

ОЦІНКА ПАТОГЕННОСТІ ШТАМУ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* Г 222

О. В. Вороная, Н. О. Кравченко, С. Ф. Козар, Т. А. Євтушенко,
О. М. Білоконська

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: alexvoronaia@ukr.net

Мета. Дослідити патогенні (непатогенні) властивості нового штаму бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* Г 222. **Методи.** Мікробіологічні (отримання суспензії *R. leguminosarum* Г 222, визначення її титру за оптичним стандартом мутності та шляхом висіву на живильне середовище; мікроскопія фарбованих мазків-відбитків внутрішніх органів дослідних тварин та висіву зразків тканин на живильне середовище), патологоанатомічні (для визначення можливої інвазивності та дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин — на моделі безпородних білих мишей після введення суспензії живих клітин бактерій — перорально у дозах від $0,5 \times 10^9$ до 5×10^9 КУО у $0,5 \text{ см}^3$ стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію на одну мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО/ $0,5 \text{ см}^3$) та статистичні. **Результати.** За 15 діб спостережень після введення суспензії живих клітин бактерій не виявлено загибелі дослідних тварин. Штам не призводив до будь-яких змін у загальному стані організму мишей. Змін у їхній поведінці не спостерігали. За 15 діб після початку досліджень встановлено, що цей штам не інвазивний (не інвазивний), не дисемінує і не розмножується в організмі дослідних тварин. Пероральне та внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин культури не спричинило інвазії бактерій у внутрішні органи тварин. Ретрокультур не виявлено. За проведення патологоанатомічних досліджень внутрішніх органів дослідних тварин не виявлено характерних змін. Отримані результати свідчать про авірулентність штаму для досліджених теплокровних тварин ($LD_{50} \text{ в/ч} > 5$ млрд клітин/мишу, $LD_{50} \text{ per os} > 5$ млрд клітин/мишу). **Висновки:** Згідно з отриманими результатами щодо відсутності вірулентності та нормативних документів новий штам *R. leguminosarum* Г 222 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних лабораторних тварин, може вважатися непатогенним і використовуватися як основа мікробних препаратів для підвищення урожайності сільськогосподарських культур.

Ключові слова: *Rhizobium leguminosarum*, патогенність, вірулентність, інфективність (інвазивність).

Завдяки посиленню тенденції до екологізації аграрного виробництва у вирощуванні сільськогосподарських культур останнім часом набуло особливої актуальності використання мікробних препаратів, зокрема на основі діазотрофів. Ці бактерії мають здатність фіксувати атмосферний азот і переводити його в сполуки, які засвоюються рослинами [1–3]. Аналіз наукових публікацій свідчить, що інтерес до біологічної азотфіксації активно проявляється впродовж останніх десяти-

літь і продовжує зростати [4–7]. Це пов'язано не лише з визначальною роллю цього процесу в азотному балансі біосфери, а й з можливістю скорочення обсягів застосування промислового азоту в технологіях вирощування польових культур та з прагненням знизити енергетичні витрати на виробництво рослинної продукції.

Одним із пріоритетних напрямів сучасного землеробства є використання симбіотичної азотфіксації для підвищення продукти-

вності бобових культур та відтворення родючості ґрунтів [8]. Азотфікувальний потенціал симбіозів бобових культур з ризобіями, присутніми у ґрунті, часто обмежений їх невисокою активністю або недостатньою чисельністю бактерій у зоні проростання насіння [9; 10]. У зв'язку з цим виникла необхідність пошуку активних штамів бульбочкових бактерій для збільшення ефективності бобово-ризобіального симбіозу [11; 12].

Багаторічні токсиколого-гігієнічні дослідження показали, що мікробні препарати на основі бульбочкових бактерій не токсичні для людини і навколишнього середовища. Водночас оригінальність таких препаратів, а саме жива природа діючого чинника, є причиною обережного ставлення до них з погляду біобезпеки [13; 14]. Тому обов'язковим є проведення досліджень патогенних властивостей штамів бактерій як основи майбутніх біопрепаратів.

