажі через рослину біологічні властивості цих штамів не змінюються.

Важливим критерієм при диференціації окремих видів мікроорганізмів є така їх хемотаксономічна ознака, як своєрідність жирнокислотного складу загальних клітинних ліпідів. Нами проведено аналіз жирнокислотних спектрів штамів з повільним (КС2–3) та інтенсивним (КВ1–1) ростом, а також їх порівняння із стандартним штамом *B. japonicum* 6346. Встановлено, що штами з інтенсивним (КВ1–1) і повільним (6346 и КС2–3) ростом схожі, але не ідентичні за жирнокислотними профілями. У загальних клітинних ліпідах цих штамів виявлені типи для бактерій виду *B. japonicum* насичені та ненасичені жирні кислоти з довжиною ланцюга від 12 до 18 вуглецевих атомів: 3-ОН-С12:0, С14:0, 3-ОН-С14:0, С16:0, С16:1, С18:0, С18:1, а також не ідентифіковані нами жирні кислоти Х1 і Х2. Домінуючими жирними кислотами загальних клітинних ліпідів цих бактерій є гексадеканова (15,25–28,03%), октадеценнова (46,02–78,80%) та октадеканова (19,43–21,52%) кислоти. Однак треба відзначити, що ліпіди штаму з інтенсивним ростом КВ1–1 містили більшу кількість 3-оксидодеканової (3-ОН-С12:0) і 3-окситетрадеканової (3-ОН-С14:0) кислот, а також не ідентифікованих нами жирних кислот (Х1 та Х2) у порівнянні з референтним та повільнорослими штамми.

Виявлено, що штами з інтенсивним і повільним ростом мають кількісні та якісні відмінності у моносахаридному складі ЕПС. Домінуючими моносахаридами ЕПС досліджених штамів є глюкоза, маноза та галактоза. ЕПС інтенсивнорослого штаму КВ1–1 відрізняються від ЕПС повільнорослих штамів КС2–3 та 6346 наявністю ксилози (2,7%) і значної кількості (18,4%) рамнози. У штамів з повільним ростом остання присутня в мінорних кількостях (0,6–0,9%).

Із застосуванням модифікованої схеми імунізації кролів нами отримано імунні сироватки до штаму з інтенсивним ростом КВ1–1 та штамів із повільним ростом 6346 та 46. У своїх дослідженнях ми також використовували антисироватку до повільнорослого штаму М8, люб'язно надану нам співробітниками лабораторії трансформації азоту і фосфору Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН. У перехресній реакції аглютинації антисироватки 6346, М8 та 46 не реагували з жодним із 20 штамів, які належать до трьох родів бульбочкових бактерій: *Rhizobium*, *Mezorhizobium* та *Sinorhizobium*. Важливо зазначити, що з антисироваткою до інтенсивнорослого штаму КВ1–1 (у низьких (до 1:200) розведеннях) позитивно реагували 9 штамів ризобій люпину. Даний факт свідчить про наявність у них загальних епітопів.

Вивчення серологічної спорідненості мікросимбіонтів сої з інтенсивним і повільним ростом показало, що десять інтенсивнорослих штамів ризобій сої, які виділені з ґрунтів різних регіонів України, позитивно реагували виключно з антисироваткою до штаму КВ1–1 і не реагували з сироватками до повільнорослих штамів 6346, М8 та 46. Отримані дані засвідчують, що штами з інтенсивним ростом, різного еколого-географічного походження, чітко відокремлені від повільнорослих ризобій сої за серологічними ознаками і можуть бути об'єднані в одну серогрупу.

Десять досліджених повільнорослих штамів бульбочкових бактерій сої виявилися серологічно гетерогенними і були віднесені нами до чотирьох серогруп.

Для підтвердження видового статусу повільнорослих штамів ризобій сої і з'ясування таксономічного положення інтенсивнорослих мікросимбіонтів сої порівнювали індивідуальні 16S рРНК послідовності цих штамів із сиквенсами, що містяться в базі даних GenBank (табл. 3). За результатами сиквенсу фрагментів генів 16S рРНК повільнорослі штами 46 та КС2–3 показали високий рівень ідентичності (99,6%) з типовим штамом *B. japonicum* ATCC 10324 (U 69638), депонованим у GenBank, а також з іншими видами бульбочкових бактерій (99,8%): *B. yuanmingense* та *B. liaoningense*. На підставі фенотипної та генотипної подібності штамів 46 і КС2–3 з типовим штамом ризобій сої підтверджено їх належність до виду *B. japonicum*.

