

А.И. Сорокина,
М.В. Якименко,
С.А. Бегун

Всероссийский научно-исследовательский
институт сои, Благовещенск, Российская
Федерация

✉ aziradot@mail.ru

Поступила в редакцию:
05.07.2022

Одобрена после рецензирования:
30.08.2022

Принята к публикации:
11.12.2022

Чувствительность штаммов, выделенных из дальневосточных природных популяций ризобий, к антбактериальным препаратам

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Из корневых клубеньков *Vigna radiate*, *Vigna unguiculata* и *Vigna angularis*, взятых из почв Дальнего Востока Российской Федерации, выделено и оставлено для дальнейших исследований 76 штаммов ризобий, отличающихся по своим физиологико-биохимическим характеристикам от *B. japonicum* и *S. fredii*.

Методы. Вирулентность новых штаммов ризобий, выделенных в чистую культуру из клубеньков различных зернобобовых культур, определяли методом выращивания бактеризованных семян в пробирках диаметром 20 мм и высотой 200 мм с питательной средой для растений следующего состава, г/л: K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 1,0; $CaSO_4$ — 0,5; $FeSO_4$, H_3BO_3 , $MnSO_4$ и $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ — следы. По наличию клубеньков определяли вирулентность, а по их количеству — интенсивность образования клубеньков за счет изучаемого штамма. Определение первичной оценки внутренней устойчивости штаммов к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом. В работе использовали антибиотики: налидиксовую кислоту (30 мкг), карбенициллин (100 мкг), стрептомицин (10 мкг), эритромицин (15 мкг), рифампицин (5 мкг), тетрациклин (30 мкг). После 3–7 дней инкубации при температуре +27...28 °C проводили учет результатов по диаметру зоны подавления роста штамма: до 10 мм — резистентные (R); от 10 до 15 мм — умеренно резистентные (I); от 15 до 25 мм — чувствительные (S); выше 25 мм — высокочувствительные (HS).

Результаты. Установлено, что у большинства штаммов отмечена резистентность к стрептомицину, эритромицину, рифампицину и налидиксовой кислоте, а наибольшая чувствительность отмечена к тетрациклину и карбенициллину. Штаммы могут быть отнесены к виду *Bradyrhizobium elkanii*.

Ключевые слова: корневые клубеньки, ризобии, вигна, антибиотики, резистентность, инокуляция

Для цитирования: Сорокина А.И., Якименко М.В., Бегун С.А. Чувствительность штаммов, выделенных из дальневосточных природных популяций ризобий, к антбактериальным препаратам. Аграрная наука. 2023; 366 (1): 70-75, <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-366-1-70-75>

© Сорокина А.И., Якименко М.В., Бегун С.А.

Arina I. Sorokina,
Maria V. Yakimenko,
Stepan A. Begun

All-Russian Research Institute of Soybean,
Blagoveshchensk, Russian Federation

✉ aziradot@mail.ru

Received by the editorial office:
05.07.2022

Accepted in revised:
30.08.2022

Accepted for publication:
11.12.2022

Sensitivity of isolated strains from Far Eastern natural populations rhizobia, to antimicrobials

ABSTRACT

Relevance. 76 rhizobia strains differing in their physiological and biochemical characteristics from *B. japonicum* and *S. fredii* were isolated from the root nodules of *Vigna radiate*, *Vigna unguiculata* and *Vigna angularis*, taken from the soils of the Far East of the Russian Federation, and left for further research.

Methods. The virulence of new rhizobia strains isolated into a pure culture from nodules of various leguminous crops was determined by growing bacterized seeds in test tubes (height — 200 mm, diameter — 20 mm) with a nutrient medium for plants of the following composition, g/l: K_2HPO_4 — 1.0; $MgSO_4$ — 1.0; $CaSO_4$ — 0.5; $FeSO_4$, H_3BO_3 , $MnSO_4$, and $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ — traces. The virulence was determined by nodule presence; intensity of nodule formation due to the strain studied was determined by the nodule number. Primary assessment of the inherent strain resistance to antibiotics was performed with the disk diffusion test. Antibiotics used for the research: nalidixic acid (30 µg), carbenicillin (100 µg), streptomycin (10 µg), erythromycin (15 µg), rifampicin (5 µg), tetracycline (30 µg). After 3 to 7 days of incubation at a temperature of +27...28 °C, the results were registered according to the diameter of the strain growth suppression zone: up to 10 mm — resistant (R); 10 to 15 mm — intermediary resistant (I); 15 to 25 mm — sensitive (S); over 25 mm — highly sensitive (HS).