Метою нашої роботи було дослідження патогенних властивостей штаму бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* Г 222, який характеризується високою азотфіксувальною активністю.

Матеріали і методи. Бактерії *R. leguminosarum* Г 222 вирощували в стаціонарних умовах за +28 °С і рН 7,0 протягом 72 годин на твердому живильному середовищі (бобовий агар). Для досліджень використовували змив бактеріальних клітин. Гомогенізовану суспензію готували на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності, а також шляхом титрування з подальшим висівом на живильне агаризоване середовище.

Інфективність (інвазивність) штаму визначали шляхом встановлення можливості дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин після зараження з урахуванням можливого природного шляху проникнення (*per os*) у макроорганізм. Для цього дослідним білим мишам вводили одноразово активну культуру бактерій у максимальних дозах, які не призводять до загибелі тварин. За 15 діб після зараження проводили вимушений забій лабораторних мишей, мікроскопічні дослідження фарбованих мазків-відбитків їхніх внутрішніх органів та висіви зразків тканин на живильне середовище. Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з

лабораторними тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Strasbourg, 1986 p.) [15] і «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 p.) [16]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладеними в директиві Європейської Спільноти [17].

Результати та їх обговорення. Штам *R. leguminosarum* Г 222 виділено з бульбочок гороху посівного. Досліджуваний рід бактерій не належить до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [18; 19]. Проте хоча бактерії роду *Rhizobium* вже давно використовуються в сільському господарстві, постійно селекціонуються нові активні штамми, які так само потребують детального вивчення.

Щоб підтвердити відсутність патогенної дії цього штаму для теплокровних лабораторних тварин вивчали один із показників патогенності — вірулентність активних життєздатних клітин бактерій на моделі білих мишей. Вірулентність є умовною мірою патогенності, її встановлювали за рівнем дози життєздатних клітин, яка викликає загибель 50 % заражених тварин (LD₅₀).

У підсумку проведених досліджень встановлено, що за 15 діб спостереження після введення суспензії живих клітин бактерій (перорально у дозах від $0,5 \times 10^9$ до 5×10^9 КУО у $0,5 \text{ см}^3$ стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію на одну мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО/ $0,5 \text{ см}^3$) тварини добре поїдали корм, мали жвавий вигляд, не було відзначено змін хутряного покриву. Достовірної різниці в масі та температурі тіл дослідних і контрольних тварин, а також у загальному стані організму та поведінці не спостерігали (табл. 1).

Критерієм авірулентності є відсутність загибелі лабораторних мишей упродовж 15 діб та характерна відсутність патологічної зміни внутрішніх органів на патологоанатомічному розтині (табл. 2).

За результатами мікробіологічних досліджень внутрішніх органів дослідних тварин за 15 діб після початку досліджень встанов-

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності *R. leguminosarum* Г 222

Матеріал для введення	Кількість тварин у досліді, гол.	Доза		Спосіб введення	Кратність введення	Кількість тварин, гол.		
		см ³	млрд клітин			захворіло	загинуло	вижило
Суспензія активних клітин бактерії	5	0,5	1,0	в/ч*	1	0	0	5
	5	0,5	5,0	в/ч	1	0	0	5
	5	0,5	0,5	<i>per os</i> **	1	0	0	5
	5	0,5	1,0	<i>per os</i>	1	0	0	5
	5	0,5	5,0	<i>per os</i>	1	0	0	5
Контроль (ізотонічний розчин)	5	0,5	0	в/ч	1	0	0	5
	5	0,5	0	<i>per os</i>	1	0	0	5

Примітка: *в/ч — внутрішньочеревне введення; ***per os* — введення через рот.

Таблиця 2. Результати патологоанатомічного розтину лабораторних тварин

Досліджувані органи	Результати патологоанатомічного дослідження
Серце	у межах анатомічної норми
Легені	в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спайок не відзначено
Шлунок, петлі тонкого і товстого кишковика	зовні без змін та ознак здуття, на розрізі малюнок слизової не змінений
Печінка	темно-червоного кольору, в об'ємі не збільшена, пружної консистенції, середнього кровонаповнення, поверхня гладенька
Нирки	не збільшені, бобоподібної форми, поверхні гладенькі, на розрізі чітко видно малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами незгладжена
Селезінка	не збільшена, пружної консистенції, на розрізі пульпа помірно повнокровна, темного кольору

лено, що цей штам мікроорганізмів не інфективний, не дисемінує і не розмножується в організмі.