Встановлено, що інтенсивнорослі штами ризобій сої КС1–9 і КВ1–1 виявляють подібність (99,6% та 99,7 % ідентичності) у структурі фрагментів гена 16S рРНК з типовим штамом *B. japonicum* ATCC 10324. При цьому рівень генетичної спорідненості цих штамів з іншими видами ризобій: *B. lupini*, *B. yuanmingense*, *B. canariense* та *Mesorhizobium loti*, також достатньо високий (98,9–99,8% ідентичності).

Значні відмінності інтенсивнорослих штамів бульбочкових бактерій сої від повільнорослих за фенотипними, серологічними, хемотаксономічними ознаками, а також високий ступінь подібності фрагментів 16S рРНК з генами інших видів ризобій не дають змоги провести їх видову ідентифікацію, лише дозволяють віднести їх до роду *Bradyrhizobium*.

Таким чином, нами вперше встановлено, що популяції бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України представлені двома групами штамів: з інтенсивним та повільним ростом. Виділені штами мають комплекс характерних ознак і істотно розрізняються за біологічними властивостями.

Таблиця 3. Результати сиквенування фрагментів 16S рРНК бульбочкових бактерій сої

Номер досліджуваного штаму	Назва виду і номер референс-штаму в нуклеотидній базі GenBank	Довжина фрагмента 16S рРНК, що порівнюється	Ідентичність послідовностей, %
Повільнорослі штами			
В-209 ^T =	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1080	99,9
VKM 1967 =	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> CCBAU 23019 DQ 993279	1075	99,9
ATCC 10324	<i>Bradyrhizobium lupini</i> X 87273	1079	99,8
46	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1053	99,6
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 4 AF 208515	1056	99,9
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 53119 EF 394145	1053	99,8
КС2-3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1025	99,6
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 4 AF 208515	1028	99,9
	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> 2281 AF 363132	998	99,8
Інтенсивнорослі штами			
КВ1-1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	1164	99,7
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123 AF 363151	1167	99,9
	<i>Bradyrhizobium canariense</i> AB 195986	1158	98,9
	<i>Bradyrhizobium lupini</i> U 69637	1165	99,7
КС1-9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ATCC 10324 U 69638	920	99,6
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6153 FJ 025097	921	99,8
	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> R10m EU 364715	920	99,6
	<i>Mesorhizobium loti</i> AB 367700	921	99,8

Для уточнення видової належності інтенсивнорослих штамів бульбочкових бактерій сої необхідні подальші дослідження із застосуванням генетичних підходів, зокрема ДНК-ДНК гібридизації.

Робота виконана за рахунок коштів для підтримки об'єкта національного надбання – “Коллекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН”.

1. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. Part A + B + C // Eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley; Editor-in-chief G. M. Garrity. – 2nd ed. – New York: Springer, 2005. – Vol. 2. – 2800 p.*
2. *Willems A. The taxonomy of rhizobia: an overview // Plant and Soil. – 2006. – 287. – P. 3–14.*
3. *Spraink H., Kondorosi A., Hooykaas P. Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria / Рус. пер. И. А. Тихоновича, Н. А. Проворова. – Ст.-Петербург: ИПК-Бионт, 2002. – 568 с.*
4. *Патика В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот. – Київ: Світ, 2003. – 424 с.*
5. *Большой практикум по микробиологии / Под общ. ред. Г. Л. Селибера. – Москва: Высш. шк., 1962. – 491 с.*
6. *Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности / Отв. ред. О. А. Берестецкий. – Ленинград, 1979. – 33 с.*
7. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. – 2-е изд. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.*
8. *Крутыло Д. В., Надкernична О. В., Ковалевська Т. М., Патика В. П. Біологічна різноманітність бульбочкових бактерій сої в ґрунтах України // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 6. – С. 27–34.*
9. *Кэбот Э., Мейер Б. Экспериментальная иммунология. – Москва: Медицина, 1968. – 677 с.*
10. *Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. – 1991. – 173. – P. 697–703.*

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

Надійшло до редакції 11.12.2009

**V. P. Patyka, D. V. Krutylo, O. V. Nadkernychna, T. M. Kovalevska,
V. G. Spyridonov, I. V. Volkova**

Phenotypic and genotypic signs of soybean nodule bacteria widespread in soils of Ukraine

For the first time, the strains with intensive growth have been discovered among the microsymbionts of soybean in Ukraine soils. It is established that these strains are specific to the host-plant, but differ in colony morphology, growth-rate, antibiotics sensitivity, and ability to use carbohydrates. The similarity in fatty acids spectra is marked for the strain with the intensive growth KB1-1 and slow-growing strains 634b and KC2-3. The presence of xylose (2.7%) and the raised contents of rhamnose (18.4%) differentiate EPS of strain KB1-1 and EPS of strains KC2-3 and 634b. Investigated intensive-growing strains were combined in one serotype (strain KB1-1). Analysis of sequences of the 16S rRNA genes of these strains allowed attributing them to the Bradyrhizobium genus.