

М.В. ЯКИМЕНКО, С.А. БЕГУН, А.И. СОРОКИНА

Сравнительная оценка каталазной активности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды штаммов клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* и *Sinorhizobium fredii* селекции ВНИИ сои

Коллекционные штаммы клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) и *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) различаются по стрессоустойчивости (повышенное содержание NaCl в питательной среде, повышенная температура выращивания) и обладают различной каталазной активностью. Высокую каталазную активность показали 10 % коллекционных штаммов *B. japonicum* и 12 % штаммов *S. fredii*, среднюю – 13 % штаммов *B. japonicum* и 15 % штаммов *S. fredii*. У 40 % штаммов ризобий сои обоих видов каталазная активность не проявилась. Среди ризобий *B. japonicum* преобладали штаммы с умеренной каталазной активностью (44 %). Штаммы *B. japonicum* с повышенной каталазной активностью оказались устойчивыми к концентрации 8,5 г/л хлористого натрия в минерально-растительной среде и температуре выращивания +39...+40 °С. Устойчивость штаммов *S. fredii* к неблагоприятным факторам среды была выше по сравнению со штаммами *B. japonicum* и не зависела от каталазной активности.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии сои, ризобии, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, виды, штаммы, каталаза, стрессоустойчивость, солеустойчивость, температурный шок.

Comparative evaluation of catalase activity and resistance to unfavorable environmental factors of strains of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii*, selected in ARSRI of Soybean. M.V. YAKIMENKO, S.A. BEGUN, A.I. SOROKINA (All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk).

Collection strains of soybean nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) and *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) differ in stress tolerance (increased content of NaCl in the nutrient medium, increased growing temperature). It was established that the collection strains of *B. japonicum* and *S. fredii* have different catalase activity. 10 % of *B. japonicum* collection strains and 12 % of *S. fredii* strains showed high catalase activity, 13 % of *B. japonicum* strains and 15 % of *S. fredii* strains showed an average catalase activity. In 40 % of soybean rhizobia strains of both species, catalase activity was not revealed. Among the rhizobia of *B. japonicum*, strains with moderate catalase activity (44 %) prevailed. The strains of *B. japonicum* with increased catalase activity were resistant to concentration of 8.5 g/l sodium chloride in the mineral-plant medium and to growing temperature +39...+40 °C. The resistance of *S. fredii* strains to unfavorable environmental factors was higher compared with the strains of *B. japonicum* and did not depend on catalase activity.

Key words: soybean nodule bacteria, rhizobia, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium fredii*, species, strains, catalase, stress tolerance, salt tolerance, temperature shock.

*ЯКИМЕНКО Мария Владимировна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, БЕГУН Степан Алексеевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, СОРОКИНА Арина Игоревна – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник (Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск). * E-mail: mariy-y@yandex.ru

Введение

Особенностью почв южной сельскохозяйственной зоны Дальнего Востока России является широкое распространение в них клубеньковых бактерий сои родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium*, которые представляют важную составляющую биологических ресурсов.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте сои (ВНИИ сои) в результате длительного поиска и отбора наиболее ценных по хозяйственно полезным свойствам штаммов из самых северных в мире природных популяций ризобий Восточно-Азиатского региона была создана уникальная коллекция чистых культур этих микроорганизмов. Большинство коллекционных штаммов выделено из почв Амурской области. Отдельные штаммы взяты из почв Еврейской автономной области, Хабаровского и Приморского краев, а также пограничных регионов Китая [10].

Детальное изучение культуральных, физиолого-биохимических и хозяйственно полезных свойств природных популяций ризобий (скорость роста, метаболическая активность, вирулентность, эффективность и др.) позволило выявить среди них два вида: медленно-растущий *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) и быстрорастущий *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) [2]. В настоящее время лабораторная коллекция чистых культур ризобий насчитывает 103 штамма *B. japonicum*, 66 штаммов *S. fredii* и 101 штамм ризобий, выделенных из клубеньков других зернобобовых культур (арахис, люпин, вигна и др.).

Штаммы медленно-растущего вида в чашках Петри дают рост на 7–10-е и даже 20-е сут после посева. Они усваивают ограниченный набор источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма щелочного характера, обладают пониженной осмоустойчивостью, резко замедляют рост на кислых и щелочных питательных средах. В оптимальных условиях этот вид ризобий доминирует при нодуляции растений сои, обладая высокой и устойчивой вирулентностью.

Штаммы быстрорастущего вида в чашках Петри дают рост на 2–4-е сут после посева, хорошо усваивают широкий спектр источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма кислотного характера. Большинство штаммов этого вида обладает высокой осмоустойчивостью. Выделяется группа штаммов *S. fredii* с различной степенью газообразования [9].

