

УДК 631.847.211:633.34

ВПЛИВ СПОСОБІВ ЗБЕРІГАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ СОЇ

**Т. М. Ковалевська, Д. В. Крутило,
В. П. Горбань, І. М. Романова, Т. О. Усманова**

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: kovalevskatm@mail.ru

*Вивчено життєздатність та симбіотичні властивості виробничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 46 після тривалого зберігання різними способами. Встановлено, що досліджуваний штаб у ході зберігання в сублімовано-висушеному стані та за періодичних пересівів не втрачає здатності до активного симбіозу з соєю. За тривалого підтримання під шаром мінерального масла симбіотичні властивості (вірулентність, азотфіксувальна активність, конкурентоздатність) штаму повністю не відновлюються.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, симбіотичні властивості, соя, тривале зберігання.

Численними дослідженнями встановлено, що ефективність симбіозу бульбочкових бактерій з бобовими рослинами можна підвищити, використовуючи для інокуляції активні та конкурентоздатні штами бактерій. Селекція ризобій за ознакою симбіотичної активності та гарантоване збереження перспективних штамів у колекціях є важливою складовою наукових досліджень зі створення нових мікробних препаратів для бобових культур.

У зв'язку зі збільшенням попиту на біопрепарати, також зростає потреба виробництва постійно мати у своєму розпорядженні життєздатні і стабільні за всіма показниками культури мікроорганізмів. Тому великого практичного значення набуває відпрацювання методів тривалого зберігання перспективних штамів бульбочкових бактерій, які б забезпечували стабільність їх виробничо-цінних властивостей [1].

У колекціях для підтримання бульбочкових бактерій в основному використовують методи ліофілізації, кріоконсервації, періодичних пересівів та зберігання під шаром мінерального масла. Перевагою двох останніх методів є їх простота, технічна доступність, а також можливість тривалий час підтримувати мікроорганізми у метаболічно ак-

тивному стані. До недоліків слід віднести необхідність регулярного відновлення культур, що збільшує ризик зараження сторонньою мікрофлорою та виникнення спонтанних мутацій, які знецінюють колекційні штами. Найбільш поширеним та ефективним методом довготривалого зберігання ризобій є ліофілізація. За даними співробітників кафедри мікробіології МДУ [2] штами бульбочкових бактерій гороху, конюшини, люцерни залишалися життєздатними впродовж 33–34 років зберігання (кількість життєздатних клітин складала $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^7$ клітин у ампулі). Разом із тим, у процесі сублімаційного висушування бактерії зазнають жорсткого впливу низьких температур та вакууму, що також може супроводжуватись генетичними змінами та втратою властивостей штамів.

Дослідження умов тривалого зберігання перспективних штамів бульбочкових бактерій нами розпочато у 2006 році. Зважаючи на те, що основною вимогою до колекцій ризобій є гарантія збереженості симбіотичних властивостей, значна увага приділялася вивченню функціональної активності штамів, закладених на тривале зберігання.

Метою даної роботи було вивчення впливу різних способів зберігання на життєздатність та симбіотичні властивості ви-

робничого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 46.

Матеріали й методи. У роботі використовували виробничий штам *B. japonicum* 46 (В-23), який зберігається в колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН [3; 4].

Штам *B. japonicum* 46 виділений у 1995 р., підтримується в колекції методом періодичних пересівів. У 2006 р. цей штам закладено на тривале зберігання під шар мінерального масла та в 2007 р. у сублімовано-висушеному стані.

Для сублімаційного висушування культуру *B. japonicum* 46 вирощували на скосах бобового (люпинового) агару до початку стаціонарної фази росту. Використовували захисне сахарозо-желатинове середовище (10:1). Сублімаційне висушування бактерій проводили на базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Чисельність життєздатних клітин у зразках після ліофілізації та через 5 і 6 років зберігання визначали методом граничних розведень шляхом підрахунку кількості колоній на поверхні агаризованого бобового середовища.

