

УДК 631.461.5+576.858.9

## ВЛИЯНИЕ ФАГОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ФАСОЛИ НА БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНЫЙ СИМБИОЗ

ШИЛЬНИКОВА В. К., НЗИТАБАКУЗЕ Ж. Б., МОСКАЛЕНКО Л. Н.  
(Кафедра микробиологии)

Фаги клубеньковых бактерий, по мнению многих исследователей, вызывают изменчивость ризобий [2, 5, 17], влияют на эффективность бобово-ризобияльного симбиоза [1, 3, 4, 6, 8, 9, 20, 21] и снижают численность клубеньковых бактерий в почве [6, 8, 21]. Вместе с тем имеются данные [1, 10, 20, 21] об отсутствии отрицательного действия фагов на численность популяций *Rhizobium* sp. в почве, а также о том, что ризобифаги влияют на симбиотические свойства клубеньковых бактерий и урожайность культур косвенно, нарушая взаимоотношения клубеньковых бактерий с местной микрофлорой [13, 14]. Степень воздействия зависит от условий обитания в почве, пассажей через растение, индивидуальных особенностей штаммов клубеньковых бактерий, в частности их специфической реакции к фаговой инфекции.

Цель настоящей работы — установить влияние активного ризобифага на численность клубеньковых бактерий фасоли и эффективность симбиотической азотфиксации при совместной инокуляции ими семян, а также определить наличие ризобифага в ризосфере и клубеньках растений. Кроме того, ставилась задача выяснить, могут ли лизогенные культуры K15 и Ф2 освобождать фаги, находясь в клубеньках растений.

### Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили лизогенный штамм *Rh. phaseoli* K15, выделенный нами из клубеньков фасоли, которая выращивалась на красноземной почве Грузии, и штамм *Rh. phaseoli* Ф2, полученный из коллекции культур ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. В опытах использовали ризобифаг K15/Ф2, выделенный из зоны лизиса, которая образовалась при нанесении культуральной жидкости штамма *Rh. phaseoli* K15 на газоне тест-культуры Ф2 [7]. По нашему предположению, фаг K15/Ф2 — вирулентный мутант умеренного фага индикаторной культуры *Rh. phaseoli* Ф2.

Исследования проводили в условиях вегетационного опыта в сосудах Митчерлиха (емкостью 6 кг) на кварцевом песке, в котором клубеньковые бактерии фасоли отсутствовали. Влажность поддерживали на уровне 60% полной влагоемкости. В песок вносили соли по Д. Н. Прянишникову с добавлением микроэлементов (мг/кг):  $H_3BO_3$  — 0,8;  $(NH_4)_2MoO_4$  — 0,1;  $MnSO_4$  — 0,6;  $CuSO_4$  — 0,1;  $ZnSO_4$  — 0,1. Азот вносили в форме  $NH_4NO_3$  в дозе 0,2 нормы (16,8 мг на 1 кг песка).

Схема опыта: 1 — контроль (без инокуляции); 2 — инокуляция штаммом K15; 3 — штаммом Ф2; 4 — смесью штаммов K15+Ф2 (1:1); 5 — фагом K15/Ф2+штаммом Ф2 (1:1).

Перед посевом семена фасоли стерилизовали крепкой серной кислотой и многократно промывали водой. Проросшие семена инокулировали 3-суточной культурой штаммов ризобий фасоли, выращенных на жидкой среде № 79 Ковальского [18]. Смешивание штаммов К15 и Ф2, а также ризобифага К15/Ф2 с культурой Ф2 в соотношении 1:1 проводили непосредственно перед инокуляцией ими посевного материала. Семена намачивали в течение 1 ч в стерильных чашках Петри в суспензии подготовленных культур, при посадке в каждую лунку вносили по 1 мл инокулята. Титр вносимых культур ризобий  $1 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл, ризобифага —  $1 \cdot 10^8$  частиц в 1 мл. Повторность опыта 3-кратная.

Растения выращивали до полного созревания бобов. По окончании опыта учитывали урожай надземной массы, бобов и корней, а также определяли содержание общего азота в корнях, надземной массе и бобах микрометодом Кьельдаля, белкового азота в бобах — по Барнштейну. Численность клубеньковых бактерий устанавливали в ризосфере фасоли чашечным методом на среде Эшби с кристаллическим фиолетовым в концентрации 1:100 000. Титр ризобифага в ризосфере и клубеньках фасоли определяли двуслойным методом [15] путем нанесения капель соответствующей болтушки на свежеприготовленный газон индикаторной культуры *Rh. phaseoli* Ф2. Для этого 10 г песка заливали питательной средой № 5 Хитчера [16]. После 30-минутного перемешивания на качалке суспензию центрифугировали при 3500 об/мин в течение 20 мин, затем после обработки супернатанта хлороформом (10:1) готовили разведения до  $10^{-8}$ , которые и испытывали на содержание фага. В случае клубеньков фасоли последние (5 г) стерильно раздавливали в 25 мл среды № 5, а затем суспензию готовили так же, как описано выше. Кроме того, были сделаны препараты ультратонких срезов клубеньков для электронной микроскопии. Метод приготовления таких срезов подробно описан в [11].

