

УДК 579.262

**Н.И. Адамчук-Чалая, Л.В. Титова, Г.А. Иутинская**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина,  
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m\_nv@mail.ru

## **МИКРОБНЫЕ ПЕЙЗАЖИ РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ИНТРОДУКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ИНОКУЛЯНТОВ**

***Цель.** Изучить пространственно-функциональную структуру микробиоценоза ризосферы сои при интродукции клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий в составе различных инокулянтов с использованием структурного анализа пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания. **Методы.** В работе применен новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериального сообщества в ненарушенных бобово-ризобияльных системах, базирующийся на использовании полимерных пленок с последующим анализом образовавшихся на них микробных ценозов при помощи сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. **Результаты.** Структурный анализ пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания в щадящем режиме показал, что в варианте с инокуляцией семян сои монокультурой *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 или совместно с *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 возрастает количество ризосферных бактерий и их морфометрические показатели. **Выводы.** Инокуляция семян сои моно- и комплексными препаратами брадиризобий способствовала увеличению количественно-морфологических характеристик популяций бактерий в ризосфере. Наибольшие показатели получены при совместной инокуляции исследуемых бактерий.*

*Ключевые слова:* ризосферный микробиоценоз, соя, инокулянты, биоплёнка обрастания.

Исследование микробно-растительных взаимоотношений – одна из наиболее актуальных проблем в почвенной и сельскохозяйственной микробиологии, важным аспектом которой является колонизация поверхности корня и ризосферы почвенными микроорганизмами [3, 4]. Мониторинг микроорганизмов в естественной среде обитания необходим для лучшего понимания стратегий их выживания, что важно для повышения эффективности интродуцированных хозяйственно-полезных микроорганизмов – биоагентов микробных препаратов. С теоретической и практической точек зрения представляет интерес изучение колонизации микроорганизмами ризосферы под влиянием различных агрономических приёмов, в частности, инокуляции семян биопрепаратами. Для эффективного управления микробными популяциями необходимо также знать особенности их пространственно-функциональной организации, которая составляет архитектонику микробных ценозов.

© Н.И. Адамчук-Чалая, Л.В. Титова, Г.А. Иутинская, 2014



Однако возможности мониторинга микробиоты имеют ряд принципиальных ограничений, поскольку микроорганизмы, которые могут быть изолированы из естественных сред обитания на отдельных питательных средах, составляют лишь малую часть микробного сообщества почв [1, 4, 5]. Микробные ценозы гетерогенны и состоят из популяций с разнообразными метаболическими способностями. Методические подходы к изучению микробных сообществ в их естественной ненарушенной уникальной структуре немногочисленны. Известны классические методы с использованием стекол обрастания Холодного, капилляров Перфильева и Габбе. Перспективна новая модификация аппликационных методов, основанная на анализе микробного пейзажа ризосферы с использованием полиэтилентерефталатных пленок (ПЭТ-пленок) обрастания из биосовместимого гидрофобного прозрачного полимера, позволяющих исследовать ценоз в его нативной архитектуре [1].

Целью работы было изучение архитектоники микробиоценоза ризосферы сои при интродукции штаммов клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий в составе различных инокулянтов с использованием структурного анализа пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания.

### Материалы и методы

В работе изучали ризосферные микробиоценозы сои сорта Алиса. Опыты проводили в полевых условиях на серой лесной почве (Киевская обл., Украина). Исследовали варианты с моноинокуляцией семян *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018, с бинарной инокуляцией семян брадиризовиями совместно с фосфатмобилизирующими бациллами *Bacillus megaterium* УКМ В-5724, а также без инокуляции (контрольный вариант, обработка семян водой).

Для получения инокулянтов культуру *B. japonicum* УКМ В-6018 выращивали в периодических условиях на качалке (140 об/мин) в течение 4 суток при 28 °С на маннитно-дрожжевой среде. *B. megaterium* УКМ В-5724 культивировали в аналогичных условиях в течение 2 суток. При бинарной инокуляции культуры микроорганизмов смешивали в сочетании 3:1. Бактериальная нагрузка при моно- и бинарной инокуляции составляла  $10^7$  клеток на семя. Семена инокулировали в день посева.