Культуру для підтримання під мінеральним маслом вирощували на твердому і напіврідкому (0,3 % агар-агару) бобовому середовищі до стаціонарної фази росту, заливали стерильним мінеральним маслом шаром 1,5 см та зберігали за кімнатної температури. Життєздатність бактерій досліджували методом виснажуючого посіву на 4 сектори поверхні агаризованого живильного середовища. Визначали число колонізованих бактеріями секторів та оцінювали активність культури за 4-бальною шкалою. Після тривалого зберігання культури бульбочкових бактерій відновлювали, тричі пересіваючи на оптимальне живильне середовище.

Симбіотичні властивості та ефективність штаму *B. japonicum* 46 після зберігання різними способами досліджували впродовж 2012–2013 рр. в умовах польових дослідів на чорноземі вилугуваному з такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі (за Тюрнімом) — 3,5 %; азоту, що легко гідролізується (за Корнфілдом) — 95,0 мг; рухомих форм фосфору (P_2O_5) (за Кірсановим) — 251 мг; обмінного калію (K_2O) (за Кірсановим) — 108 мг на 1 кг ґрунту (дос-

лідне поле Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН). У дослідях використовували сою сорту Устя. Перед посівом насіння сої обробляли суспензією мікроорганізмів із розрахунку 200–300 клітин на 1 насінину. Площа облікової ділянки 5,0 м², повторність чотирикратна.

Закладку дослідів, відбір зразків, облік урожаю здійснювали згідно з існуючими правилами. У фазах бутонізації, цвітіння та наливу бобів підраховували кількість бульбочок, визначали їхню масу та нітрогеназну активність [5].

Конкурентоздатність (відношення кількості утворених штамом бульбочок до загальної кількості досліджених бульбочок із кожного варіанту, виражене у відсотках) штаму *B. japonicum* 46 після тривалого зберігання оцінювали з використанням реакції аглютинації.

У роботі використовували антисироватки до штаму *B. japonicum* 46 та до трьох типових представників бульбочкових бактерій сої: *B. japonicum* М-8, *B. japonicum* KB11, *B. japonicum* 634б. Антисироватки отримували раніше описаним методом (методика ВНДІСГМ у нашій модифікації) [6].

Активність симбіотичної азотфіксації визначали ацетиленовим методом [7] на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яно-іонізаційним детектором (колонка з β - β' -оксидіпропіонітрилом). Температура термостату 50 °С. Витрата газів: водню — 30 мл/хв., азоту — 100 мл/хв., повітря — 500 мл/хв.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за Б. О. Доспеховим [8] з використанням комп'ютерної програми Statistica 7.0.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що після 6- та 7-річного терміну зберігання під шаром мінерального масла рівень виживання досліджуваної культури бульбочкових бактерій досить високий. При висіві на повноцінне бобове середовище ріст ризобій за 4-бальною шкалою оцінювали у 3 бали. Встановлено залежність збереження бактерій від концентрації агар-агару в середовищі: на агаризованому середовищі (2,0 % агар-агару) вони залишаються життєздатними до 3–4 років, на напіврідкому (0,3 % агар-агару) — до 7 років. Морфологічні зміни, які спостеріга-

лись у бульбочкових бактерій за умов тривалого зберігання під шаром масла, зникали після декількох пасажів на повноцінному живильному середовищі.

Аналогічні результати отримані при відновленні культури *V. japonicum* 46 після тривалого зберігання у сублімаційно-висушеному стані. За 5 років зберігання титр життєздатних клітин ризобій знизився на один порядок — з $5,35 \cdot 10^9$ КУО/мл (титр бактерій безпосередньо після висушування) до $5,70 \cdot 10^8$ КУО/мл. При подальшому зберіганні впродовж року спостерігали незначне зниження числа життєздатних клітин до $4,80 \cdot 10^8$ КУО/мл. У першому пасажі після відновлення відмічено подовження lag-фази росту бульбочкових бактерій — окремі колонії з'являлися на поверхні агару на 8–10-ту добу культивування.

