

ЗАСТОСУВАННЯ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* М 8

Комок М.С., Волкова І.В., Волкогон В.В.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: rifam@ukrpost.ua

Отримано активні імунні сироватки до Bradyrhizobium japonicum М 8. За постановки реакції аглютинації з бактеріальними суспензіями показано, що в межах досліджених штамів бульбочкових бактерій сої існують серологічно споріднені і відмінні штами. В умовах вегетаційного та польового дослідів встановлено можливість серологічної ідентифікації B. japonicum М 8 безпосередньо в екстрактах бульбочок при дослідженні конкурентоспроможності штаму за попереднього створення серологічно відмінної фонові популяції бактерій.

Ключові слова: соя, Bradyrhizobium japonicum, реакція аглютинації, антисироватка.

Однією з актуальних проблем землеробства є активізація біологічної фіксації атмосферного азоту за участі специфічних бульбочкових бактерій у симбіозі з бобовими культурами. Розширення масштабів надходження «біологічного» азоту в агроценози дозволить знизити енергетичні затрати в землеробстві та зменшити техногенне навантаження на навколишнє середовище [1]. В останні роки в Україні значно розширено площі вирощування такої бобової культури як соя. Проте питання формування симбіозів сої з бульбочковими бактеріями для забезпечення рослин симбіотично засвоєним азотом не можна вважати вирішеним.

Збільшити продуктивність азотфіксації соєво-ризобіального симбіозу можна шляхом інтродукції ефективних штамів бульбочкових бактерій в агроценози. Але штами, які використовують для інокуляції насіння сої, повинні мати не лише високу ефективність, а і достатню конкурентоспроможність у порівнянні з аборигенною мікробіотою [2-4].

Для відбору конкурентних штамів використовують методи генетичного маркування, що базуються на одержанні ізогенних мутантів, стійких до окремих антибіотиків [5, 6], спосіб інокуляції

сумішшю неактивного і активного штамів (метод Амаргера та його модифікації) [6], а також серологічні методи. Одним із широко використовуваних серологічних методів є реакція аглютинації. Цей вид аналізу, завдяки специфічності, простоті виконання та демонстративності, знайшов широке застосування в мікробіологічній практиці для ідентифікації мікроорганізмів.

Метою даної роботи було дослідження можливості використання реакції аглютинації для ідентифікації *B. japonicum* M 8 у бактеріальних суспензіях та екстрактах бульбочок сої.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були бульбочкові бактерії сої *B. japonicum* M 8 [7] та кореневі бульбочки, утворені зазначеним штамом на рослинах сої (*Glycine max* (L.) Merr.) сорту Устя в умовах польових та вегетаційних дослідів.

Для отримання антигенів культуру бульбочкових бактерій вирощували протягом 10 діб при 28 °С на люпиновому середовищі такого складу, г/л: KH_2PO_4 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; маніт – 20,0; NaCl – 0,2; CaSO_4 – 0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ – сліди; агар – 15; рН 7,0-7,2. Бактеріальну суспензію готували методом змиву клітинної маси з середовища стерильною водою, після чого центрифугували протягом 15 хв при 3000 об. Осад розчиняли у 20 мл фізіологічного розчину і знову центрифугували за тих же умов. До осаду додавали 10 мл 2,5 % розчину глутарового альдегіду. Через добу тричі центрифугували, надосадову рідину зливали. Осад розчиняли у 20 мл фізіологічного розчину та двічі центрифугували. Після останнього центрифугування доводили титр антигену до $2 \cdot 10^8$ клітин/мл (оптична густина $D_{640} = 0,390$).

Антисироватку отримували після імунізації кролів бактеріальною суспензією з ад'ювантом Фрейнда за розробленою нами схемою. Першу ін'єкцію проводили підшкірно антигеном, що містив 0,5 мл бактеріальної суспензії з титром $2 \cdot 10^8$ клітин/мл та 1 мл ад'юванта Фрейнда. Наступні введення антигену тваринам робили внутрішньовенно згідно схеми, наведеної в табл. 1. Відбір крові у кролів проводили через 7, 10 та 12 днів після останньої імунізації. Зберігали антисироватку при -20 °С.