Для изучения морфологии клеток исследуемых микроорганизмов в жидкой среде обитания суспензионные культуры бактерий наносили на формваровую подложку сеточек для микроскопирования, фиксировали в парах 25% глютаральдегида и обрабатывали 2%-ной фосфорновольфрамовой кислотой, рН 7,2, методом негативного контрастирования. Локализацию брадиризовий в среде определяли по реакции связывания галактозоспецифических лектинов сои с соответствующими углеводами, входящими в состав клеточной стенки клубеньковых бактерий, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (JEOL JEM-1400, Япония). При этом препараты клеток *B. japonicum* УКМ В-6018 на сеточках обрабатывали соевым лектином, полученным из Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), в разведении (1:32).



Наличие глобул поли-β-оксибутирата или поли-окси-масляной кислоты (ПОМ) в клетках *B. japonicum* и *B. megaterium* подтверждали световой микроскопией (NU-2 и МТ 5300Н, Япония), нанося бактериальной петлей 7%-ый водный раствор нигрозина на бактериальную суспензию на покровном стекле. Для выявления локализации гранул волютина (ГВ) в бактериальных клетках использовали краситель по методике Раскиной [2].

Для исследования морфологии клеток *B. japonicum* и *B. megaterium* при их обитании в почве в стерилизованную текучим паром почву вносили суспензии бактерий до концентрации  $10^8$  кл/г, а также ПЭТ-пленки размером 1x5 см. Предварительно пленки стерилизовали этанолом. Экспозицию проводили в течение 10 суток.

С целью изучения пространственной структуры ризосферного микробного ценоза сои в фазе развития 2–3 настоящих листьев возле поверхности главного корня помещали стерилизованные этанолом ПЭТ-пленки. Экспозицию пленок проводили в течение 10 суток.

После извлечения ПЭТ-пленок из почвы сохранялась целостность сформированной в биопленке обрастания микробной ассоциации, которую анализировали по методике [1] с помощью сканирующей (Jeol JSM 35С, Япония) и трансмиссионной (JEOL JEM-1400, Япония) электронной микроскопии. Исследовали по 10 полей зрения на пяти участках биопленки на расстоянии 1 мм друг от друга для каждого варианта. Подсчитывали количество бактериальных клеток на 100 мкм<sup>2</sup> пленки и определяли их морфометрические параметры. Варьирование размеров бактерий исчисляли по десяти электронограммам по 50 клеток в поле зрения.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически по программе STAT.

### Результаты и их обсуждение

Изучение морфологии клеток *B. japonicum* УКМ В-6018, входящих в состав инокулянтов, показало, что большую часть популяции (67,1%) в культуральной жидкости составляли палочковидные бактерии средней величины: 0,3-0,8x1,5-2,0 мкм (табл. 1).

Таблица 1

Соотношение бактерий *B. japonicum* УКМ В-6018 по размерам в разных условиях обитания

Table 1

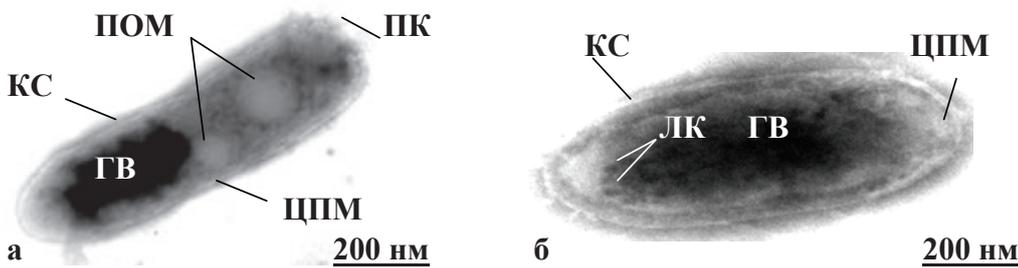
Ratio of *B. japonicum* UCM В-6018 bacteria size in different conditions

Среда	Относительное содержание клеток в популяции по размерам, % от общего количества		
	Мелкие ширина до 0,3 мкм длина до 1,5 мкм	Средние ширина 0,3-0,8 мкм длина 1,5- 2,0 мкм	Большие ширина более 0,8 мкм длина более 2,0 мкм
Жидкая питательная среда	13,5	67,1	19,4
Стерильная почва	7,1	37,7	55,2



В стерильной почве в популяции *B. japonicum* УКМ В-6018 преобладали крупные клетки размером более 0,8x2,0 мкм (55,2%).