Слід відмітити, що незалежно від способу консервації, впродовж 6–7 років спостережень штам *V. japonicum* 46 зберігав свої морфолого-культуральні ознаки. Після 3 пасажів на оптимальному середовищі (бобовий агар) життєздатність та морфологічні властивості бактерій повністю відновлювалися.

Для з'ясування впливу різних способів зберігання штаму *V. japonicum* 46 на його симбіотичну активність та ефективність, було проведено два польових досліді. Слід відмітити, що у ґрунті дослідного поля виявлено нечисленну місцеву популяцію ризобій, яка забезпечувала утворення незначної кількості бульбочок (1–3 од./рослину) на коренях контрольних рослин.

Як видно з даних, наведених на рис. 1, незалежно від способу підтримання штам

V. japonicum 46 зберігав високу вірулентність, що дозволяло йому в перші фази розвитку рослин утворювати у 5–9 разів більше бульбочок порівняно з контролем. У фазі наливу бобів різниця між показниками кількості бульбочок у контрольному та дослідних варіантах була ще більш помітною.

Упродовж вегетаційного періоду маса бульбочок на коренях інокульованих рослин також була значно більшою порівняно з рослинами контрольного варіанту (рис. 2). Аналіз динаміки формування бульбочок свідчить, що у культур *V. japonicum* 46, які періодично пересівалися та підтримувалися у ліофілізованому стані, здатність до формування бульбочок збереглася значно краще, ніж у культури, що перебувала під шаром мінерального масла. У фазі наливу бобів у цьому варіанті відмічено меншу у 1,5–1,7 рази масу бульбочок порівняно із варіантами з періодичним пересівом бактерій та ліофілізацією.

Ця ж закономірність спостерігалася при аналізі азотфіксувальної активності штаму *V. japonicum* 46. Як видно з наведених даних (рис. 3), досліджуваний штам у процесі тривалого зберігання різними способами не втратив здатності до фіксації азоту. У фазі бутонізації – цвітіння у рослин дослідних варіантів рівень азотфіксації був у 4,9–7,4 рази вищий порівняно з контролем.

У фазі наливу бобів спостерігалася зниження активності фіксації азоту: у варіантах з інокуляцією до 10,5–11,3 мкг N/рослину за годину, у контрольному варіанті — до 0,16 мкг N/рослину за годину. Найвищі показники азотфіксації (21,2–40,2 мкг N/рослину за годину) відмічено у варіанті з інокуля-

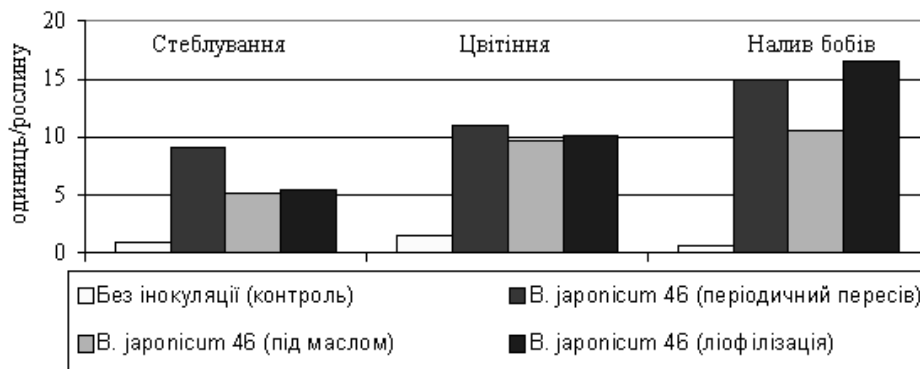


Рис. 1. Кількість бульбочок на коренях сої за різних способів зберігання штаму *V. japonicum* 46 (польовий дослід, 2012 р.).

Примітка: $HP_{05} = 0,82$ (стеблування), $HP_{05} = 1,41$ (цвітіння), $HP_{05} = 1,40$ (налив бобів).