### Результаты исследований и их обсуждение

Динамика и характер развития надземной массы и корневой системы растений, инокулированных штаммом Ф2 совместно с ризобифагом К15/Ф2 и инокулированных штаммом К15, практически не различались.

Контрольные (небактеризованные) растения не имели клубеньков. У инокулированных растений они формировались в достаточном количестве и различались по цвету и размеру. При бактеризации штаммом К15 (2-й и 4-й варианты) клубеньки были мелкие, но ярко-розовые, в случае штамма Ф2 — крупные и тоже ярко-розовые, причем их было много. В результате совместной инокуляции штаммом Ф2 и ризобифагом К15/Ф2 также образовалось большое количество клубеньков, однако они были слабо-розовыми и располагались преимущественно в нижней части корневой системы.

Определение численности клубеньковых бактерий в момент снятия опыта показало (табл. 1), что в ризосфере фасоли количество клубеньковых бактерий снизилось на 2—3 порядка по сравнению с первоначальным ( $1 \cdot 10^8$  мл). Исключение составил вариант с культурой Ф2, титр которой сохранился на уровне  $1,2 \cdot 10^8$  клеток на 1 г песка.

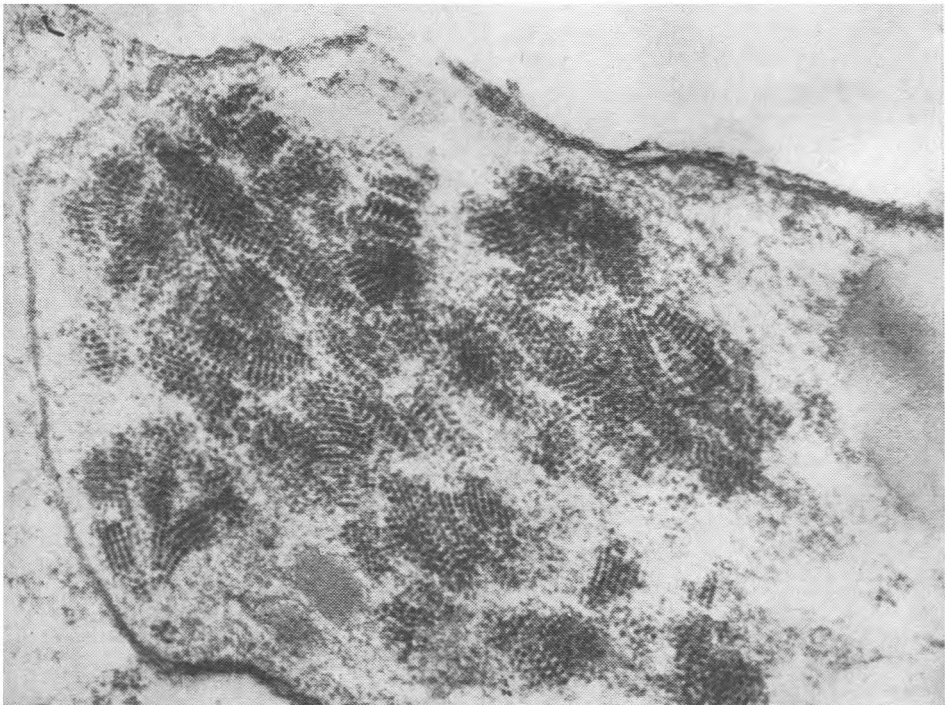
Можно было бы предположить, что численность клубеньковых бактерий фасоли при совместной инокуляции с ризобифагом снизилась под действием фага. Однако снижение численности клубеньковых бактерий во 2-м и 4-м вариантах без бактериофага вполне закономерно, поскольку количество клеток в ризосфере определяется в значительной степени уровнем корневых выделений, который и лимитирует степень их размножения [12].