На электронограммах (рис. 1а) клетки суспензионной культуры *B. japonicum* имели тонкую клеточную стенку (КС) 50–70 нм, окруженную толстой полисахаридной капсулой (ПК) (рис. 1а). Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) отделяла клеточную стенку от мелкозернистой цитоплазмы, содержащей ПОМ и гранулы волютина. Клетки суспензионной культуры *B. megaterium* УКМ В-5724 были немного толще клеток брадиризобий и аккумулировали липидные капли (ЛК) вокруг гранул волютина (рис. 1б).



**Рис. 1. Электронограммы клеток суспензионных культур (а – *B. japonicum* УКМ В-6018, б – *B. megaterium* УКМ В-5724)**

Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Обозначения: ПОМ – полиоксимасляная кислота (поли-β-оксибутират), КС – клеточная стенка, ПК – полисахаридная капсула, ГВ – гранулы волютина, ЛК – липидные капли, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана.

**Fig. 1. Electron micrographs of cells in the suspension culture (а – *B. japonicum* UCM В-6018, б – *B. megaterium* UCM В-5724).**

Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Designations: ПОМ – poly-β-oxobutyrate, КС – cell wall, ПК – polysaccharide capsule, ГВ – volutine granules, ЛК – lipidic drops, ЦПМ – cytoplasmic membrane.

В стерильной почве клетки *B. japonicum* имели удлиненную эллиптическую форму (рис. 2а).

Поверхность клеток *B. japonicum* УКМ В-6018 характеризовалась специфической реакцией связывания галактозоспецифических лектинов с соответствующим углеводом, входящим в состав клеточной стенки (рис. 2б, центры связывания указаны стрелками). Насчитывалось 43–60 единиц меченых лектинов на 1 мкм<sup>2</sup> клеточной поверхности. В популяции клеток *B. megaterium* УКМ В-5724 в стерильной почве такая реакция не наблюдалась (рис. 2в). По различиям реакции связывания лектинов между ризобиями и бациллами можно было выявить их локализацию при совместной интродукции в почву. У обоих инокулянтов в цитозоле средней электронной плотности располагались осмиофильные гранулы диаметром 70–150 нм, которые у палочковидных бактерий представлены жировыми включениями и гранулами волютина. В со-

став волютиновых или метахроматических гранул также входят полифосфаты, макроэргические связи которых выступают энергетическими депо, способствующими выживанию бактерий в почве [2]. В отличие от клеток в суспензии, ризобии в стерильной почве утрачивали жгутик, содержали меньше клеточных включений.