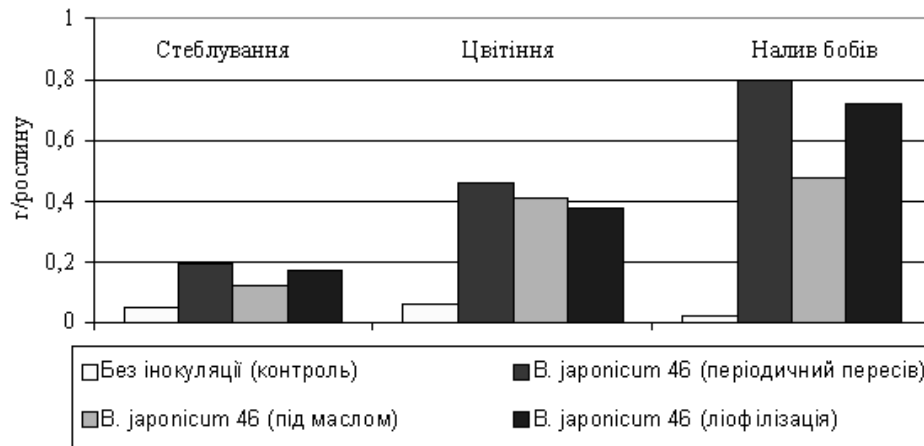


Рис. 2. Маса бульбочок на корнях сої за різних способів зберігання штаму *V. japonicum* 46 (польовий дослід, 2012 р.).

Примітка: $НІР_{05} = 0,04$ (стеблування), $НІР_{05} = 0,06$ (цвітіння), $НІР_{05} = 0,07$ (налив бобів).

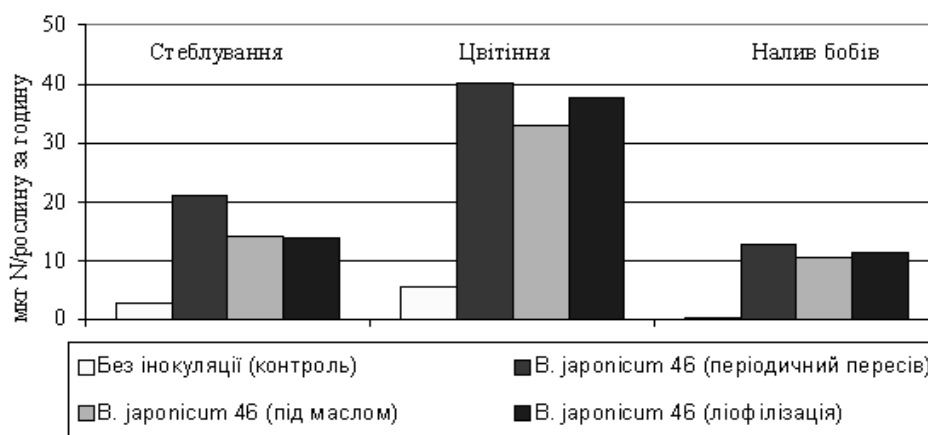


Рис. 3. Нітрогеназна активність бульбочок на корнях сої за різних способів зберігання штаму *V. japonicum* 46 (польовий дослід, 2012 р.).

Примітка: $НІР_{05} = 3,76$ (стеблування), $НІР_{05} = 7,02$ (цвітіння), $НІР_{05} = 1,98$ (налив бобів).

цією культурою *V. japonicum* 46, яка зберігалася методом періодичних пересівів.

Важливою характеристикою активності штаму та здатності до утворення ефективної симбіотичної системи є його конкурентоздатність. За результатами серологічного аналізу 50 бульбочок контрольного варіанту досліджу встановлено, що до складу нечисленної ґрунтової популяції ризобій входять представники двох серогруп — KB11 та M8 (рис. 4). Незалежно від способу підтримання штаму *V. japonicum* 46 зберігав конкурентну здатність і утворював від 66,7 % до 91,7 % бульбочок на корнях рослин. Представники ґрунтової популяції були менш конкурентоздатними, кількість бульбочок, сформованих за їх участі, не перевищувала 8,3 %–20,8 %. Слід відмітити, що при зберіганні під шаром масла, поряд з іншими симбіотичними властивостями, також знижувалася здатність *V. japonicum* 46 до конкуренції за інфікуван-

ня рослини-господаря.