Пероральне та внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин культури не спричинило інвазії бактерій у внутрішні органи тварин. Ретрокультур не виявлено.

Отримані результати (табл. 2) свідчать про авірулентність штаму для досліджених теплокровних тварин (LD_{50} в/ч > 5 млрд клітин/мишу, LD_{50} *per os* > 5 млрд клітин/мишу).

Отже, *R. leguminosarum* Г 222 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин [20–22]. Згідно з даними щодо відсутності вірулентності, без урахування рівнів токсичності, токсикогенності, алергенності, дисбіотичної дії, штам

R. leguminosarum Г 222 може вважатися не-патогенним та використовуватися для виготовлення мікробних препаратів для сільськогосподарських культур.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Патики В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В., Шерстобоева О. В., Мельничук Т. М., Калініченко А. В., Гриник І. В. Біологічний азот / За ред. В. П. Патики. К. : Світ, 2003. 424 с.
2. Herridge D. F., Peoples M. B., Boddey R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*. 2008. № 311. P. 11–18
3. Schuulte C. M., Khushbo B. R., Wheatley M. Metabolic control of nitrogen fixation in rhizobium – legume symbioses. *Science Advances*. 2021. № 7. C. 22–25. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2433>
4. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Ковалевська Т. М., Токмакова Л. М., Копилов Є. П.,

- Козар С. Ф. ... Халеп Ю. М. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / За ред. В. В. Волкогона. К. : Аграрна наука, 2006. 312 с.
5. Петриченко В. Ф., Тихонович І. А., Коць С. Я. Сільськогосподарська мікробіологія і збалансований розвиток агроєкосистем. *Вісник аграрної науки*. 2012. № 8. С. 5–11.
6. Волкогон В. В. Сільськогосподарська мікробіологія в Україні: здобутки, проблеми, перспективи. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 11. С. 20–27.
7. Newton W. E. Nitrogen fixation: some perspectives and prospects. Proceedings 1st European nitrogen fixation conference (Szeged, 10–12 July). Szeged, 1994. P. 1–6.
8. Моргун В. В., Коць С. Я. Симбіотична азотфіксація та її значення в азотному живленні рослин: стан і перспективи досліджень. *Фізіологія і біохімія рослин*. 2008. Т. 40. № 1. С. 23–24.
9. Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G. Rhizobium – legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Acta Horticulturae*. 2018. Vol. 3. P. 186–194.
10. Lindstrom K., Mousavi S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Thematic Issue on Agricultural Biotechnology*. 2020. № 13. P. 57–63. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
11. Deaker R., Roughley R. J., Kennedy I. R. Legume seed inoculation technology — a review. *Soil biology and biochemistry*. 2004. № 36. P. 275–288.
12. Andrews M., Andrews M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. № 18. P. 75–79. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
13. Наказ Міністерства охорони здоров'я України. Про режим роботи з патогенними мікроорганізмами. 1992, № 183 (14 грудня). 9 с.
14. Бардова В. Г. Гігієна та екологія. Вінниця. 2006. 249 с.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. European treaty series. Strasbourg. 1986. № 123. 50 p.
16. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Вісник зоології*. 2003. № 8. С. 142–145.
17. Directive 2010.63.EU. of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official journal of the European Union*. 20.10.2010. 79 p.
18. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. — ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів. 4-е вид. 1995. 34 с.
19. Tayabali A. F., Coleman G., Crosthwait J., Nguyen K. C., Zhang Y., Shwed P. Composition and pathogenic potential of a microbial bioremediation product used for crude oil degradation. 2017. *Biotechnol Rep*. № 3. P. 123–125. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0776>
20. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев. 1982. 22 с.
21. ДСТУ 2424:94. Промислова мікробіологія. Терміни та визначення: [Чинний від 1994-05-12]. Київ : Держстандарт України, 1994. 23 с.
22. Методико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ. 2004. 44 с.