Численность клубеньковых бактерий фасоли и ризобифага в ризосфере  
и клубеньках растения-хозяина

Вариант опыта	Количество клубеньковых бактерий в ризосфере	Количество фага	
		в ризосфере	в клубеньках
1 — контроль	0	0	0
2 — инокуляция штаммом К15	$7,7 \cdot 10^5$	0	0
3 — » » Ф2	$1,2 \cdot 10^8$	0	0
4 — внесены штаммы К15+Ф2 (1:1)	$2,5 \cdot 10^5$	0	0
5 — внесены штаммы Ф2+фаг К15/Ф2 (1 : 1)	$9,2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^4$

Количественное определение бактериофага в ризосфере и клубеньках фасоли показало, что он присутствует только там, куда его вносили (табл. 1), причем в большом количестве ( $2 \cdot 10^8$ ). Это свидетельствует о хорошей приживаемости бактериофагов в ризосфере бобовых растений и об их размножении за счет чувствительных клеток, поскольку количество обнаруженных частиц фага почти в 2 раза превышает исходное ( $1,2 \cdot 10^8$ ).

Наличие фага в клубеньках зараженных им растений подтверждается данными электронной микроскопии тонких срезов клубеньковой ткани в период полного созревания бобов. Морфологически обнаруженные фаговые частицы в клубеньках фасоли (рис. 1) напоминают кристаллоподобные скопления вируса и идентичны частицам внесенного фага К15/Ф2. При совместной инокуляции фасоли лизогенными культурами К15 и Ф2 мог бы выделиться вирулентный мутант умеренного



Фаговые частицы К15/Ф2 в ткани лизирующегося клубенька фасоли, инокулированной смесью штамма клубеньковых бактерий Ф2 и ризобифага К15/Ф2. Ув.  $\times 160\,000$ .

## Эффективность разных штаммов клубеньковых бактерий фасоли (вегетационный опыт)

Вариант опыта	Общая сухая масса растений		Общий азот, %		Белковый азот, %	Содержание белка	
	г/суд	% к контролю	в корнях	в надземной массе		%	% к контролю
1 — контроль	21,97	100	1,90	1,02	1,18	7,1	100
2 — бактеризация штаммом K15	49,19	224	1,97	1,26	2,58	15,5	218
3 — то же Ф2	44,45	203	1,64	1,22	2,60	15,6	220
4 — внесены штаммы K15+Ф2 (1:1)	53,16	242	1,67	1,22	2,76	16,6	234
5 — то же Ф2+фаг K15/Ф2 (1:1)	50,0	228	0,98	0,95	2,09	12,5	176

фага из культуры Ф2, как это отмечалось в лабораторных опытах [7]. Однако результаты определения бактериофага в ризосфере и клубеньках, а также электронно-микроскопические исследования клубеньковой ткани показали, что выделения вирулентного фага (аналогичного фагу K15/Ф2) в наших опытах не произошло.

Инокуляция фасоли клубеньковыми бактериями определила положительный эффект симбиоза (табл. 2).

Совместное заражение семян фасоли штаммом *Rh. phaseoli* Ф2 и активным к нему ризобифагом K15/Ф2 не влияло на рост и развитие растений, но содержание азота в зерне снизилось на 20% по сравнению с его количеством в растениях, зараженных только культурой Ф2 без внесения ризобифага. Содержание белкового азота также уменьшилось при внесении ризобифага.

Аналогичные данные получены Савицкой и Голембевской [20]. В их опытах содержание белка в люцерне снизилось на 16—40% при бактеризации семян тремя штаммами *Rh. meliloti* совместно с ризобифагом.

При инокуляции фасоли смесью штаммов — лизогенным штаммом K15 и индикаторным к содержащемуся в культуре K15 ризобифагу штаммом Ф2 — урожай зеленой массы был выше, чем при бактеризации каждым из этих штаммов в отдельности. Однако, поскольку значительного накопления азота в этом случае не наблюдалось, можно говорить лишь о тенденции увеличения процентного содержания белка при смешанной инокуляции, преимущества которой ранее отмечали Линдеман с соавторами [19].

Итак, в нашем опыте вирулентный фаг оказал непосредственное влияние на размножение чувствительной культуры Ф2. Но в естественных условиях — условиях популяций различных штаммов ризобий — лизирующее действие ризобифага на клубеньковые бактерии не всегда проявляется. В этом случае под действием фагов скорее образуются неvirulentные и малоактивные варианты ризобий, поэтому конечный результат воздействия фага на урожайность растений зависит от многих факторов среды. Тем не менее выявление наличия в почве ризобифагов, активных в отношении нитрагинных и природных штаммов клубеньковых бактерий, необходимо. Применение фагорезистентных штаммов, особенно под посевами многократно инокулированных бобовых, может предотвратить нежелательное снижение качества урожая, ибо на таких участках, где уже имеются многочисленные клубеньковые бактерии, могут встречаться в избытке и ризобифаги с широким спектром литического действия.

## Заклучение

Совместная инокуляция семян фасоли ризобифагом K15/Ф2 и чувствительной к нему культурой *Rh. phaseoli* Ф2 привела к снижению содержания азота и белка в растениях, что объясняется влиянием ризобифага, хорошо приживающегося в ризосфере и клубеньках фасоли.