Results. It was found that most strains were resistant to streptomycin, erythromycin, rifampicin, and nalidixic acid, while the highest sensitivity was noted to tetracycline and carbenicillin. Strains can be attributed to the *Bradyrhizobium elkanii* species.

Key words: root nodules, rhizobia, vigna, antibiotics, resistance, inoculation

For citation: Sorokina A.I., Yakimenko M.V., Begun S.A. Sensitivity of isolated strains from Far Eastern natural populations rhizobia, to antimicrobials. Agrarian science. 2023; 366 (1): 70-75, <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-366-1-70-75> (In Russian).

© Sorokina A.I., Yakimenko M.V., Begun S.A.

Введение / Introduction

Соесеющий регион российского Дальнего Востока — это единственный регион в России, где в почвах обитают самые северные в мире природные популяции ризобий.

Основным ограничением при изучении природных популяций в целом является сложность в идентификации штаммов в их естественной среде обитания [1, 2]. Длительное время считалось, что образовывать клубеньки на корнях сои может только один вид клубеньковых бактерий — *Rhizobium aopicum*. Чистые культуры *Rhizobium aopicum* имели строгие параметры культуральных и биохимических свойств, и если у выделенных культур микроорганизмов эти параметры отличались, то их выбраковывали.

В результате использования современных методов определения генетического родства при изучении клубеньковых бактерий представления о ризобиях стали меняться. Из рода *Rhizobium* было выделено два самостоятельных рода — *Bradyrhizobium* [3] и *Sinorhizobium* [4, 5].

Обнаружение в конце прошлого века при исследовании группы штаммов *Bradyrhizobium aopicum*, различающихся по ДНК-ДНК гибридизации, послужило основанием для описания нового вида ризобий — *Bradyrhizobium elkanii* [6, 7]. Данное обстоятельство, в свою очередь, позволило предположить, что в почвах Дальнего Востока РФ среди широкого разнообразия видов ризобий обитают и *Bradyrhizobium elkanii* [8]. Поэтому на опытном участке лаборатории с 2012 года высевались различные зернобобовые культуры: вигна 3 видов (*Vigna radiate*, *Vigna unguiculata*, *Vigna angularis*), арахис (*Arachis hypogaea*), нут (*Cicer ridentinum*, *Cicer reticulatum*), люпин (*Lupinus luteus*), чина (*Lathyrus*), лобиа (*Dolichos*), горох (*Pisum sativum*), бобы (*Vicia faba* L.), чечевица (*Lens culinaris*), а также различные виды фасоли.

Имеется достаточно методов определения характеристик и идентификации штаммов. Например, по составу жирных кислот, анализу метиловых эфиров (FAME) [9] или с помощью системы «Biolog» [10].

При изучении двух гомологичных групп *Bradyrhizobium* Куйнкендалл Л.Д. с группой ученых разделили их по составу жирных кислот на 2 группы — I и II. Штаммы группы I были чувствительны к рифампицину, тетрациклину, стрептомицину, эритромицину, карбенициллину и налидиксовой кислоте, тогда как штаммы группы II были в основном устойчивы к этим антибиотическим препаратам. Поэтому они предположили, что метод определения устойчивости ризобий к антибиотикам может быть использован для идентификации вида *B. elkanii*, так как является простым методом оценки генетической изменчивости в группах выделенных штаммов популяции *Bradyrhizobium spp.* Это подтверждается работами и других исследователей [11–26].

Поэтому целью исследований являлось определить резистентность выделенных из природных популяций штаммов *Bradyrhizobium elkanii* к антибиотическим веществам.

Материал и методы исследования / Materials and method

Объектами исследований являлись чистые культуры новых штаммов ризобий, выделенные из корневых клубеньков различных зернобобовых культур.