Отримано 18.08.2021

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.34.23-28>

UDC 632.937.14:612.064

EVALUATION OF PATHOGENICITY OF NODULE BACTERIA STRAIN *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* G 222

O. V. Voronaia, N. O. Kravchenko, S. F. Kozar, T. A. Yevtushenko, O. M. Bilokonska

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: alexvoronaia@ukr.net

Objective. Investigate pathogenic (non-pathogenic) properties of a new strain of nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* G 222. **Methods.** Microbiological (obtaining a suspension of *R. le-*

*guminosarum G 222, determination of its titre by opacity optical standard and by seeding on a digest medium; microscopy of stained imprint smears of internal organs of experimental animals and seeding of tissue samples on a digest medium), pathoanatomical (to determine possible invasiveness and dissemination of bacteria in the tissues of internal organs of animals — in the model of outbred white mice after administration of a suspension of live bacterial cells (oral doses from 0.5×10^9 to 5×10^9 CFU in 0.5 cm^3 of sterile isotonic sodium chloride solution per mouse and intraperitoneal doses from 1×10^9 to 5×10^9 CFU/ 0.5 cm^3) and statistical. **Results.** Over 15 days of observations after administration of a suspension of live bacterial cells, no death of experimental animals was registered. The strain did not lead to any changes in the general condition of the mice. No changes in their behaviour were reported. Fifteen days after the start of the study, it was found that this strain is non-infective (non-invasive), does not disseminate and does not reproduce in the body of experimental animals. Oral and intraperitoneal doses of a suspension of live bacterial cells did not result in bacterial invasion of animal internal organs. No retrocultures were registered. Gross examination did not find characteristic changes in the internal organs of the experimental animals. The obtained results indicate the avirulence of the strain for the studied warm-blooded animals (intraperitoneal $LD_{50} > 5$ billion cells/mouse, oral $LD_{50} > 5$ billion cells/mouse). **Conclusion:** According to the results regarding the lack of virulence and according to regulations, the new strain *R. leguminosarum G 222* belongs to the group of avirulent microorganisms that are not able to invade the internal organs of studied warm-blooded laboratory animals and can be considered non-pathogenic and used as a basis for microbial preparations to increase crop yields.*

Key words: *Rhizobium leguminosarum*, pathogenicity, virulence, infectivity (invasiveness).

