

**РІСТ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПРИ
КУЛЬТИВУВАННІ У ГЕЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ**

Каменєва І.О.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН України,
вул. К. Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513
E-mail: irina.kameneva.7@mail.ru

*Досліджено вплив екзополісахаридакриламідру (ЕПАА) у рідкому середовищі на ріст, зберігання життєздатності і вірулентності ризобій сої за умов періодичного культивування. Відмічено, що при загущуванні середовища типр *Bradyrhizobium japonicum* М-8 та В. японісит 36 збільшується на 31,4 та 79,4 %, відповідно. У фазу експоненційного росту відмічено тенденцію підвищення ростової активності ризобій за умов культивування в гелльному середовищі. Встановлено, що В. японісит 36 чутливіший, ніж В. японісит М-8 до змін у складі середовища та умов культивування. Абсолютна швидкість росту В. японісит 36 у 5 разів збільшилася, а час генерації зменшився майже у 3 рази в порівнянні з рідким середовищем. Життєздатність обох штамів ризобій і їх вірулентність зберігаються впродовж п'яти місяців. Встановлено, що ЕПАА є технологічною добавкою для загущення середовища і стабілізації отриманого гелльного препарату на основі бульбочкових бактерій сої.*

Ключові слова: *ризобії, *Bradyrhizobium japonicum*, типр, життєздатність, вірулентність, гелльний препарат.*

Передпосівна обробка насіння ризобіями є екологічно і економічно доцільним прийомом підвищення продуктивності рослин у сучасних агротехнологіях вирощування бобових культур [1, 2]. Сільськогосподарський ринок України має великий асортимент вітчизняних та імпортованих мікробних препаратів на основі вискоєфективних штамів бульбочкових бактерій і попит на них зростає. Разом з тим підвищуються вимоги щодо якості і конкурентоспроможності інокулянтів. Найкращими вважаються поліфункціональні біопрепарати з тривалим терміном зберігання життєздатності і функціональної активності клітин, низькозатратні при виготовленні та технологічні при застосуванні.

Перспективним напрямом у мікробіологічному виробництві

є геліні (желеподібні) препарати на основі агрономічно-корисних мікроорганізмів. В основу розробки геліного препарату було закладено здатність ґрунтових мікроорганізмів різних таксономічних груп до синтезу екзополісахаридів (ЕПС) і збільшення їх чисельності при оптимізації середовища і умов культивування [3].

Більшість бульбочкових бактерій, зокрема сої, при культивуванні у рідких середовищах синтезують недостатню кількість ЕПС для гелеутворення [4]. Один із способів отримання геліних препаратів базується на використанні загущувачів різного походження. Отже пошук компонентів геліного субстрату для культивування ризобій сої є актуальним питанням у технології одержання мікробних препаратів.

У рослинництві як прилипач пестицидів та регуляторів росту рослин широко застосовують препарат екзополісахарид-акриламід (ЕПАА-10) [5]. У мікробіології ЕПАА рекомендується для часткової заміни агар-агару у щільних поживних середовищах при культивуванні деяких мікроорганізмів [6].

Метою нашої роботи було дослідити ріст, зберігання життєздатності і вірулентності ризобій сої за умов культивування у геліному субстраті.

Матеріали і методи. Об'єктами наших досліджень були виробничий і перспективний штами *Bradyrhizobium japonicum* М-8 (В-7198) і *B. japonicum* 36 (В-1798), отримані методом аналітичної селекції у Південній дослідній станції Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН. Штами є біологічною основою мікробного препарату Ризобофіту, який в Україні застосовують для передпосівної обробки насіння сої (*Glycine max* (L.) Merr).

Розробку технології виготовлення геліного препарату проводили за методичними рекомендаціями А.В. Хотяновича [7]. Як компонент при формуванні геліного середовища використовували біологічний гелі – препарат екзополісахаридакриламід (ЕПАА-10). Загущувач вносили у рідке поживне середовище, рекомендоване для культивування *B. japonicum* у експериментально встановленій кількості – 5 % від об'єму поживного середовища.

