

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* НА ЕЕ СПОСОБНОСТЬ ВСТУПАТЬ В СИМБИОТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ С РАСТЕНИЕМ-ХОЗЯИНОМ

Малиновская И.М.

Национальный научный центр “Институт земледелия УААН”,
ул. Машиностроителей, 2б, пгт. Чабаны, Киевская обл., 08162,
Украина

*Изложены результаты изучения влияния физиологического состояния, возраста и срока хранения культуры *Bradyrhizobium japonicum* 634 б на ее нодуляционную активность и эффективность. Установлено, что большую массу клубеньков образуют растения, семена которых обработаны: культурой в лучшем физиологическом состоянии, содержащей большее количество инкапсулированных клеток и имеющей большую кинематическую вязкость культуральной жидкости; культурой возрастом 5-10 суток (при культивировании на агаризованной среде); свежесмытой культурой; а также культурой, прошедшей в технологическом цикле меньшее количество пересевов в условиях периодической культуры. Хранение культуры на вермикулите признано одним из наименее результативных.*

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, культивирование, хранение, клубеньки, соя

Опыт использования бактериальных препаратов показывает, что инокуляция семян зернобобовых культур в производственных условиях не всегда достаточно эффективна. Причинами этого может быть некомплементарность сортов и используемых штаммов клубеньковых бактерий, более высокая вирулентность неэффективных аборигенных ризобий, токсичность почвы, неоптимальный уровень ее рН, наличие в почве микроорганизмов-антагонистов ризобий и пр. [7, 8, 10]. В некоторых случаях неэффективность препаратов клубеньковых бактерий обусловлена их качеством, особенностями физиологического состояния культуры-биоагента, наличием контаминации, сроком хранения и другими факторами. Поскольку эти вопросы мало изучены, мы попытались найти ответы на некоторые из них, проведя исследования по инокуляции семян сои *Bradyrhizobium japonicum* 634 б при различном физио-

логическом состоянии культуры бактерий, разным ее возрасте и разных сроках хранения.

Материалы и методы. Полевые опыты с растениями сои сорта Анжелика проводили на черноземно-луговой малогумусной легкосуглинистой почве в опытно-семеноводческом хозяйстве “Чабаны” Института земледелия УААН. Технология выращивания сои – общепринятая, ширина междурядий – 45 см, доза минеральных удобрений $N_{30}P_{45}K_{60}$, предшественник в севообороте – озимая пшеница. Во всех вариантах опыта повторность была четырехкратной, посевная площадь делянки – 13,5 м², учетная – 9,9 м². Для инокуляции использовали *B. japonicum* 634 б из расчета производственной нагрузки $2 \cdot 10^5$ клеток на семя.

Площадь поверхности листьев растений рассчитывали по методу Ничипоровича [4]. Содержание макроэлементов в воздушно-сухой массе растений определяли после мокрого озоления, по Гинзбург [1]: азот – с помощью реактива Несслера, фосфор – по методу Мэрфи-Райли [1], калий – на пламенном фотометре. Содержание макроэлементов в зерне определяли методом инфракрасной спектроскопии на приборе NIR-4500.

Культуру *B. japonicum* 634 б выращивали на видоизмененной среде Эшби [3]. Концентрацию клеток в суспензиях и культуральной жидкости оценивали с помощью камеры Горяева. Количество инкапсулированных клеток определяли по методу Бурри [6]. Кинематическую вязкость культуральной жидкости определяли с помощью вискозиметра ВПЖ-2 [5].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Мы провели сравнительные исследования эффективности вермикулитной формы и свежесмытой культуры *B. japonicum* 634 б, поскольку при проведении полевых опытов исследователи часто используют суспензии свежесмытых культур ризобий, а затем полученные результаты экстраполируют на производственные условия, где применяется, в основном, вермикулитная форма нитрагина.

Производственные условия воспроизводили следующим образом: культуру *B. japonicum* 634 б, хранящуюся при температуре +22 °С в течение 60 суток в адсорбированном состоянии на вермикулите с размером частиц 0,8-1,0 мм, десорбировали в водопроводной воде с периодическим перемешиванием в течение 10

минут и обрабатывали этой суспензией семена сои без внесения прилипателя.