У 2013 році процес формування бульбочок на корнях рослин сої був менш інтенсивним порівняно з попереднім роком (табл. 1). У першу чергу це можна пояснити спекотною, сухою погодою в травні і першій декаді червня та низькою вологістю ґрунту. Разом з тим, наведені в таблиці дані підтверджують, що штаму *V. japonicum* 46 після тривалого зберігання не втратив здатності до симбіозу з соєю.

Спосіб зберігання помітно впливав на симбіотичну активність бульбочкових бактерій сої. Так, після семирічного підтримання під шаром мінерального масла здатність до нодуляції та азотфіксації у досліджуваного штаму виявилися нижчою, ніж при зберіганні іншими методами.

Слід зазначити, що у бульбочках, відібраних для аналізу в контрольному варіанті досліджу, виявлено ризобії, які належать лише

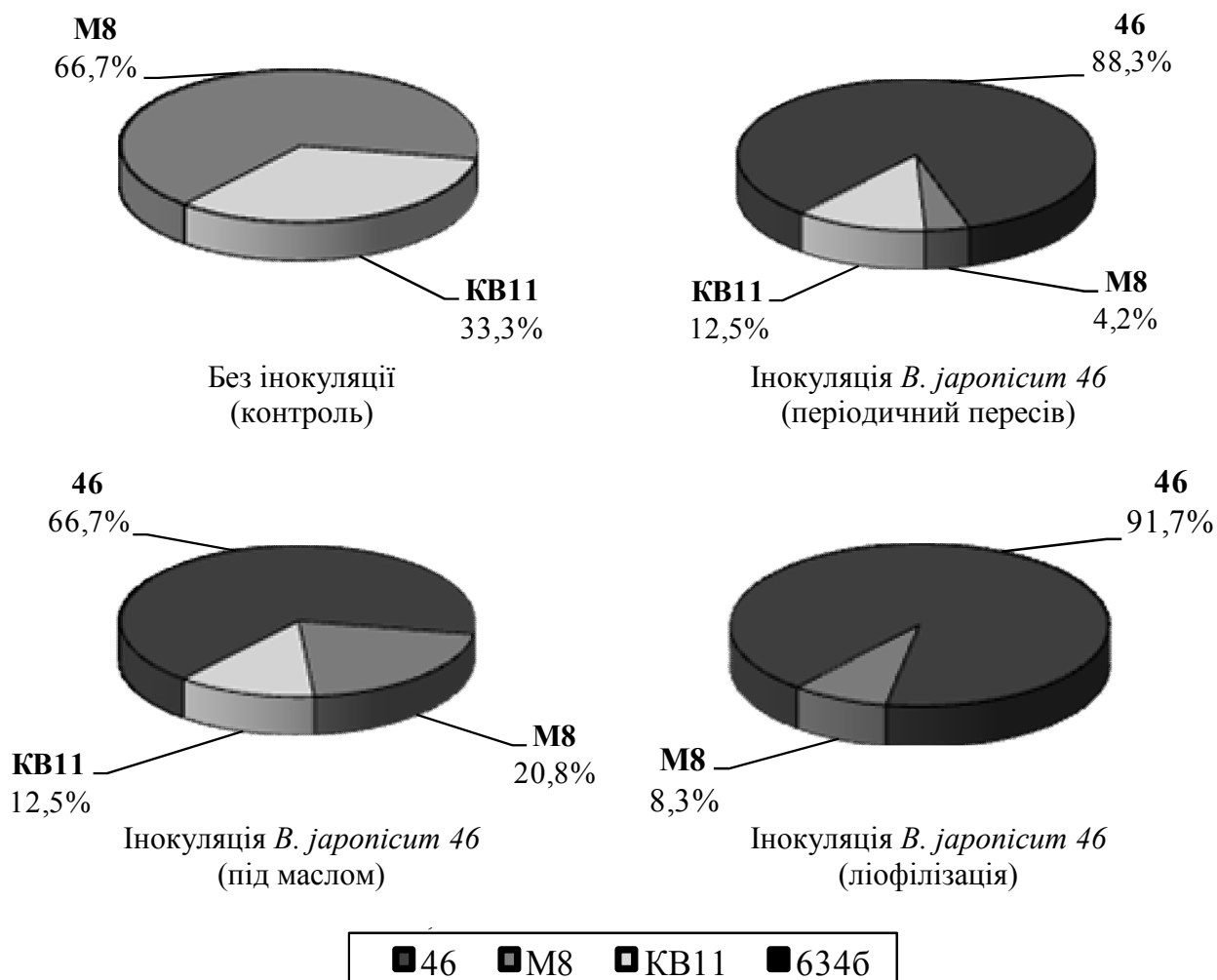


Рис. 4. Конкуентоздатність штаму *V. jarrowii* 46 за різних способів зберігання (польовий дослід, 2012 р.)

Таблиця 1. Симбіотичні властивості штаму *V. jarrowii* 46 за різних способів зберігання (польовий дослід, 2013 р.)

Варіанти дослідів	Кількість бульбочок, од./рослину		Маса бульбочок, г/рослину		Активність симбіотичної азотфіксації, мкг N/рослину за год.	