Рідкий та геліний препарати отримували за умов періодичного культивування ризобій на качалці зі швидкістю 220 обертів на хвилину при 25-28 °С. Титр препаратів визначали шляхом серійних розведень з наступним висівом в агаризоване горохове середовище

[8]. Динаміку росту культур вивчали за умов періодичного культивування впродовж 60 годин з моменту інокуляції середовища та розраховували кінетичні показники у фазу інтенсивного росту бактерій [9].

Динамічну в'язкість культур визначали за допомогою капілярного віскозиметра ВПЖ-2, дотримуючись правил роботи з віскозиметром [10].

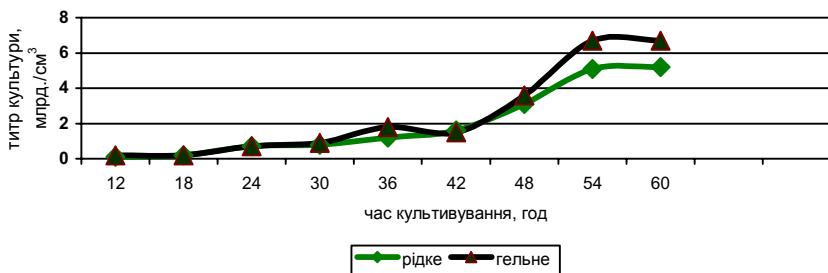
При визначенні тривалості зберігання життєздатності і вірулентності ризобій отримані препарати зберігали у об'ємах, що відповідають одній порції препарату на гектар, при температурі 5-8 °С. Вермикулітний препарат виготовляли за технічними умовами ТУ У 319.00494456-006-2002.

Вірулентність бульбочкових бактерій вивчали у вегетаційних дослідках у посудинах об'ємом 250 мл з стерильним вермикулітом [11]. Підготовлене насіння сої [12] сорту Аннушка обробляли водною суспензією бактерій, дотримуючись рекомендацій застосування рідкого і сипучого препаратів [7]. Статистичну обробку одержаних результатів проводили методом дисперсійного аналізу [13].

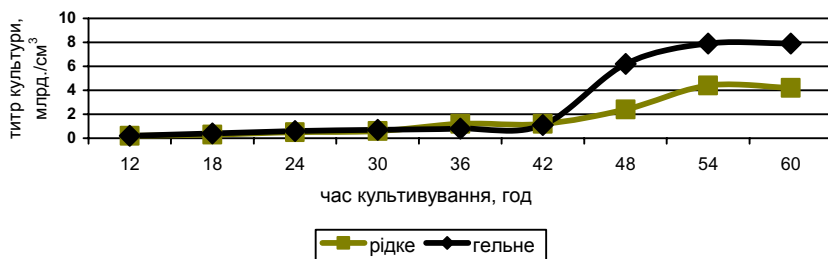
Результати та їх обговорення. Попередні дослідження показали, що в агаризованому середовищі з частковою заміною агару екзополісахаридакриламідом (ЕПАА) не змінюються морфологічні властивості *B. japonicum* [14]. Встановлено, що ЕПАА є перспективним загущувачем для отримання гельних препаратів на основі технологічних і перспективних штамів різних мікроорганізмів, у тому числі ризобій [15].

На наступному етапі досліджували вплив ЕПАА на ріст *B. japonicum* за періодичного культивування у виробничому рідкому середовищі. Дослідження динаміки розвитку бульбочкових бактерій сої (рис. 1) у гельному субстраті не виявили зміни характеру росту, але максимальний титр *B. japonicum* М-8 та *B. japonicum* 36, зареєстрований через 54 години культивування, був більшим, ніж у рідкому середовищі, на 31,4 та 79,4 %, відповідно.