В результате проведенных полевых опытов установлено, что сорбция на вермикулите – один из наименее эффективных способов хранения культуры: в этом варианте опыта количество и масса корневых клубеньков на растениях сои не превышали показатели контрольного варианта (спонтанная инокуляция аборигенными ризобиями) (табл. 1). Вместе с тем, при обработке семян вермикулитной формой препарата наблюдается лучшее, чем в контроле, развитие растений: надземная масса увеличивается на 74 %, площадь поверхности листьев – на 48 %, что приводит к увеличению урожайности на 8,5 % (2,1 ц/га). Возможно, при этом проявляется высокая эффективность лабораторного штамма, что обеспечивает потребности растений в азоте и их полноценное развитие. Улучшение минерального питания растений под влиянием лабораторного штамма подтверждается данными химического анализа биомассы и зерна сои. Так, при обработке семян вермикулитной формой препарата содержание азота в биомассе увеличивается на 4,9 %, в зерне – на 2,2 %, соответствующие показатели выноса азота биомассой и зерном с единицы посевной площади при выращивании сои возрастают на 64 и 10,8 %, соответственно (табл. 2).

Большая эффективность лабораторного штамма по сравнению с почвенными брадиризобиями доказана нами в результате многолетних полевых опытов [2]. При этом использование понятия «почвенные ризобии» в данном случае несколько неправомерно, так как в течение многих лет на полях опытного хозяйства «Чабаны» при выращивании сои в восьмипольном севообороте проводится предпосевная инокуляция семян различными штаммами *V. japonicum*. В результате этого в почве сформировалась мощная популяция клубеньковых бактерий, и на корнях контрольных растений образуется достаточно большое количество клубеньков. Несмотря на лабораторное происхождение почвенных ризобий, они уступают в эффективности производственному штамму *V. japonicum* 634 б. Это обусловлено, возможно, тем, что вне растений ризобии постепенно теряют плазмиды, несущие гены азотфиксации. Воспроизведение таких плазмид в сапрофитном состоянии неэкономично и нецелесообразно, поскольку их репликация требует дополнительных затрат энергии. Кроме того, существенным является фактор плотности популяции брадиризобий – она

Таблица 1. Влияние физиологического состояния, возраста, срока хранения культуры В. жароисит 634 б на развитие растений сои сорта Анжелика, чернозем луговой малогумусный (в среднем за 2004-2005 гг.)

Вариант опыта	Надземная биомасса, г на растение	Высота растений, см	Масса сырых клубеньков, г на растение	Количество клубеньков, од./растение	Площадь листовой поверхности, см ² /растение	Площадь листовой поверхности, тыс.м ² /га	Количество бобов, шт/растение	Вес 100 семян, г	Урожайность, ц/га
Контроль (обработка водопроводной водой)	69,0	90,2	0,595	30,0	1798	56,6	36,3	22,3	24,7
Культура, сорбированная на вермикулите в течение 60 сут	119,9	84,3	0,505	27,0	2669	87,0	36,6	22,4	26,8
Водная суспензия культуры, хранение в холодильнике 24 сут	117,3	82,2	1,247	41,5	2410	82,4	33,2	22,1	31,5
Водная суспензия культуры, хранение в холодильнике 12 сут.	111,8	83,6	0,874	37,6	2508	84,5	33,2	23,0	27,9
Культура пятого пересева	103,5	96,2	1,779	51,6	2243	74,7	33,2	23,4	27,4
Культура четвертого пересева	89,5	69,1	1,826	62,7	1930	67,8	33,3	22,9	28,4
Культура первого пересева	91,5	86,9	1,896	68,5	1982	72,4	32,7	22,5	29,9
Культура, выращенная на агаризованной среде в течение 5 суток	85,0	98,6	1,408	50,7	1943	64,3	33,5	22,5	28,0
Культура, выращенная на агаризованной среде в течение 10 суток	94,4	92,7	2,133	60,7	2063	75,1	40,1	22,3	27,2
Культура, выращенная на агаризованной среде в течение 20 суток	101,7	83,3	0,904	35,9	2297	80,4	28,9	22,2	24,7
Культура, выращенная на агаризованной среде в течение 30 суток	133,6	94,2	0,617	22,3	2927	102,2	43,7	22,4	24,1
НСР ₀₅	9,05	2,10	0,320	2,80	180	3,00	1,10	0,35	2,00

Таблица 2. Влияние физиологического состояния, возраста, срока хранения культуры *V. jaropiscum* 63 4б на химический состав биомассы растений, зерна и вынос макроэлементов с единицы посева обработанных растений сои сорта Анжелика, чернозем луговой малогуmusный (в среднем за 2004-2005 гг.)