Известно, что координация сложных метаболических превращений, протекающих в различных органеллах бактериальной клетки, может быть нарушена под влиянием внешних воздействий, в том числе стрессов, что сопровождается повышением уровня активных форм кислорода [8], которые играют роль ингибиторов процесса азотфиксации [7]. В процессе эволюции микроорганизмы выработали механизмы защиты от стрессов, основанные на детоксикации активных форм кислорода с участием антиоксидантной системы, одним из компонентов которой является фермент каталаза [4, 5]. В связи с этим актуальным представляется изучение сравнительной характеристики каталазной активности коллекционных штаммов ризобий сои и их стрессоустойчивости. Это позволит выявить среди них наиболее приспособленные к изменениям внешней среды.

В качестве стрессовых факторов в таких исследованиях обычно используют повышение содержания соли (NaCl) в питательной среде и температурный шок при выращивании чистых культур [3, 6].

Цель исследований – изучение каталазной активности и стрессоустойчивости штаммов клубеньковых бактерий сои видов *B. japonicum* и *S. fredii* из коллекции ВНИИ сои.

Объекты и методы

Объектами исследований являются чистые культуры ризобий сои видов *B. japonicum* и *S. fredii*. Типовой штамм В-1967 для вида *B. japonicum* получен из коллекции

Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (г. Пущино). Для *S. fredii* взят штамм КНР6 из коллекции Института сельского хозяйства КНР (г. Харбин).

При выращивании чистых культур ризобий использовали минерально-растительную среду следующего состава, г/л: K_2HPO_4 – 0,5, KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4$ – 0,1, $CaSO_4$ – 0,1, $NaCl$ – 0,2, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ – следы; манит – 20,0, соевая мука – 10,0, агар-агар – 20,0 [1]. Каждый штамм высевали в две пробирки, после чего пробирки термостатировали при оптимальной (+26...+28 °С) температуре в течение 10 сут.

Интенсивность роста штриха ризобий определяли по балльной шкале: 0 – нет роста, 1 – скудный, 2 – умеренный, 3 – хороший, 4 – обильный рост.

Солеустойчивость оценивали по интенсивности роста штриха ризобий на минерально-растительной среде с повышенным содержанием $NaCl$ (8,5 г/л). Термоустойчивость изучали по интенсивности роста штриха ризобий после термостатирования пробирок с засеянной культурой при повышенной (+39...+40 °С) температуре в течение 10 сут. Каталазную активность определяли по интенсивности образования пузырьков кислорода при внесении в пробирки с культурой 1 мл 3%-й перекиси водорода. При этом использовался балльный метод оценки активности: высокая (+++), средняя (++) , умеренная (+), ее отсутствие (–) [11]. Активность каталазы оценивали при комнатной температуре и после прогревания пробирки с чистой культурой при температуре 68 °С в течение 30 мин, что позволило выявить термолабильность фермента.

Результаты и обсуждение

Сравнительная оценка каталазной активности штаммов видов *B. japonicum* и *S. fredii* приведена в табл. 1. Коллекционные штаммы обладают различной каталазной активностью и могут быть разбиты на 4 группы – с высокой, средней, умеренной и нулевой активностью. Штаммов с высокой и средней каталазной активностью среди ризобий обоих видов было практически равное количество. Высокой каталазной активностью обладали 10 % коллекционных штаммов *B. japonicum* и 12 % штаммов *S. fredii*, средней – 13 % штаммов *B. japonicum* и 15 % штаммов *S. fredii*. У 40 % штаммов ризобий сои изучаемых видов каталазная активность не проявилась. Среди ризобий *B. japonicum* преобладали штаммы с умеренной каталазной активностью (44 %).

В целом коллекционные штаммы *B. japonicum* показали более высокую ферментативную активность, чем штаммы *S. fredii*.

Таблица 1

Общая характеристика коллекционных штаммов ризобий сои по каталазной активности

| Активность штаммов | <i>B. japonicum</i> | | <i>S. fredii</i> | | Всего штаммов | |
|--------------------|---------------------|-----|------------------|-----|---------------|-----|
| | Кол-во | % | Кол-во | % | Кол-во | % |
| Высокая | 10 | 10 | 8 | 12 | 18 | 11 |
| Средняя | 14 | 13 | 10 | 15 | 24 | 14 |
| Умеренная | 45 | 44 | 15 | 23 | 60 | 35 |
| Нулевая | 34 | 33 | 33 | 50 | 67 | 40 |
| Всего штаммов | 103 | 100 | 66 | 100 | 169 | 100 |

Для исследований на стрессоустойчивость было отобрано по 14 штаммов каждого вида. На минерально-растительной среде без внесения $NaCl$ штаммы обычно показывают обильный и хороший рост бактериальной массы на 10-е сут выращивания.