Серологічні дослідження проводили, застосовуючи метод аглютинації, за стандартними методиками для аналізу ризобій на планшетах для мікротитрування [8-10]. У лунку планшету вносили сироватку в робочому розведенні (1:100) та досліджуваний бактеріальний антиген в об'ємі 50 мкл у двох повтореннях. Для

негативного контролю результатів у лунки вносили по 50 мкл фізіологічного розчину і досліджуваного антигену. Інкубацію здійснювали протягом 10-12 годин при температурі 37 °С. Облік результатів проводили візуально: при позитивній реакції осад вкриває все дно лунки у вигляді розкритої парасольки, оберненої куполом донизу. При негативній реакції на дні лунки випадає осад у вигляді крапки або невеликої круглої плями.

Таблиця 1. Схеми імунізації кролів суспензією *B. japonicum* М 8

№ уведення	Кількість антигену (мл)	Спосіб імунізації	Титр бактеріальної суспензії (клітин/мл)
1	0,5	підшкірно	$2 \cdot 10^8$
2	1	внутрішньовенно	$4 \cdot 10^8$
3	1	внутрішньовенно	$8 \cdot 10^8$
4	1	внутрішньовенно	$16 \cdot 10^8$
5	1	внутрішньовенно	$16 \cdot 10^8$
6	1	внутрішньовенно	$16 \cdot 10^8$

Для перевірки специфічності сироватки як антигени використовували бактерії різної родової і видової належності: *Rhizobium radiobacter* 204, *R. leguminosarum* bv. *trifoli* 1326, *R. leguminosarum* bv. *vicia* 250a, *R. leguminosarum* bv. *vicia* 0610, *Sinorhizobium meliloti* 425a, *Bradyrhizobium. sp.* *Lupinus* 367a; а також штами *B. japonicum*: КС 23, КВ2-9, КВ1-3, КН-6, КН-10, 12с, 9/2, 634 б, 9с, КВ-1. При визначенні чутливості реакції аглютинації бактеріальну суспензію *B. japonicum* М 8 з титром $3 \cdot 10^8$ клітин/мл розводили в діапазоні концентрацій від 10^8 до 10^4 клітин/мл і проводили аналіз описаним вище способом.

З метою визначення можливості використання вищезазначених методичних підходів для ідентифікації штаму *B. japonicum* М 8 в екстрактах бульбочок сої проводили вегетаційний дослід. Насіння сої сорту Устя перед посівом поверхнево стерилізували у 96 % розчині етилового спирту протягом 10 хвилин і пророщували. Інокуляцію проростків проводили водними суспензіями штаму М 8 і серологічно відмінних штамів: 634 б, КН-6, 9с, 9/2. Бактеріальне навантаження складало 200-300 тис. клітин на насінину. Рослини сої вирощували на стерильному піску в пластикових посудинах ємністю 1,5 л. У субстрат вносили суміш Прянишнікова

з вмістом азоту у 0,2 норми. Вологість субстрату протягом періоду вирощування підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності. У кожній посудині вирощували по дві рослини. Для аналізу бульбочки з коріння сої відбирали через 4 тижні вегетації.

Реакцію аглютинації використовували для ідентифікації штаму *B. japonicum* М 8 у бульбочках сої за умов польового досліду, в якому вивчали вплив різних біопрепаратів на ефективність соєво-ризобіального симбіозу за наявності «місцевої» популяції бульбочкових бактерій сої. Схема польового досліду включала такі варіанти: 1. контроль (без інокуляції); 2. суспензія клітин *B. japonicum* М 8; 3. Ризоторфін; 4. Ризогумін; 5. Біогран. Інокуляційне навантаження складало 200-300 тис. клітин на одну насінину.

Дослід проводили на дерново-підзолистому ґрунті (вміст гумусу – 1,1 %; рН_{сол.} 5,65) в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН. Щільну популяцію бульбочкових бактерій сої створювали у попередньому році на основі серологічно відмінного штаму *B. japonicum* 6346 шляхом вирощування бактеризованої сої на досліджуваній ділянці. Повторність досліду – чотирикратна. Розміщення ділянок – рендомізоване. Площа облікової ділянки – 7,5 м². Закладку досліду проводили у відповідності з рекомендаціями [11].

Бульбочки для аналізу відбирали у фази стеблуння, цвітіння та наливу бобів. Для серологічного аналізу використовували гомогенати кореневих бульбочок сої, які готували шляхом подрібнення відмитих бульбочок у 1,0 мл фізіологічного розчину.