Вариант опыта	Содержание в воздушно-сухой массе растений, %			Вынос элементов растениями, г/м ²			Содержание в зерне, %			Вынос элементов зерном, г/м ²		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Контроль (обработка водопроводной водой)	3,89	0,61	1,22	60,0	9,41	18,8	7,13	1,36	2,52	17,6	3,36	6,22
Культура, сорбированная на вермикулите втечение 60 сут	4,08	0,60	1,22	98,5	14,5	29,4	7,29	1,39	2,55	19,5	3,73	6,83
Водная суспензия культуры, хранение в холодильнике 24 сут	4,08	0,65	1,30	99,7	15,9	31,8	7,05	1,36	2,54	22,2	4,28	8,00
Водная суспензия культуры, хранение в холодильнике 12 сут	3,91	0,60	1,25	95,5	15,1	30,5	7,02	1,35	2,52	19,6	3,77	7,03
Культура пятого пересева	4,08	0,70	1,66	90,9	15,6	40,0	7,12	1,39	2,55	19,5	3,81	6,99
Культура четвертого пересева	4,16	0,62	1,86	79,2	11,8	35,4	7,17	1,36	2,53	20,4	3,87	7,19
Культура первого пересева	4,08	0,88	1,74	83,7	18,1	35,7	7,11	1,38	2,55	21,3	4,13	7,62
Культура, выращенная на агаризованной среде втечение 5 суток	3,90	0,65	1,21	77,3	12,9	25,6	7,05	1,39	2,52	19,7	3,89	7,06
Культура, выращенная на агаризованной среде втечение 10 суток	3,54	0,63	1,23	70,7	12,6	24,6	7,22	1,38	2,54	19,6	3,75	6,91
Культура, выращенная на агаризованной среде втечение 20 суток	3,79	0,56	1,33	86,0	12,7	30,2	7,02	1,30	2,50	17,3	3,21	6,18
Культура, выращенная на агаризованной среде втечение 30 суток	3,63	0,56	1,16	100,3	14,8	30,7	7,16	1,46	2,58	17,3	3,52	6,22
НСР ₀₅	0,07	0,05	0,08	3,8	4,7	5,2	0,08	0,07	0,05	2,1	0,40	0,15

значительно меньше той, которая создается в процессе инокуляции семян лабораторным штаммом.

Сравнение вермикулитной формы нитрагина со свежесмытой культурой *B. japonicum* 634 б (вар № 7) показывает, что обработка семян такой культурой позволяет растению сформировать в 3,8 раза большую массу клубеньков, в 2,6 раза большее количество клубеньков и в 1,12 раза большую урожайность (табл. 1). Таким образом, хранение культуры на вермикулите приводит к значительной потере ее нодуляционных свойств и снижению эффективности. Однако это необходимый технологический прием, поскольку бактериальные препараты не могут быть изготовлены одновременно для всех площадей выращивания зернобобовых культур. Результатом этих исследований является вывод о необходимости возобновления промышленного производства стерильного торфа как наиболее приемлемого наполнителя для препаратов на основе клубеньковых бактерий.

Применение жидких культур *B. japonicum* традиционно ограничивается десятидневным сроком хранения суспензии после смыва с агаризованных сред или выращивания в условиях периодической культуры. Мы использовали в исследованиях культуры двух сроков хранения в холодильнике – 12 и 24 суток. При этом оказалось невозможным соблюсти методическое требование исходного равенства физиологического состояния культур разного срока хранения, поскольку их культивирование и смыв осуществлялись в разное время. В данном случае культура, хранившаяся 24 суток, исходно была в лучшем физиологическом состоянии и характеризовалась более высоким (на 20 %) содержанием инкапсулированных клеток и более высокой (на 32 %) кинематической вязкостью полисахарида по сравнению с 12-суточной культурой. Выравнивание исходных суспензий проводилось по концентрации клеток в единице объема, поэтому показатели содержания инкапсулированных клеток и кинематической вязкости культуральной жидкости в суспензиях существенно отличались.

По результатам полевого опыта, 24-суточная культура обеспечила более интенсивное, по сравнению с 12-суточной, образование элементов симбиотического аппарата: превышение массы клубеньков составило 42,7 %, количества клубеньков – 10,4 % (табл. 1). При этом остальные биометрические показатели роста растений в этих вариантах опыта статистически не различались между собой,

за исключением урожайности: она была выше при инокуляции 24-суточной культурой на 13,0 % (3,6 ц/га). Бактеризация 24-суточной культурой существенно улучшила минеральное питание растений: содержание азота в биомассе растений повысилось по сравнению с 12-суточной на 4,3 %, вынос азота биомассой увеличился на 4,4 %, вынос азота зерном – на 13,3 %. Под влиянием 24-суточной культуры увеличивается также вынос зерном двух других макроэлементов – фосфора (на 13,5 %) и калия (на 13,8 %). Таким образом, физиологическое состояние культуры имеет большее значение для проявления ее эффективности, чем длительность хранения в промежутке от 12 до 24 суток. Полученные данные позволяют также сделать предварительный вывод, что водную суспензию культуры *V. japonicum* допустимо хранить свыше 20 суток при +5 °С.