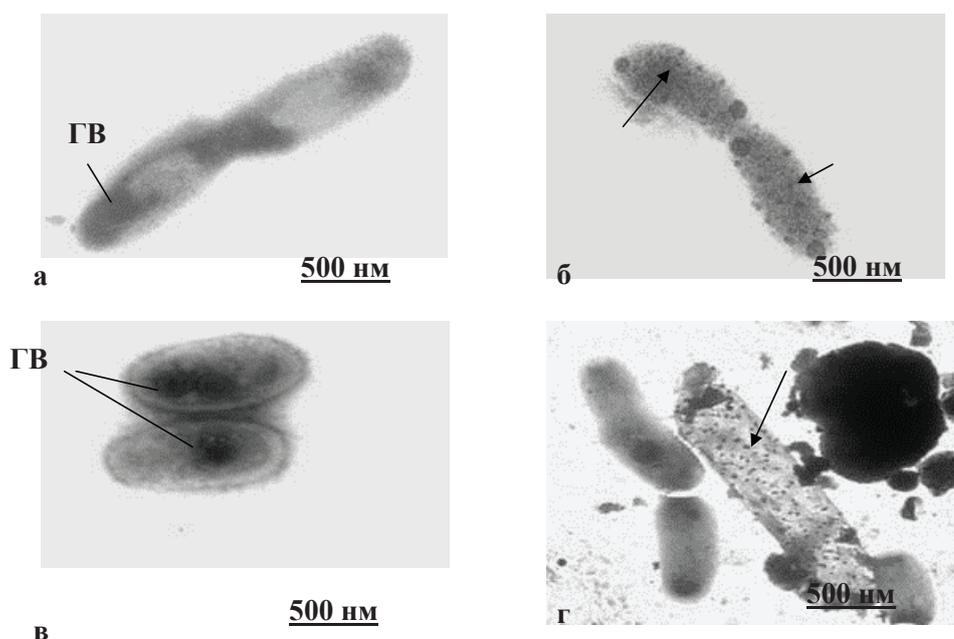


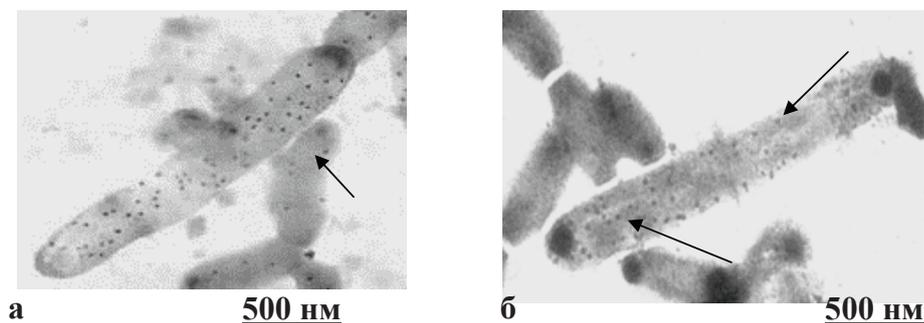
Рис. 2. Электронограммы бактериальных культур в стерильной почве

(а – *B. japonicum* УKM В-6018, без обработки лектинами, б – *B. japonicum* УKM В-6018, обработка лектинами, в – *B. megaterium* УKM В-5724, обработка лектинами, г – ассоциация *B. japonicum* УKM В-6018 и *B. megaterium* УKM В-5724, обработка лектинами). Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Стрелками указаны метки лектинов.

Fig. 2. Electron micrographs of bacterial cultures in the sterilized soil

(а – *B. japonicum* UKM B-6018, without lectin treatment, б – *B. japonicum* UKM B-6018, with lectin treatment, в – *B. megaterium* UKM B-5724, with lectin treatment, г – association of *B. japonicum* UKM B-6018 and *B. megaterium* UKM B-5724, with lectin treatment). Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Lectin labels pointed.

В нестерильных условиях полевых опытов поверхность ПЭТ-пленки обрастала биопленкой, сформированной ризосферными микроорганизмами, представленными палочками различной величины, располагающимися на корешках и прилегающих к ним частицам почвы. При исследовании микробиоценоза ризосферы сои с помощью электронной трансмиссионной микроскопии в варианте моноинокуляции (рис. 3а) и бинарной инокуляции (рис. 3б) обнаружены микроорганизмы длиной более 2 мкм с высокой плотностью лектиновой метки на поверхности капсул, очевидно, принадлежащие к роду *Bradyrhizobium*.



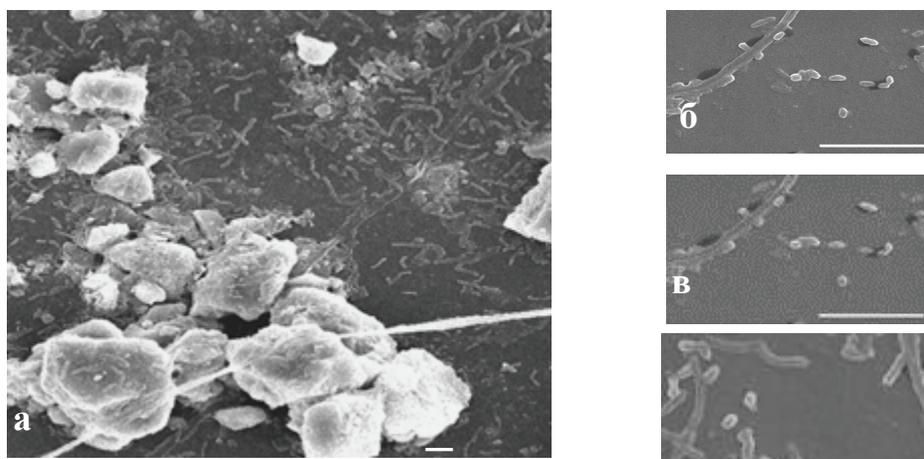
**Рис. 3. Электронограммы микробного ценоза ризосферной почвы сои в полевом эксперименте**