Результати та їх обговорення. У ході досліджень розроблено схему імунізації кролів, ефективну для отримання активних сироваток до бульбочкових бактерій сої (табл. 1). Одержана антисироватка до штаму *B. japonicum* М 8 мала титр 1:3200.

Результати серологічного аналізу водних суспензій бактерій, що належать до родів та видів, споріднених з ризобіями сої, показали, що реакція аглютинації не відбувалася за розведень антисироватки від 1:50 до 1:200 (табл. 2).

За використання антисироватки стабільно спостерігали позитивну реакцію аглютинації при аналізі водних суспензій *B. japonicum* М 8. Водночас результати дослідження специфічності антисироватки дозволили встановити, що у межах досліджених штамів *B. japonicum* існує серологічно споріднена група, до якої

входять штами 43, KB2-9, KC-23 і M-8. До групи серологічно неспоріднених віднесено штами *B. japonicum* KB-1, 9с, 634 б, 9/2, 12с, KH-10 і KB 1-3 (табл. 2).

Таблиця 2. Специфічність антисироватки до *B. japonicum* M 8

Бактерії	Розведення сироватки, отриманої до штаму <i>B. japonicum</i> M 8		
	1:50	1:100	1:200
<i>Bradyrhizobium sp. Lupinus</i> 367a	–	–	–
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 425a	–	–	–
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>vicia</i> 0610	–	–	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>vicia</i> 250a	–	–	–
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifoli</i> 1326	–	–	–
<i>R. radiobacter</i> 204	–	–	–
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> KB-1	–	–	–
<i>B. japonicum</i> 9с	–	–	–
<i>B. japonicum</i> 634б	–	–	–
<i>B. japonicum</i> 9/2	–	–	–
<i>B. japonicum</i> 12с	–	–	–
<i>B. japonicum</i> KH-10	–	–	–
<i>B. japonicum</i> KH-6	–	–	–
<i>B. japonicum</i> KB1-3	–	–	–
<i>B. japonicum</i> 43	+	+	+
<i>B. japonicum</i> KB2-9	+	+	+
<i>B. japonicum</i> KC 23	+	+	+
<i>B. japonicum</i> M 8	+	+	+

Отже, отриману імунну сироватку до *B. japonicum* M 8 можна використовувати для ідентифікації цього штаму лише за умови, що у зразках, окрім досліджуваного, присутні серологічно відмінні штами бульбочкових бактерій сої. Встановлено, що чутливість методу аглютинації складає 10^5 - 10^6 клітин/мл.

За літературними даними, для серологічного аналізу бульбочок використовують гомогенати бульбочок сої [10] або ізоляти ризобій сої, виділені з бульбочок [11]. Для дослідження нами було обрано перший метод підготовки бульбочок до аналізу.

При аналізі бульбочок сої, утворених на рослинах в умовах вегетаційного досліду, достовірну позитивну реакцію аглютинації спостерігали лише у варіанті із застосуванням екстрактів бульбочок, утворених штамом *B. japonicum* М 8 (табл. 3).

Таблиця 3. Серологічний аналіз бульбочок сої, утворених різними штамми *B. japonicum* (вегетаційний дослід)

Штами бактерій	Кількість проаналізованих бульбочок (од.)	Кількість бульбочок, що давали позитивну реакцію з антисироваткою до <i>B. japonicum</i> М 8 (од.)		
		1:25	1:50	1:100
<i>B. japonicum</i> 634б	12	0	0	0
<i>B. japonicum</i> КН-6	19	0	0	0
<i>B. japonicum</i> 9с	21	0	0	0
<i>B. japonicum</i> 9/2	7	0	0	0
<i>B. japonicum</i> М 8	16	16	16	16

Результати наших досліджень показують, що для вивчення антигенного складу бульбочок сої можна використовувати екстракти подрібнених бульбочок без попередньої їх підготовки (прогрівання, центрифугування) або виділення ізолятів ризобій сої.