Ранее нами были получены экспериментальные данные, которые свидетельствуют о том, что с увеличением количества пересевов культуры в жидкой среде ухудшаются ее культуральные свойства: снижается относительное содержание инкапсулированных клеток, уровень синтеза и кинематическая вязкость полисахарида, изменяется морфология и скорость роста колоний. Однако вопрос о том, как эти изменения в свойствах культуры влияют на ее вирулентность, конкурентоспособность и эффективность, изучен не был. Поэтому нами в полевых условиях исследовалась способность вступать в симбиотические отношения с растением-хозяином бактериальных культур, представляющих собой первый-четвертый-пятый пересев от исходной культуры (табл. 1). Исходной в данном случае считалась культура, которая пересеивалась с агаризованной среды только на агаризованную среду и не ресуспендировалась в жидкости даже в качестве посевного материала. Результаты исследований показали, что количество пересевов влияет на нодуляционные качества культуры, но в меньшей степени, чем на культуральные свойства. При пересевах, несмотря на снижение содержания инкапсулированных клеток, нодуляционная способность снижается незначительно: культура первого пересева образует на 3,8 и 6,6 % клубеньковой ткани больше, чем культура четвертого и пятого пересевов, соответственно. Количество клубеньков, образующихся при обработке семян культурой первого пересева, превышает соответствующие показатели культур четвертого и пятого пересевов на 9,3 и 32,8 % (табл. 1). Влияние культуры на другие показатели вегетативного роста растений незначительно,

и вариант с использованием культуры пятого пересева отличается более высокими показателями надземной массы, высоты растений, площади листовой поверхности (табл. 1). Однако максимальный прирост урожайности обеспечивает обработка семян культурой первого пересева: на 1,5 и 2,5 ц/га выше, чем культурой четвертого и пятого пересевов, соответственно.

Таким образом, показано, что более высокая вирулентность и эффективность присущи культуре, которая в технологическом цикле изготовления препаратов пересеивается в жидкой среде минимальное количество раз. Это явление возможно объясняется тем, что рост на агаризованной среде более близок по своим условиям и характеристикам к естественным условиям существования микроорганизмов в адсорбированном состоянии на почвенных частицах. Культивирование в условиях периодической культуры, как менее естественное, приводит к изменению физиологических свойств клеток, а следовательно, и их способности вступать в симбиотические взаимоотношения с растениями.

Исследовался также вопрос о значении возраста культуры бактерий для проявления ее нодуляционных свойств. Из литературных источников известно, что нодуляционная активность клеток *Bradyrhizobium* зависит от фазы и условий культивирования, которые влияют на содержание неуглеводных заместителей в экзогликанах и их ионный состав [9, 11]. С точки зрения технологии, чем меньше времени затрачивается на культивирование, тем экономичнее производство препарата. Поскольку эксперименты осуществлялись с медленно растущей культурой, то было выбрано время культивирования (агаризованная среда) 5, 10, 20 и 30 суток (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что время культивирования микроорганизмов влияет на их нодуляционные свойства. Так, культура возрастом 10 суток образует больше клубеньковой ткани, чем такая же культура возрастом 5, 20 и 30 суток. Десятидневная культура, которая находится в стационарном состоянии 5 суток, образует клубеньков на 19,7 % больше, чем пятидневная, которая находится в начале стационарной фазы, и на 172 % больше, чем 30-суточная, а показатели массы клубеньков выше на 51,5 и 245 %, соответственно. Возраст культуры влияет и на минеральное питание бактеризованных растений. Так, культура, выращиваемая в течение 5 суток по сравнению с культурой, выращиваемой в течение 20 суток, обеспечивает увеличение выноса

100

зерном макроэлементов: азота – на 13,9 %, фосфора – на 21,2 %, калия – на 14,2 %.