В фазы цветения — плодообразования отбирали растения вигны (*Vigna radiate*, *Vigna unguiculata* и *Vigna angularis*), выращиваемые на луговых черноземовидных почвах Амурской области, с хорошо развитыми

клубеньками на корнях. Клубеньки отмывали от почвенных частиц и помещали в фарфоровые тигли с сетчатым дном (тигель Гуча). Тигель последовательно погружали на одну минуту в чашки: 1) с 96%-ным этиловым спиртом; 2) с 0,5%-ным раствором суплемы; 3) с 96%-ным этиловым спиртом. На заключительном этапе клубеньки промывали большим количеством стерильной воды. Простерилизованные клубеньки переносили в пробирки с 1 мл стерильной воды и раздавливали. Из полученной суспензии делали истощающий микробиологический посев в чашки Петри с агаризованной питательной средой МРС следующего состава, г/л: $\text{NaCl} = 0,2$; соль Mo — следы; маннит или лактоза — 20,0; соевая мука — 10,0; агар — 20,0. Засеянные чашки Петри выдерживали в термостате при температуре +26...28 °C. Отдельные наиболее типичные колонии ризобий пересевали для идентификации в пробирки с агаризованной средой МРС с маннитом, лактозой, а также на МПА следующего состава, г/л: агар сухой питательный — 20,0; агар — 10,0. В пробирках со средой МРС у 3–7-суточных культур фиксировали интенсивность роста, окраску и консистенцию штриха. Рост штриха на питательной среде МРС оценивали в баллах: 4 — обильный, 3 — хороший, 2 — умеренный, 1 — скучный, 0 — нет роста. Рост бактериальной массы на питательной среде МПА оценивали: «+» — наличие роста и «-» — нет роста.

Вирулентность новых штаммов ризобий, выделенных в чистую культуру из клубеньков различных зернобобовых культур, определяли методом выращивания бактериализованных семян в пробирках диаметром 20 мм и высотой 200 мм с питательной средой для растений следующего состава, г/л: $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,0$; $\text{MgSO}_4 = 1,0$; $\text{CaSO}_4 = 0,5$; FeSO_4 , H_3BO_3 , молибдат аммония — следы. В качестве субстрата использовали фильтровальную бумагу. В каждую пробирку вносили 30 мл питательной среды для растений. Стерильные семена (стерилизуются концентрированной серной кислотой 2 минуты и промываются большим количеством стерильной воды) раскладывали в подготовленные пробирки и обрабатывали 1 мл суспензии изучаемых штаммов из расчета 1 млн клеток ризобий на семя. На каждый испытываемый штамм использовали не менее 10 пробирок. Через 25–30 суток после закладки опыта учитывали количество клубеньков на корнях каждого растения. По наличию клубеньков определяли вирулентность, а по их количеству — интенсивность образования клубеньков за счет изучаемого штамма. Достоверность проверяли по отсутствию клубеньков на корнях растений в контрольных пробирках без инокуляции.

Определение чувствительности штаммов к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом [27]. В чашки Петри наливали питательную агариизованную среду МДА (следующего состава: $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,5$; $\text{MgSO}_4 = 0,2$; $\text{NaCl} = 0,1$; $\text{CaCO}_3 = 0,1$; дрожжевой экстракт — 2,0; маннит — 10,0; агар — 20,0) в объеме $4 \pm 0,5$ мм (что соответствует 25 мл среды на круглую чашку Петри диаметром 90 мм; 31 мл на круглую чашку Петри диаметром 100 мм; 71 мл на круглую чашку Петри диаметром 150 мм). Для получения сплошного газона изучаемых штаммов в подготовленные чашки, соблюдая стерильность, вносили по 1 мл бактериальной суспензии (109 КОЕ/мл) и равномерно распределяли стерильным шпателем Дригальского по всей поверхности питательной среды, оставляли высушиваться в боксе на 5–10 минут, а затем с помощью пинцета раскладывали диски, пропитанные антибиотиками: рифампицин (5 мкг), стрептомицин (10 мкг), карбенициллин (100 мкг), эритромицин (15 мкг) и тетрациклин (30 мкг). После 3–7 дней инкубации при

температуре +27...28 °С провели учет результатов по диаметру зоны подавления роста штамма: до 10 мм — резистентные (R); от 10 до 15 мм — умеренно резистентные (I); от 15 до 25 мм — чувствительные (S); выше 25 мм — высокочувствительные (HS).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Характеристика и происхождение выделенных штаммов.