Высокоэффективные запатентованные штаммы *B. japonicum* (639а, 648а, АС-17, СМ-42, БМ-85) обладают различной степенью каталазной активности (табл. 2). Запатентованные штаммы *S. fredii* (ББ-49, КБ-11, ББ-55, ТБ-508, ТБ-467, ТБ-643) имеют высокие и средние показатели каталазной активности (табл. 3).

У 99 % штаммов быстрорастущего вида *S. fredii* каталазная активность сохраняется после прогревания пробирки с чистой культурой при температуре 68 °С в течение 30 мин, тогда как у штаммов вида *B. japonicum* с умеренной каталазной активностью после прогревания фермент каталаза дезактивируется.

При повышении концентрации поваренной соли в питательной среде до 8,5 г/л штаммы *B. japonicum* ТМ-444, БМ-91, 639а, 648а, АС-17, БМ-85, а также типовой штамм В-1967 показали скудный рост штриха бактериальной массы. Другие штаммы этого вида (ТА-40, ТА-125, СМ-42, СМ-47, ТМ-455, ТМ-464, ТМ-469) снизили интенсивность роста бактериальной массы до умеренного показателя (табл. 2).

Интенсивность роста штаммов с высокой и средней каталазной активностью (ТА-40, ТА-125, СМ-42, СМ-47, ТМ-455, ТМ-464, ТМ-469) на минерально-растительной среде с 8,5 г/л NaCl была выше, чем у штаммов с умеренной активностью.

При выращивании штаммов вида *S. fredii* на среде с 8,5 г/л поваренной соли интенсивность роста бактериальной массы слабо изменялась в сравнении с показателями роста на среде без NaCl (табл. 3).

Таблица 2

Активность и термолабильность фермента каталаза и интенсивность роста штаммов *B. japonicum* на минерально-растительной среде при действии стрессовых факторов

| Штамм | Каталазная активность | | Интенсивность роста | | | |
|---|-----------------------|---------------------------|---------------------|-----|-----------------------|-----------|
| | при комн. температуре | после нагревания до 68 °С | NaCl, г/л | | Температурный шок, °С | |
| | | | 0,2 | 8,5 | +26...+28 | +39...+40 |
| Запатентованные штаммы с высокой активностью каталазы | | | | | | |
| СМ-42 | +++ | + | 3 | 2 | 3 | 1 |
| Запатентованные штаммы с умеренной активностью каталазы | | | | | | |
| В-1967* | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| 639а | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| 648а | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| АС-17 | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| БМ-85 | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| Штаммы с высокой активностью каталазы | | | | | | |
| ТА-40 | +++ | ++ | 3 | 2 | 3 | 1 |
| СМ-47 | +++ | ++ | 4 | 2 | 3 | 1 |
| ТМ-455 | +++ | ++ | 3 | 2 | 3 | 2 |
| ТМ-464 | +++ | +++ | 3 | 2 | 3 | 1 |
| ТМ-469 | +++ | + | 4 | 2 | 3 | 1 |
| Штаммы со средней активностью каталазы | | | | | | |
| ТА-125 | ++ | + | 4 | 3 | 4 | 3 |
| Штаммы с умеренной активностью каталазы | | | | | | |
| ТМ-444 | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |
| БМ-91 | + | - | 3 | 1 | 3 | 0 |

*Типовой штамм.

По сравнению с интенсивностью роста бактериальной культуры вида *B. japonicum* интенсивность роста штаммов вида *S. fredii* на среде с 8,5 г/л NaCl была выше и не зависела от каталазной активности (табл. 3).

При оптимальной температуре выращивания ризобий исследуемые штаммы *B. japonicum* давали хороший рост бактериальной массы. Исключение составил штамм ТА-125: он дал обильный рост штриха чистой культуры на 10-е сут выращивания. При повышении температуры термостатирования до +39...+40 °С прекратило свой рост 60 % изучаемых штаммов *B. japonicum*. Устойчивыми к высокой температуре оказались штаммы *B. japonicum* с повышенной каталазной активностью (ТА-40, ТА-125, СМ-42, СМ-47, ТМ-455, ТМ-464, ТМ-469).