У гельному субстраті відмічено підвищення ростової активності ризобій (табл. 1), яка більше виражена у *B. japonicum* 36. Так, при культивуванні *B. japonicum* 36 у гельному субстраті абсолютна швидкість росту бактерій збільшилась у 5 разів, а час генерацій зменшився майже у 3 рази в порівнянні з рідким середовищем.



a) штам *V. jaronicum* M-8



b) штам *V. jaronicum* 36

Рис. 1. Динаміка росту *V. jaronicum* у геліному та рідкому середовищах

Таблиця 1. Активність росту *V. jaronicum* за умов культивування у геліному субстраті

Показники	<i>V. jaronicum</i> 36		<i>V. jaronicum</i> M-8	
	рідкий	гельний	рідкий	гельний
Максимальний титр бактерій, млрд в 1 см ³	4,4	7,9	5,2	6,7
Абсолютна швидкість росту, млрд в 1 см ³ /год.	0,1	0,5	0,1	0,1
Питома швидкість росту, год ⁻¹	0,06	0,1	0,05	0,06
Час генерацій, год.	12	4,6	15	12
Кількість поколінь	1,0	2,6	1,6	2,0

Загущення середовища за внесення полімеру ЕПАА у встановленій нами кількості збільшує його коефіцієнт в'язкості в 1,7 раза, при цьому відбувається стимуляція синтезу ЕПС

B. japonicum і збільшення в'язкості на 31,7-33,1 % (рис. 2). Після культивування бактерій в'язкість рідкого середовища з *B. japonicum* на 8,5-11,1 % перевищує контроль.

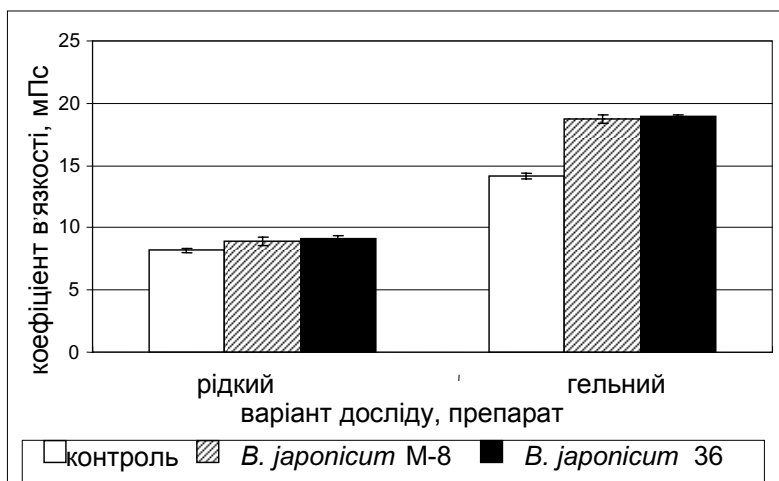


Рис. 2. Зміна в'язкості культур бульбочкових бактерій сої за умов культивування у гелі середовищі

Важливою технологічною характеристикою мікробних препаратів є тривалість їх зберігання. Встановлено, що у гелі препараті збільшується термін зберігання життєздатності різобій сої до п'яти місяців (табл. 2), тоді як титр рідкого препарату вже через три місяці зберігання суттєво знижується у порівнянні з вихідним. Що характеризує ЕПАА і як ефективний стабілізуючий компонент при формуванні гелі середовища для культивування *B. japonicum*.

У біотехнології створення мікробних препаратів на основі бульбочкових бактерій сої, поряд з життєздатністю клітин, актуальною проблемою залишається зберігання їх вірулентності. Відмічено, що у гелі препараті *B. japonicum* 36 тривалий час зберігає здатність колонізувати коріння сої. У вегетаційному досліді ми отримали 100 % утворення бульбочок у варіантах з гелі препаратом при зберіганні впродовж 5 місяців. За кількістю бульбочок суттєвої різниці між свіжовиготовленими геліним і вермикультурним препаратами не виявлено (рис. 3). Аналогічні результати отримано при дослідженні вірулентності *B. japonicum* M-8.