Впервые в результате электронно-микроскопических исследований выявлено присутствие в клубеньковой ткани фасоли ризобифага (K15/Ф2) при совместной инокуляции им и культурой клубеньковых бактерий (Ф2) семян фасоли.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Доросинский Л. М. Влияние бактериофага на развитие клевера. «Микробиология», 1941, т. 10, вып. 2, с. 208—215. — 2. Израильский В. П. Полиморфизм клубеньковых бактерий. Тр. Всесоюз. НИИ с-х. микробиологии, 1933, вып. 5, с. 62—81. — 3. Калинин А. Д. Бактериофаг клубеньковых бактерий и его влияние на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Тр. Ин-та микробиологии АН ЛатвССР, 1952, вып. 1, с. 47—51. — 4. Колешко О. И., Тевелева М. К. Изменение физиологических и биохимических свойств клубеньковых бактерий под влиянием бактериофага. «Прикладная биохимия и микробиология», 1967, № 6. — 5. Крайский Н. А. Изменчивость клубеньковых бактерий. 1. Образование рас под влиянием бактериофага. «Микробиология», 1941, т. 10, вып. 4, с. 396—400. — 6. Лаузне Э. Я. Влияние бактериофага на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий клевера и гороха. В сб.: Микроорганизмы и растения. Т. III. Рига, «Зинатне», 1967, с. 85—87. — 7. Нзитабакузе Ж. Б., Москаленко Л. Н., Раутенштейн Я. И., Шильникова В. К. Лизогения клубеньковых бактерий фасоли, выделенных из почв Руанды и СССР. «Изв. ТСХА», 1977, вып. 3, с. 15—20. — 8. Разумовская З. Г. К вопросу о клубеньковом бактериофаге. Арх. биол. наук, 1932, т. 32, вып. 4, с. 308—311. — 9. Тевелева М. К. Влияние фаговой инфекции на биохимическую активность клубеньковых бактерий. Автореф. канд. дис. Минск, 1970. — 10. Швецова О. И. Бактериофаг и клубеньковые бактерии. Сообщ. II. «Микробиология», 1944, т. 13, вып. 1, с. 107—112. — 11. Шильникова В. К. Ультратонкая организация клубеньковых бактерий клевера и люцерны в условиях чистой культуры и симбиоза. В сб.: Новое в биологической азотфиксации. М., «Наука», 1971, с. 50—53. — 12. Шильникова В. К. Приживаемость клубеньковых бактерий в ризосфере клевера в начальные этапы инфицирования. «Изв. ТСХА», 1975, вып. 6, с. 19—29. — 13. Gołębiewska J., Sawicka A., Sypniewska N. "Pol. J. Soil Sci.", 1971, t. 2, s. 131—133. — 14. Gołębiewska J., Sawicka A., Swiontek J. "Acta microbiol. Pol.", 1976, t. 25, s. 161—166. — 15. Gratia A. "Ann. Inst. Pasteur", 1936, vol. 57, p. 625—653. — 16. Hirschner E. "J. Bacteriol.", 1930, vol. 19, p. 191—196. — 17. Kleczkowska J. "J. Gen. Microbiol.", 1950, p. 298—299. — 18. Kowalski M., Staniewski R., Ziemiecka J. "Ann. Inst. Pasteur", 1963, vol. 105, N 2, p. 237—241. — 19. Lindeman W. C., Schmidt E. L., Ham G. S. "Soil Sci.", 1974, N 4, p. 274—282. — 20. Sawicka A., Gołębiewska J. "Acta microbiol. Pol.", 1976, t. 25, N 2, s. 123—132. — 21. Sawicka A., Gołębiewska J. "Acta microbiol. Pol.", 1976, t. 25, N 2, s. 129—138. — 22. Vandekaveye S. C., Fuller W. H., Katznelson H. "Soil Sci.", 1940, vol. 50, p. 15—27.

Статья поступила 13 июля 1977 г.

## SUMMARY

In the pot experiment under conditions of sandy cultures, bean inoculated with the strain *Rh. phaseoli* K15, strain F2, with the mixture of these strains in ratio 1:1, and with the strain F2 in combination with the phage K15/F2 (a virulent mutant of a moderate phage of indicatory culture *Rh. phaseoli* F2) was grown. In combined inoculation of bean seed with rhizobio-phage K15/F2 with the culture F2 which is sensitive to it the content of nitrogen and protein in plants was by about 20% lower than in plants inoculated only with the lysogenic strain F2. This is due to the effect of the active rhizobio-phage in bean nodules; its presence is confirmed by the analysis of ultrathin sections of the nodule tissue by an electronic microscope.