Розроблені методичні підходи використали для ідентифікації штаму *B. japonicum* М 8 у польовому досліді з вивчення впливу різних біопрепаратів на ефективність соєво-ризобіального симбіозу за умов щільної популяції бульбочкових бактерій сої, створеної у попередньому році на основі серологічно відмінного штаму *B. japonicum* 634б: визначали відсоток бульбочок, утворених штамом-інокулянтом *B. japonicum* М 8. Для цього аналізували по 144 кореневі бульбочки сої з кожного варіанту в три фази розвитку рослин. При цьому кількість випадків спонтанної аглютинації не перевищувала 2,2 % (у 48 бульбочок із 2160 проаналізованих бульбочок).

Як свідчать одержані дані, відсоток бульбочок, утворених за участю *B. japonicum* М 8, знаходився в межах від 3 % до 22 % залежно від фази онтогенезу рослин та використаного препарату (табл. 4). У фазу гілкування рослин формуванню найбільшої

кількості бульбочок, утворених штамом *B. japonicum* М 8, сприяв Біогран – 7,33 %, що у 2,1 раза більше, ніж у варіанті з інокуляцією лише суспензією клітин. У пізніші фази органогенезу найбільшу кількість бульбочок, утворених штамом-інокулянтном, спостерігали у варіанті з застосуванням Ризогуміну. Так, у фази цвітіння і наливу бобів у варіантах із Ризогуміном кількість бульбочок, утворених штамом *B. japonicum* М 8, складала 17,49 % і 22,49 %, перевищувала показники варіанту з інокуляцією суспензією клітин в 1,9 та 1,7 раза, відповідно.

У польовому досліді найбільша кількість бульбочок була утворена за рахунок інтродукованого штаму *B. japonicum* 634б, популяція якого в ґрунті була штучно створеною в попередні роки. Отримані дані не суперечать літературним даним [3, 13, 14], водночас передпосівну інокуляцію сої за наявності аборигенних штамів бульбочкових бактерій сої радять проводити ряд дослідників [15, 16]. У такій ситуації ефективним може виявитися застосування біопрепаратів комплексної дії з підсиленням рістстимулювальним ефектом. За оптимального поєднання бактеріального і фізіологічно активних компонентів відмічено позитивні зміни у формуванні та активності бобово-ризобіального симбіозу [17, 18]. У наших дослідях такими препаратами є Ризогумін та Біогран, переваги має застосування препарату комплексної дії Ризогуміну.

Таблиця 4. Відсоток бульбочок, утворених *B. japonicum* М 8 на корінні сої, польовий дослід

Варіанти досліді	Кількість бульбочок, %		
	фаза гілкування	фаза цвітіння	фаза утворення бобів
Контроль (без інокуляції)	0,00	0,00	0,00
Суспензія клітин <i>B. japonicum</i> М 8	3,47	9,12	13,39
Ризоторфін	5,51	13,89	18,19
Ризогумін	4,70	17,49	22,37
Біогран	7,33	13,19	15,56
НІР _{5%}	2,73	4,59	4,14

Таким чином, одержано антисироватку до штаму *B. japonicum* М 8 з титром 1:3200. Налагоджено метод ідентифікації штаму *B. japonicum* М 8 у реакції аглютинації з використанням отриманої

антисироватки. Визначено, що чутливість методу складає 10^5 - 10^6 клітин/мл.

За постановки реакції аглютинації з бактеріальними суспензіями показано, що в межах досліджених штамів бульбочкових бактерій сої існують серологічно споріднені і відмінні штами. В умовах вегетаційного та польового дослідів встановлено можливість серологічної ідентифікації *B. japonicum* М 8 безпосередньо в екстрактах бульбочок при дослідженні конкурентоспроможності штаму за попереднього створення серологічно відмінної фонові популяції бактерій.

1. Умаров М.М. Микробиологическая трансформация азота в почве /М.М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.

2. Мікробні препарати в землеробстві. Теорія і практика: Монографія /[Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М., та ін.]; за ред. В.В. Волкогона. – К.: Аграрна наука, 2006. – 312 с.

3. Obaton M. Are *Bradyrhizobium japonicum* stable during a long stay in soil /M. Obaton, A. Bouniols, G. Piva, V. Vincent //Plant and Soil. – 2002. – Vol. 245, № 2. – P. 315-326.

4. Catroux G. Trends in rhizobial inoculants production and use /G. Catroux, A. Hartmann, C. Revellin //Plant and Soil. – 2001. – Vol. 230, № 1. – P. 21-30.