Таблиця 2. Зберігання життєздатності *B. japonicum* у геліному препараті

Форма препарату	Титр бактерій при зберіганні препаратів, млрд КУО/см ³				
	вихідний	1 місяць	3 місяці	4 місяці	5 місяців
<i>B. japonicum</i> М-8					
Рідка	7,3±0,02	4,7±0,01	0,2±0,06	0	не визн.
Гельна	6,0±0,00	3,5±0,05	2,7 ±0,01	2,0±0,01	0,8±0,06
<i>B. japonicum</i> 36					
Рідка	4,9±0,04	2,1±0,01	0,7±0,06	0	не визн.
Гельна	3,7±0,00	3,5±0,05	2,3 ±0,01	1,8±0,01	0,6±0,06

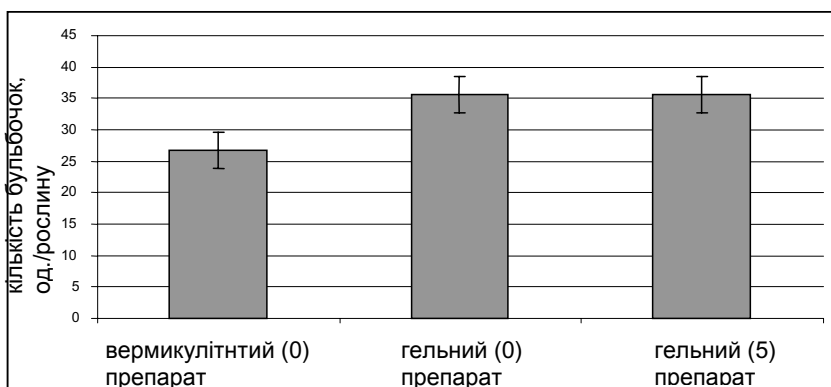


Рис. 3. Зберігання вірулентності *B. japonicum* 36 у геліному препараті (у дужках зазначено термін зберігання, місяці)

Таким чином, проведені дослідження показали, що за умов періодичного культивування у геліному середовищі з ЕПАА у фазу інтенсивного росту підвищується ростова активність ризобій, збільшується термін зберігання їх життєздатності і вірулентності. Перспективний штам *B. japonicum* 36 виявився чутливішим до зміни умов культивування при загущуванні середовища, що проявилось у збільшенні швидкості росту бактерій у 5 разів і зменшенні часу генерацій майже у 3 рази в порівнянні з рідким середовищем. Встановлено, що ЕПАА є перспективною технологічною добавкою для загущення середовища і стабілізації отриманого геліного препарату на основі бульбочкових бактерій сої.

1. Потенциальные возможности симбиотической азотфиксации при выращивании сои на юге Украины /Толкачев Н.З. //Мікробіол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4. – С. 34-41.

2. Біологічний азот /[Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.]. – К.: Світ, 2003 – 422 с.

3. Пат. № 56032 Україна, МПК (2002) C05F 11/08 C12N 1/20. Спосіб виготовлення препарату на основі азотфіксуєючих бактерій–продуцентів екзополісахаридів /Патика В.П., Мельничук Т.М., Шерстобоев М.К. та ін. – заявл. 12.09.2002; опубл. 17. 01.2005, Бюл. № 1.

4. Шерстобоева Е.В. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения /Шерстобоева Е.В., Дудинова И.А., Крамаренко С.Н., Шерстобоев Н.К. //Мікробіол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4.– С. 109-116.

5. Воцелко С.К. ЕПАА – універсальний біологічний прилипач пестицидів і регуляторів росту рослин (Методичні рекомендації) //Воцелко С.К., Гвоздяк Р.І., Данькевич Л.А, Литвинчук О.О., Патика В.П. – К., 2007. – 26 с.

6. Ващенко Л.Н. Желирующие свойства экзополисахаридакриламида в композиции с агар-агаром /Ващенко Л.Н., Литвинчук О.А., Гвоздяк Р.И., Воцелко С.К. //Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 37-43.

7. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе /А.В. Хотянович. – Л., 1991, – 60 с.