REFERENCES

1. Patyka, V. P. (Ed.), Kots, S. YA., Volkohon, V. V., Sherstoboyeva, O. V., Melnychuk, T. M., Kalinichenko, A. V., Hrynyk, I. V. (2003). *Biologichnyy azot* [Biological nitrogen]. Kyiv: Svit [in Ukrainian].
2. Herridge, D. F., Peoples, M. B. & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311, 11–18.
3. Schuulte, C. M., Khushbo, B. R., & Wheatley, M. (2021). Metabolic control of nitrogen fixation in rhizobium-legume symbioses. *Science Advances*, 7, 22–25 <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2433>
4. Volkohon, V. V. (Ed.), Nadkernychna, O. V., Kovalevska, T. M., Tokmakova, L. M., Kopylov, Ye. P., Kozar, S. F. ... Khalep, Yu. M. (2006). Mikrobni preparaty u zemlerobstvi. Teoriya i praktyka. [Microbial preparations in agriculture. Theory and practice.] Kyiv: Ahrarna nauka [in Ukrainian].
5. Petrychenko, V. F., Tykhonovych, I. A. & Kots, S. Y. (2012). Silskohospodarska mikrobiologiya i zbalansovany rozvytok ahroekosystem [Agricultural microbiology and balanced development of agroecosystems]. *Visnyk ahrarnoyi nauky — Bulletin of Agricultural Science*, 8, 5–11 [in Ukrainian].
6. Volkohon, V. V. (2018). Silskohospodarska mikrobiologiya v Ukrayini: zdobutky, problemy, perspektyvy. [Agricultural microbiology in Ukraine: achievements, problems, prospects]. *Visnyk ahrarnoyi nauky — Bulletin of Agricultural Science*, 11, 20–27 [in Ukrainian].
7. Newton, W. E. (1994, July). Nitrogen fixation: some perspectives and prospects. Proceedings Ist European nitrogen fixation conference (pp. 1–6), Szeged.
8. Morhun, V. V., Kots, S. Y. (2008). Symbiotychna azotifikatsiya ta yiyi znachennya v azotnomu zhyvlenni roslyn: stan i perspektyvy doslidzhen. [Symbiotic nitrogen fixation and its importance in nitrogen nutrition of plants: status and prospects of research]. *Fiziologiya i biokhimiya Roslyn — Plant physiology and biochemistry*, 40 (1), 23–24 [in Ukrainian].
9. Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., & Stacey, G. (2018). Rhizobium – legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Acta Horticulturae*, 3, 186–194.
10. Lindstrom, K., Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Thematic Issue on Agricultural Biotechnology*, 13, 57–63. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
11. Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology — a review. *Soil biology and biochemistry*, 36, 275–288.
12. Andrews M., & Andrews M. E. (2017) Specificity in Legume — Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 75–79. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
13. Nakaz Ministerstva ohorony zdorovya Ukrayiny 14.12.1992. № 183 *Pro rezhym roboty z patohennymy mikroorhanizmamy* [Order of the Ministry of Health of Ukraine of № 183 On Mode of operation with Pathogenic Microorganisms.]. (1992, 14 December) [in Ukrainian].

14. Bardova, V. H. (2006). *Hihiyena ta ekolohiya*. [Hygiene and ecology.]. Vinnytsya [in Ukrainian].
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. (1986). European treaty series. Strasbourg. № 123. 50 p.
16. Reznikov, O. H. (2003). Zahalni etychni pryntsyipy eksperymentiv na tvarynakh. [General ethical principles of experiments on animals]. *Visnyk zoologiyi — Bulletin of Zoology*, 8, 142–145 [in Ukrainian].
17. Directive 2010.63.EU. (20.10.2010). Of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official journal of the European Union*. 79 p.
18. Katehoriyi biolohichnykh ahentiv u vidpovidnosti do nebezpeky ta katehoriyi kontaminatsiyi. (1995). [Categories of biological agents according to hazard and category of contamination]. VOOZ, Konsultatyvnyy komitet nebezpeky patoheniv. 4-e vyd [in Ukrainian].
19. Tayabali, A. F., Coleman, G., Crosthwait, J., Nguyen, K. C., Zhang, Y., Shwed, P. (2017). Composition and pathogenic potential of a microbial bioremediation product used for crude oil degradation. *Biotechnol Rep*, 3, 123–125. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0776>
20. Metodicheskiye ukazaniya po gigiyenicheskoy otsenke mikrobynykh sredstv zashchity rasteniy ot nasekomykh i bolezney na osnove nesporoobrazuyushchikh mikroorganizmov. (1982) [Guidelines for the hygienic assessment of microbial plant protection products against insects and diseases based on non-spore-forming microorganisms]. Kyiv [in Ukrainian].
21. DSTU 2424:94. Promyslova mikrobiologiya. Terminy ta vyznachennya. [Industrial microbiology. Terms and definitions.]. Kyiv: Derzhstandart Ukrayiny, 1994 [in Ukrainian].
22. Metodyko-biolohichni doslidzhennya vyrobnychykh shtamiv mikroorganizmiv i toksyko-higiyenichna otsinka mikrobynykh preparativ, vyznachennya yikh bezpeky ta obgruntuvannya hihiyenychnykh normatyviv i rehlamentiv. (2014). [Methodological and biological research of production strains of microorganisms and toxic-hygienic assessment of microbial preparations, determination of their safety and substantiation of hygienic standards and regulations]. *Metodychni vkazivky*. MOZ Ukrayiny. Kyiv [in Ukrainian].

Received 18.08.2021