(а – моноинокуляция, б – бинарная инокуляция). Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Стрелками указаны метки лектинов.

**Fig. 3. Electron micrographs of microbial cenosis of soybean rhizosphere soil in the field experiment**

(а – mono-inoculation, б – binary inoculation). Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Lectin labels pointed.

Проведение исследований с применением электронной сканирующей микроскопии позволило составить пейзажные панорамы микробного ценоза ризосферы сои (рис. 4а).



**Рис. 4. Микробный пейзаж ризосферы сои, инокулированной ризобиями (а) и фрагменты пейзажа ризосферы сои в полевых опытах (б – контроль без инокуляции, в – моноинокуляция, г – бинарная инокуляция), длина масштабной метки: 5 мкм.**

Сканирующая электронная микроскопия (Jeol JSM 35С, Япония).

**Fig. 4. Microbial scenery of soybean rhizosphere under rhizobium inoculation (а) and scenery fragments of soybean rhizosphere in the field experiments (б – control without inoculation, в – mono-inoculation, г – binary inoculation), bar: 5 µm.**

Scan electron microscopy (Jeol JSM 35С, Japane).

Установлено, что на панорамном пейзаже пленок обрастания вокруг корневых волосков и на поверхности почвенных частиц развивались микроорганизмы, которые располагались дисперсно или в виде контактных групп из 2–4 бактерий. Определены количественно-морфологические характеристики популяций бактерий в ризосфере растений разных вариантов. Бактерии контрольного варианта были представлены укороченными палочками эллиптической или кокковидной формы, которые располагались на поверхности корневых волосков растения или скапливались небольшими группами в виде цепочек на расстоянии 2–5 мкм от поверхности корешков (рис. 4б). В ризосфере сои в варианте с моноинокуляцией, кроме вышеописанных, наблюдали вытянутые палочки изогнутой формы, длина которых превышала 2 мкм (рис. 4в). В условиях бинарной инокуляции такие бактерии составляли большую часть микробного ценоза ризосферной зоны сои, что было подтверждено данными микроскопических наблюдений (рис. 4г).

В контрольном варианте преобладали мелкие клетки, средние размеры которых составляли 0,4x1,5 мкм (табл. 2). В варианте с моноинокуляцией ризобиями средняя ширина почвенных бактерий возрастала в 1,2 раза по сравнению с контролем, а длина – в 1,5 раза, в варианте с двойной инокуляцией – в 1,5 и 1,3 раза, соответственно.

Таблица 2

**Численность и морфологические характеристики бактерий пленок обрастания в ризосфере сои**

Table 2

**Quantity and morphological characteristics of bacteria in the soybean rhizosphere overgrown blade**

Вариант	Размеры клеток, мкм		Количество клеток на 100 мкм <sup>2</sup> пленки обрастания
	длина	ширина	
Контроль	1,52±0,11	0,42±0,01	17,83±1,22
Инокуляция <i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	2,24±0,13	0,52±0,02	19,71±2,03
Инокуляция <i>B. japonicum</i> УКМ В-6018 совместно с <i>B. megaterium</i> УКМ В-5724	1,98±0,11	0,62±0,03	25,54±2,26

Наибольшее количество клеток на 100 мкм<sup>2</sup> пленки обрастания наблюдали в ризосфере сои с бинарной инокуляцией, в остальных вариантах эта величина была в 1,3–1,4 раза меньше.