8. Большой практикум по микробиологии /под ред Б.А. Селибера. – М.: Высшая школа, 1962. – С. 490.

9. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія /Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2004. – С. 124-125.

10. Балезин С.А. Определение вязкости при помощи капиллярного вискозиметра /Балезин С.А. //Практикум по физической и коллоидной химии. – М.: Просвещение, 1972. – С. 249-256.

11. Толкачев Н.З. Модифицированный метод определения количества клубеньковых бактерий сои в почве /Толкачев Н.З. //Тр. ВНИИСМ. – 1990. – Т. 60. – С. 37-43.

12. Бегун С.А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции (методические рекомендации) /С.А. Бегун, В.А. Тильба. – Благовещенск, 2005. – 70 с.

13. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) /А.Б. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

14. Kameneva I.A. Peculiarity of manufacturing of gel preparation on the

basis of *Bradyrhizobium japonicum* and *Mesorhizobium ciceri* /Каменева І.А., Gritchina L.J. //Int. Sci. Conf. «S.P. Kostychev and contemporary agricultural microbiology» (Yalta, October 8-12, 2007): abstr. – Yalta, 2007. – P. 108.

15. Перспектива розробки гельних препаратів на основі агрономічно корисних мікроорганізмів /[Каменева І.А., Грігчина Л.Ю., Мельничук Т.М. та ін.] //XII з'їзд Товариства мікробіологів України (Ужгород, 25-30 травня 2009 р.): тез. доп. – Ужгород, 2009. – С. 376.

РОСТ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ГЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

Каменева И.А.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины, пгт. Гвардейское

*Исследовано влияние экзополисахаридакриламида (ЭПАА) в жидкой среде на рост, сохранение жизнеспособности и вирулентности ризобий сои в условиях периодического культивирования. Отмечено, что при сгущении среды типр *B. japonicum* М-8 и *B. japonicum* 36 увеличивается на 31,4 и 79,4 %, соответственно. В фазе экспоненциального роста отмечена тенденция повышения ростовой активности ризобий в гельной среде. Установлено, что *B. japonicum* 36 более чувствителен, чем *B. japonicum* М-8 к изменениям в составе среды и условий культивирования. Абсолютная скорость роста *B. japonicum* 36 в 5 раз увеличилась, а время генерации уменьшилось почти в 3 раза по сравнению с жидкой средой. Жизнеспособность обоих штаммов ризобий и их вирулентность сохраняется на протяжении пяти месяцев. Установлено, что ЭПАА является технологической добавкой для сгущения среды и стабилизации полученного гельного препарата на основе клубеньковых бактерий сои.*

*Ключевые слова: ризобии, *Bradyrhizobium japonicum*, типр, жизнеспособность, вирулентность, гельний препарат.*

THE GROWTH OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AT CULTIVATION IN THE GEL MEDIUM

Kameneva I.O.

South Experimental Station of Institute of Agricultural Microbiology,
NAAS of Ukraine, Gvardeyskoe

The influence of exopolysaccharideacrylamide (EPAA) in a liquid medium on the growth, retaining of viability and virulence of soybean rhizobia under the periodic cultivation conditions was investigated. It was observed that maximum titer of B. japonicum M-8 (B-7198) and B. japonicum 36 (B-1798) at thickening of medium has increased by 31.4% and 79.4% respectively. In the phase of exponential growth the upward trend in growth activity of rhizobia in the gel medium was observed. It was shown that the B. japonicum 36 is more sensitive than B. japonicum M-8 to the changes in the medium composition and the cultivation conditions. Absolute speed of B. japonicum 36 growth has increased in 5 times while the generation time has decreased in almost 3 times in comparison to the liquid medium. The viability and virulence of both rhizobium strains have remained over five months. It was established that the EPAA is a technological agent for the medium thickening and stabilization of the created on the basis of the soybean nodule bacteria gel preparation.

Key words: rhizobium, *Bradyrhizobium japonicum*, titre, viability, virulence, gel preparation.