5. Kuykendall L.D. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculums strain in nodules of soybean plants grown in fields populated with *Rhizobium japonicum* /L.D. Kuykendall, D.F. Weber //Appl. and Environ. Microbiology. – 1978. – Vol. 38, № 6. – P. 915-919.

6. Толкачев Н.З. Модифицированный метод определения количества клубеньковых бактерий сои в почве /Н.З. Толкачев //Тр. ВНИИСХМ. – Л., 1990. – Т. 60. – С. 37-43.

7. Пат. 39545 А Україна, 7С12N1/20, С05F11/08. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М 8, який використовують для виготовлення бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої /Толкачев М.З., Пагика В.П., Каменєва І.О., Грітчина Л.Ю.; Південний філіал інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. – заявл. 06.10.00; опубл. 15.06.01, Бюл. № 5.

8. Mrkovacki N. Serological identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains /N. Mrkovacki //Soil biology. – 1993. – Vol. 29, № 2. – P. 121-128.

9. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии /В.М. Никитин. – Кишинев: Штинца, 1982. – 304 с.

10. Means U.M. Quick serological method of classifying strains of

Bradyrhizobium japonicum in nodules /U.M. Means, H.W. Johnson, R.A. Date //J. Bacteriol. – 1964. – Vol. 87, № 3. – P. 547-553.

11. Посыпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха: Справочное пособие /Г.С. Посыпанов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 300 с.

12. Берестецкий А.О. Простой метод оценки конкурентной способности клубеньковых бактерий /А.О. Берестецкий, А.Т. Новиков, В.Л. Князева //Микробиол. – 1983. – Т. 52, № 4. – С. 651-657.

13. Brockwell J. Recent advances in inoculants technology and prospects for the future /J. Brockwell, P.J. Bottomley //Soil biol. and biochem. – 1995. – Vol. 27, № 4-5. – P. 683-697.

14. Kang U.G. Symbiotic Potential, Competitiveness, and Serological Properties of *Bradyrhizobium japonicum* indigenous to Korean Soils /U.G. Kang, P. Somasegaran, H.J. Hoben, B.B. Bohlool //Appl. and Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57, № 4. – P. 1038-1045.

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

16. Заверюхин В.И. Возделывание сои на орошаемых землях /В.И. Заверюхин. – М.: Колос, 1981. – 160 с.

17. Волкогон В.В. Ефективність нового біологічного препарату ризогуміну для сої /В.В. Волкогон, Н.П. Штанько, В.П. Сальник та ін. //Селекція і насінництво. – 2005. – № 90. – С. 254-259.

18. Сальник В.П. Вплив інокуляції і регулятора росту триман-1 на активність азотфіксації, розвиток та формування симбіозу люцерни з бульбочковими бактеріями /В.П. Сальник, В.В. Волкогон, Н.М. Мальцева, О.Е. Мамчур //Физиол. и биохим. культ. раст. – 2001. – № 6. – С. 529-534.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* M 8

Комок М.С., Волкова И.В., Волкогон В.В.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
г. Чернигов

*Получены активные иммунные сыворотки к *Bradyrhizobium japonicum* M 8. При постановке реакции агглютинации с бактериальными суспензиями показано, что среди исследуемых штаммов клубеньковых бактерий сои существуют серологически родственные и отличные штаммы. В условиях вегетационного и полевого опытов установлена возможность серологической идентификации *B. japonicum* M 8 в экстрактах клубеньков при изучении конкурентоспособности штамма при предварительном создании серологически отличимой фоновой популяции бактерий.*

Ключевые слова: соя, *Bradyrhizobium japonicum*, реакция агглютинации, сыворотка.

USE OF AGGLUTINATION REACTION FOR IDENTIFICATION OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* M 8

Komok M.S., Volkova I.V., Volkohon V.V.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*The active immune serum to *Bradyrhizobium japonicum* M 8 were obtained. Agglutination reaction with bacterial suspensions had showed the presence of serologically similar and distinguishable strains among the studied soybean nodule bacteria strains. The possibility of serological identification of *B. japonicum* M 8 in nodules extracts at studying of strain's competitiveness at preliminary creation of serological distinguishable background population of bacteria was established in vegetative and field experiments.*

Key word: soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, agglutination reaction, antiserum.