Активность и термоллабильность фермента каталазы и интенсивность роста штаммов *S. fredii* на минерально-растительной среде при действии стрессовых факторов

| Штамм | Каталазная активность | | Интенсивность роста | | | |
|--|-----------------------|---------------------------|---------------------|-----|-----------------------|-----------|
| | при комн. температуре | после нагревания до 68 °С | NaCl, г/л | | Температурный шок, °С | |
| | | | 0,2 | 8,5 | +26...+28 | +39...+40 |
| Запатентованные штаммы с высокой активностью каталазы | | | | | | |
| КБ-11 | +++ | +++ | 4 | 3 | 4 | 3 |
| ББ-49 | +++ | +++ | 4 | 3 | 4 | 2 |
| ТБ-508 | +++ | + | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Запатентованные штаммы со средней активностью каталазы | | | | | | |
| КНР6* | ++ | + | 4 | 3 | 4 | 2 |
| ТБ-467 | ++ | ++ | 4 | 3 | 4 | 0 |
| ББ-55 | ++ | + | 4 | 3 | 4 | 4 |
| ТБ-643 | ++ | ++ | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Штаммы с высокой активностью каталазы | | | | | | |
| СБ-39 | +++ | +++ | 4 | 3 | 3 | 2 |
| ТБ-498 | +++ | + | 4 | 3 | 3 | 4 |
| ББ-90 | +++ | +++ | 4 | 3 | 4 | 4 |
| Штаммы со средней активностью каталазы | | | | | | |
| МБ-85 | ++ | ++ | 4 | 3 | 4 | 0 |
| Штаммы с умеренной активностью каталазы | | | | | | |
| 065 | + | - | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 071 | + | + | 4 | 4 | 4 | 3 |
| ТБ-407 | + | + | 4 | 3 | 4 | 4 |

*Типовой штамм.

Коллекционные штаммы ризобий *S. fredii* при оптимальной температуре давали обильный (71 %) и хороший (29 %) рост штриха чистой культуры. При повышении температуры выращивания до +39...+40 °С два штамма (МБ-85, ТБ-467) прекратили свой рост, пять штаммов (КНР6, КБ-11, ББ-49, СБ-39, 071) замедлили рост биомассы, штаммы ТБ-407, ТБ-508, ББ-90, 065, ББ-55, ТБ-643 дали одинаково хороший или обильный рост бактериальной массы. Штамм ТБ-498 рос интенсивнее при повышенной температуре.

Штаммы *S. fredii* с различной каталазной активностью более устойчивы к повышенной температуре, чем штаммы *B. japonicum*.

Вывод

Таким образом, коллекционные штаммы *B. japonicum* и *S. fredii* обладали различной каталазной активностью. Высокую каталазную активность имели 10 % коллекционных штаммов *B. japonicum* и 12 % штаммов *S. fredii*, среднюю – 13 % штаммов *B. japonicum* и 15 % штаммов *S. fredii*. У 40 % штаммов ризобий сои обоих видов каталазная активность не проявлялась. Среди ризобий *B. japonicum* преобладали штаммы с умеренной каталазной активностью (44 %). Штаммы с повышенной каталазной активностью оказались устойчивыми к концентрации 8,5 г/л NaCl в минерально-растительной среде и температуре выращивания +39...+40 °С. Устойчивость штаммов *S. fredii* к неблагоприятным факторам среды была выше по сравнению со штаммами *B. japonicum* и не зависела от каталазной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегун С.А. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции: метод. рекомендации. Благовещенск: Зея, 2005. 70 с.
2. Бегун С.А., Сорокина А.И., Якименко М.В. Характеристика коллекционных штаммов ризобий по их ферментативной активности // Агр. наука. 2015. № 7. С. 16–18.
3. Воробьев В.А. Симбиотическая азотфиксация и температура. Новосибирск: Наука, 1998. 126 с.
4. Глянько А.К., Акимова Г.П., Макарова Л.Е., Соколова М.Г., Васильева Г.Г. Окислительные процессы на начальных стадиях взаимодействия клубеньковых бактерий и гороха // Прикл. биохимия и микробиол. 2007. Т. 43, № 5. С. 576–582.
5. Гоголева О.А., Немцева Н.В., Бухарин О.В. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий // Прикл. биохимия и микробиол. 2012. Т. 48, № 6. С. 612–616.
6. Ибрагимова М.В., Румянцева М.Л., Онищук О.П., Белова В.С., Курчак О.Н., Андронов Е.Е., Дзюбенко Н.И., Симаров Б.В. Симбиоз клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti* с люцерной *Medicago sativa* в условиях засоления // Микробиология. 2006. Т. 75, № 1. С. 94–100.
7. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М.: Наука, 1968. 532 с.
8. Сытников Д.М., Кругова Е.Д., Мандровская Н.М. Влияние лектина сои на метаболизм и симбиотические свойства штаммов *Bradyrhizobium japonicum* // Биотехнология. 2011. Т. 4, № 6. С. 42–50.
9. Тильба В.А., Бегун С.А., Якименко М.В. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах // Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе. Владивосток: Дальнаука, 2011. С. 95–102.
10. Якименко М.В., Бегун С.А. Основные направления исследований дальневосточных природных популяций // Вестн. ДВО РАН. 2016. № 2. С. 45–49.
11. Takahashi S. Cell wall deficient forms of Mycobacteria // Kekkaku. 1979. N 7. P. 63.