	цвітіння	налив бобів	цвітіння	налив бобів	цвітіння	налив бобів
Без інокуляції (контроль)	1,17	2,67	0,10	0,12	0,89	4,39
Інокуляція						
<i>V. jarrowii</i> 46 (періодичний пересів)	5,58	9,08	0,17	0,34	6,33	14,59
<i>V. jarrowii</i> 46 (під маслом)	4,83	6,58	0,14	0,29	4,59	11,40
<i>V. jarrowii</i> 46 (ліофілізація)	5,50	8,50	0,16	0,27	5,32	12,56
НІР ₀₅	1,45	2,18	0,05	0,04	1,66	2,04

до однієї серогрупи М8. Штам *V. jarrowii* 46, незалежно від способу його зберігання, був конкурентоздатним по відношенню до місцевої (грунтової) популяції ризобій.

Про його домінування свідчать результати серологічного аналізу: від 66,7 % до 79,2 % бульбочок було утворено за участі цього штаму. Як і у 2012 році, найменшу кількість бульбочок утворював штаму *V. japoricum* 46, який зберігався під шаром мінерального масла (рис. 5).

Тривале підтримання виробничого штаму *V. japoricum* 46 у колекції істотно не вплинуло на його ефективність (табл. 2). У середньому за два роки урожайність сої порівняно з контролем зростає на 16,4–22,7 %. Найвищий приріст урожаю забезпечила культура бульбочкових бактерій сої, яка