Полученные нами данные совпадают с результатами других авторов [9,11], свидетельствующими о снижении нодуляционных свойств клубеньковых бактерий по мере старения культуры. Вместе с тем обработка пяти- и десятидневной культурами влияют на урожайность примерно одинаково, хотя все показатели роста растений в варианте с десятидневной культурой превышают показатели варианта обработки пятидневной культурой. Следовательно, при выращивании производственных культур клубеньковых бактерий на агаризованных средах целесообразнее использовать культуру возрастом 5-10 дней, не прибегая к дальнейшему культивированию *B. japonicum*. Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о том, что двадцати- и тридцатисуточные культуры обладают достаточно высокой нодуляционной активностью и способны образовывать клубеньки в количестве, превышающем уровень спонтанной инокуляции.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что физиологическое состояние культуры *B. japonicum*, ее возраст и срок хранения существенно влияют на проявление нодуляционных свойств и эффективность штамма бактерии. Необходимо дальнейшее, более расширенное и углубленное, изучение этих вопросов с целью повышения эффективности практического применения препаратов на основе клубеньковых бактерий.

1. Лісовал А.П., Давиденко У.М., Мойсеєнко Б.М. Агрохімія. – К.: Вища школа, 1984. – 312 с.

2. Малиновская И.М. Влияние фосфатмобилизующих бактерий на формирование клубеньков и улучшение минерального питания растений сои сорта Киевская 27 // Живлення рослин: теорія і практика. – К.: Логос, 2005. – С. 266-271.

3. Методы исследования клубеньковых бактерий. Методические рекомендации / Под ред. Л.М. Доросинского. – Л.: ВНИИСХМ, 1981. – 48 с.

4. Ничипорович А.А. Фотосинтетическая деятельность растений в посевах. – М.: Изд-во АН СССР, 1961. – 135 с.

5. Практикум по коллоидной химии и электронной микроскопии / Под ред. С.С. Вьюцкого. – М.: Химия, 1974. – С. 140-143.

6. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практи-

кум по микробиологии. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

7. Ali F.S., Loynachan T.E. Inhibition of *Bradyrhizobium japonicum* by diffusates from soybean seed // Soil Biol. And Biochem. – 1988. – Vol. 10, № 7. – P. 973-976.

8. Hatting M.I., Loun H.A. Clever rhizoplane bacteria antagonistic to *Rhizobium trifolii* // Canad. J. Microbiol. – 1969. – № 15. – P. 361-364.

9. Dudman W.F. The role of surface polysaccharides in natural environments // Surface carbohydrates of the procaryotic cell / Ed. I. Satherland. – New York: Acad. Press, 1977. – P. 357-414.

10. Lundstrom K., Mylliniemi H. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in simbiosis // Plant and soil. – 1987. – Vol. 98, № 3. – 353-362.

11. Mort A.J., Bauer W.D. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. Change with culture age and correlation with binding of soybean seed lectin to the bacteria // Plant. Phisiol. – 1980. – Vol. 66, № 1. – P. 89-94.

**ВПЛИВ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ КУЛЬТУРИ
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM НА ЇЇ ЗДАТНІСТЬ
ВСТУПАТИ У СИМБІОТИЧНІ ВІДНОСИНИ З
РОСЛИНОЮ-ХАЗЯЇНОМ**

Малиновська І.М.

Національний науковий центр "Інститут землеробства УААН",
с.мт. Чабани

*Викладені результати вивчення впливу фізіологічного стану, строку культивування та зберігання культури *Bradyrhizobium japonicum* 634 б на її нодуляційну активність та ефективність. Встановлено, що більшу масу бульбочок утворюють рослини, насіння яких інокульоване: культурою у кращому фізіологічному стані, яка має більший вміст інкапсульованих клітин і більшу кінематичну в'язкість культуральної рідини; культурою строком культивування 5-10 діб (за вирощування на агаризованому середовищі); свіжозмитою культурою; культурою, яка у технологічному циклі проходить меншу кількість пересівів в умовах періодичної культури. Зберігання культури на вермикулиті визнано одним з найменш результативних.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, культивування, зберігання, бульбочки, соя

**THE EFFECT OF PHYSIOLOGICAL STATE OF
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM CULTURE ON ITS
ABILITY TO ENTER SYMBIOTIC RELATION WITH A
HOST PLANT**

Malynovska I.M.

Institute of Agriculture, UAAS, Chabani

*The influence of physiological state, cultivating and preservation terms of *Bradyrhizobium japonicum* 634b culture on its nodule activity and efficiency was studied. It was established, that maximum nodule mass is formed by plants, seeds of which are inoculated with the culture in good physiological condition, which has more encapsulated cell content and higher kinematics viscosity of cultural liquid; with the culture with cultivating term 5-10 days (when cultivated on agarized medium); with the quick-washed off culture; with the culture which passes less number of reseeding in the technological cycle in the conditions of periodical culture. The culture preservations on vermiculite is considered as one of the least effective.*

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, cultivating, preservation, nodules, soybean