Таким образом, использован новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериального сообщества в суспензионной культуре, в стерильной почве и в ненарушенных бобово-ризобияльных системах, базирующийся на использовании ПЭТ-пленок с последующим их



анализом с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Инокуляция семян сои монокультурой *B. japonicum* УКМ В-6018 или совместно с *B. megaterium* УКМ В-5724 приводила к увеличению количественно-морфологических характеристик популяций бактерий в ризосфере. Наибольшие показатели плотности микробиоценоза получены при бинарной инокуляции. Отличия в микробных пейзажах ризосферы сои при применении исследованных инокулянтов могут быть связаны с изменением спектров доминантных форм и активизацией развития эндемных и интродуцированных микроорганизмов в корневой зоне.

УДК 579.262

**Н.І. Адамчук-Чала, Л.В. Титова, Г.О. Іутинська**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна,  
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m\_nv@mail.ru

## **МИКРОБНИ ПЕЙЗАЖИ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ІНТРОДУКЦІЇ РІЗНИХ ІНОКУЛЯНТІВ**

### **Реферат**

**Мета.** Вивчити просторово-функціональну структуру мікробіоценозу ризосфери сої за інтродукції бульбочкових та фосфатмобілізувальних бактерій у складі інокулянтів з використанням структурного аналізу пейзажних панорамних знімків біоплівки обростання. **Метод.** В роботі застосовано новий підхід, що дозволяє визначити морфологічну різноманітність бактеріальної спільноти в непорушених бобово-ризобіальних системах, що базується на використанні полімерних плівок з подальшим аналізом утворених на них мікробних ценозів за допомогою скануючої та трансмісійної електронної мікроскопії. **Результати.** Структурний аналіз пейзажних панорамних знімків біоплівки обростання в зберігаючому режимі показав, що за інокуляції насіння сої монокультурою *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 або спільно з *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 зростає кількість ризосферних бактерій та їх морфометричні показники. **Висновки.** Інокуляція насіння сої моно- та комплексним препаратами брадиризобій сприяла збільшенню кількісно-морфологічних характеристик популяцій бактерій в ризосфері. Найбільші показники щільності мікробіоценозу отримані за сумісної інокуляції досліджуваних бактерій.

Ключові слова: ризосферний мікробіоценоз, соя, інокулянти, біоплівка обростання.



UDC 579.262

**N.I. Adamchuk-Chala, L.V. Tytova, G.O. Iutynska**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, 154, Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m\_nv@mail.ru

## **MICROBIAL SCENERY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER DIFFERENT INOCULANTS INTRODUCTION**

### **Summary**

**Aim.** Investigation of space-functional structure of soybean rhizosphere microbiocenosis under introduction of nodule and phosphate-mobilizing bacteria in the inoculate composition with using of structural analysis of scenery panoramic biofilms. **Methods.** The new method for investigation of bacteria communities morphological diversity of the not destroy soybean-legume systems was employed. This method is based on using of polymer overgrowth blade with next scan and transmission electron microscope analysis. **Results.** Structure analysis of microbe scenery panoramic biofilm in sparing regime showed that soybean seeds inoculation by monoculture *Bradyrhizobium japonicum* UCM B-6018 or both with *Bacillus megaterium* UCM B-5724 promoted increasing of rhizospheric bacteria quantity on the square of view and their morphometric parameters. **Conclusions.** Inoculation of soybean seeds promoted increasing of quantities and morphological characteristics of bacteria populations in the soybean rhizosphere. The greatest effect was obtained in the variant with binary inoculation.

Key words: rhizosphere microbiocenosis, soybean, inoculants, scenery biofilms.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чала Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Грунтознавство. – 2008. – Т. 9, № 1–2. – С. 53–63.
2. Сергійчук М.Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження / М.Г. Сергійчук. – К.: Фітоцентр, 2001. – 323 с.
3. Gregory P.J. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? // European Journal of Soil Science. – 2006. – 57. – P. 2–12.
4. Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S.S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // Science. – 2002. – 296. – P. 1127–1129.
5. Torre J. R., Brett M., Goebel E., Friedmann I., Pace N. R. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – 69. – P. 3858–3867.

Стаття надійшла до редакції 09.04.2014 р.