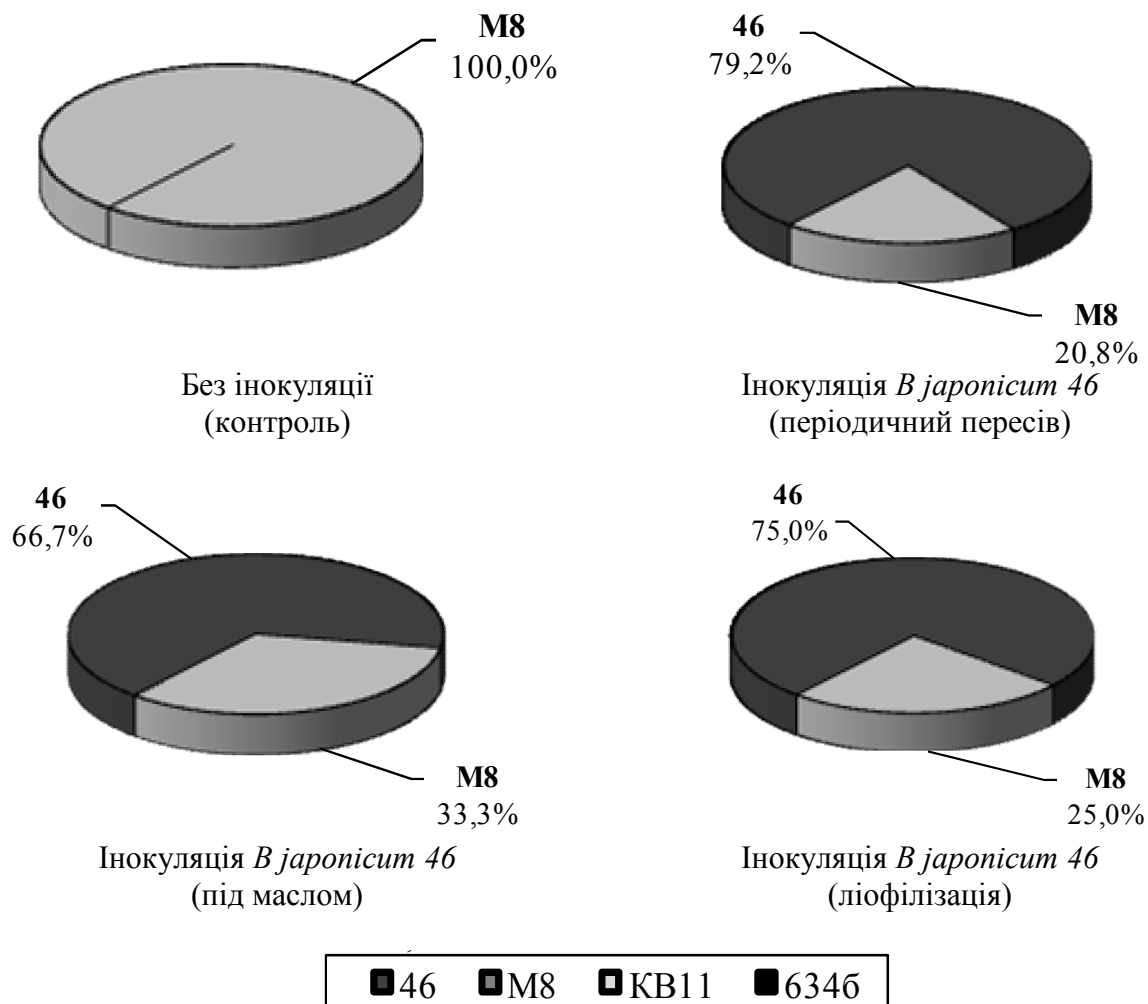


Рис. 5. Конкуентоздатність штаму *V. japoricum* 46 за різних способів зберігання (польовий дослід, 2013 р.)

Таблиця 2. Ефективність штаму *V. japoricum* 46 за різних способів зберігання (польові дослід, 2012–2013 р.)

Варіанти дослід	Урожайність, т/га			Приріст урожаю,	
	2012	2013	середнє	т/га	%
Без інокуляції (контроль)	2,11	2,38	2,25	–	–
Інокуляція					
<i>V. japoricum</i> 46 (періодичний пересів)	2,69	2,83	2,76	0,51	22,7
<i>V. japoricum</i> 46 (під маслом)	2,52	2,71	2,62	0,37	16,4
<i>V. japoricum</i> 46 (ліофілізація)	2,61	2,77	2,69	0,44	19,6
НІР ₀₅	0,21	0,15			

впродовж 19 років зберігалася методом періодичних пересівів — 0,51 т/га (22,7 %). Варто зазначити, що зниження симбіотичної активності, яке спостерігали у штаму *B. japonicum* 46 за тривалого підтримання під маслом, суттєво не вплинуло на його ефективність. Показники урожайності сої у цьому варіанті були нижчими, але вірогідно не відрізнялися від показників урожайності в інших варіантах досліджу.

Отже, підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що для тривалого зберігання виробничого штаму *B. japonicum* 46 можна використовувати всі три досліджувані способи. Кращими є методи періодичних пересівів та сублімаційного висушування, які забезпечують високу життєздатність штаму та стабільність його симбіотичних властивостей упродовж тривалого часу. Підтримання під мінеральним маслом можна рекомендувати як допоміжний метод, за умови пересіву культур бульбочкових бактерій через кожні 2–3 роки. Методи потребують подальшої перевірки за триваліших термінів консервації і більшої кількості штамів бульбочкових бактерій. Разом із тим, встановлений факт збереження симбіотичних властивостей штаму *B. japonicum* 46 за тривалого підтримання *in vitro* свідчить про придатність згаданих методів для зберігання перспективних та виробничих штамів бульбочкових бактерій сої.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СИМБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ

Т. М. Ковалевская, Д. В. Крутило,
В. П. Горбань, И. Н. Романова,
Т. О. Усманова

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН,
г. Чернигов

*Изучены жизнеспособность и симбиотические свойства производственного штамма *Bradyrhizobium japonicum* 46 после длительного хранения различными способами.*

1. Сравнение методов криоконсервации и лиофилизации как способов длительного хранения клубеньковых бактерий / В. И. Сафронова, Н. И. Новикова, Т. М. Сидякина, Л. Т. Божьева // Микробиология. — 1991. — Т. 60, № 2. — С. 368–376.

2. Куплетская М. Б. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского государственного университета / М. Б. Куплетская, З. А. Аркадьева // Микробиология. — 1997. — Т. 66, № 2. — С. 283–288.

3. Каталог культур микроорганизмов / [наук. редкол. : В. В. Волкогон, О. В. Надкернична, Т. М. Ковалевська]. — Чернігів : ЦНТЕІ, 2007. — 45 с.

4. Пат. 85943 Україна, МПК С 12 N 1/20, С 05 F 11/08. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання бактеріального добрива під сою / Ковалевська Т. М., Надкернична О. В., Крутило Д. В., Горбань В. П. ; заявник та патентовласник ІСГМ УААН. — № а 200707156, заявл. 25.06.07 ; опубл. 10.03.09, бюл. № 5. — 4 с.

5. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Перверзева. — М. : Агропромиздат, 1987. — 239 с.

6. Крутило Д. В. Серологічне різноманіття бульбочкових бактерій сої у ґрунтах України / Д. В. Крутило, І. В. Волкова // Агроекологічний журнал. — 2012. — № 4. — С. 66–71.

7. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation / R. W. F. Hardy, R. D. Holsten, E. K. Jackson, R. C. Burns // Plant physiol. — 1968. — Vol. 43, № 8. — P. 1185–1207.

8. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. — М. : Агропромиздат, 1985. — 352 с.

THE EFFECT OF STORAGE METHODS ON VIABILITY AND SYMBIOTIC PROPERTIES OF SOYBEAN NODULE BACTERIA

Т. М. Kovalevska, D. V. Krutylo,
V. P. Gorban, I. M. Romanova,
T. O. Usmanova

Institute of Agricultural Microbiology and
Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The viability and symbiotic properties of active strain *Bradyrhizobium japonicum* 46 after its long-term storage using different methods were studied. It was established that*

Установлено, что изучаемый штамм при хранении периодическими пересевами и в сублимационно высушенном состоянии сохраняет способность к активному симбиозу с соей. При длительном хранении под слоем минерального масла симбиотические свойства (вирулентность, азотфиксирующая активность, конкурентоспособность) штамма полностью не восстанавливаются.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, длительное хранение, симбиотические свойства, соя.

strain storing in evaporative freezing conditions as well at periodic passages the strain preserves its ability to form active symbiosis with soybean plants. Long-term storage under the layer of mineral oil had negatively influenced on the symbiotic properties of B. japonicum 46 strain resulted in only partial restoration of strains virulence, nitrogen fixing activity and competitiveness.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, long-term storing, symbiotic system, soybean.