В 1999–2005 годах из клубеньков хорошо развитых растений *Vigna angularis*, выращиваемых на луговой черноземовидной почве Амурской области, было выделено в чистую культуру 20 штаммов ризобий без видовой идентификации.

В 2012 году на опытном участке лаборатории были посажены культуры зернобобовых *Vigna radiate*, *Vigna unguiculata* и *Vigna angularis* с целью выделения в чистую культуру из образовавшихся на корнях этих растений новых штаммов ризобий. За 2 срока отбора из клубеньков, образованных на корнях растений, было

выделено 63 штамма, и после многократных пересевов чистых культур на питательные среды МРС с маннитом и лактозой, а также на МПА, по культуральным показателям были отобраны 28 штаммов, обладающих способностью нодулировать сою. Штаммы, выделенные из клубеньков *Vigna unguiculata*, обозначили индексом By, штаммы, выделенные из клубеньков *Vigna radiate*, обозначили индексом Br, и штаммы, выделенные из клубеньков *Vigna angularis*, получили индекс F3 (табл. 1).

Новые штаммы ризобий давали рост штриха бактериальной массы различной интенсивности на агаризованной среде МРС с маннитом и лактозой. Осенью 2013 года из Института сельского хозяйства (г. Магадан) были получены образцы почвы из-под бобовых культур. Весной 2014 года в лабораторных условиях в эту землю были высажены семена сои и вигны. Клубеньки были обнаружены только на вигне (*Vigna radiate*, *Vigna unguiculata*). Из этих клубеньков были выделены в чистую культуру 18 штаммов ризобий (индекс Мд), которые давали обильный и хороший рост штриха

Окончание табл. 1

Происхождение, культура, сроки выделения	Штамм	Интенсивность роста штриха на среде МРС с углеводами		Рост на МПА	Клубенько-образование на сое		1	2	3	4	5	6	7
		маннит	лактоза		количество, шт./раст.	вирулентность, %							
1	2	3	4	5	6	7							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. unguiculata</i>), к460 28 июля — 15 августа 2012 г.	By-2	3	3	+	3,6	90							
	By-4	2	1	н	4,8	100							
	By-5	4	4	н	2,1	70							
	By-6	3	1	н	3,0	80							
	By-8	3	2	+	2,8	80							
	By-9	3	4	+	1,9	60							
	By-10	3	2	н	4,9	80							
	By-11	3	3	+	3,7	90							
	By-12	3	3	+	4,5	60							
	Bр-4	3	2	н	4,9	100							
	Bр-5	3	3	+	3,5	90							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к3096 28 июля — 15 августа 2012 г.	Bр-1	2	2	н	5,2	90							
	Bр-3	3	1	н	4,2	80							
	Bр-4	3	2	н	4,9	100							
	Bр-5	3	3	+	3,5	90							
	Bр-9	3	2	н	3,9	70							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к3098 28 июля — 15 августа 2012 г.	Bр-11	2	1	н	2,8	80							
	Bр-13	2	1	н	1,2	60							
	Bр-15	4	4	+	2,3	70							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. angularis</i>), 15 августа 2012 г.	F3-22	3	2	н	3,3	90							
	F3-23	4	4	+	2,8	80							
	F3-25	4	4	+	0,5	22							
	F3-27	4	3	н	0,9	30							
Почва из Магадана, вигна (<i>V. unguiculata</i>) 18 июня 2014 г.	Мд-0	4	2	+	0,3	22							
	Мд-1	4	3	н	0,1	10							
	Мд-2	4	3	н	0,2	10							
	Мд-3	4	3	н	0	0							
	Мд-4	3	3	н	0,1	10							
	Мд-5	3	3	н	0	0							
	Мд-6	4	4	н	0	0							
	Мд-7	3	3	н	0	0							
	Мд-9	4	3	н	0	0							
	Мд-10	4	3	н	0,6	10							
	Мд-11	4	3	н	0	0							
Почва из Магадана, вигна (<i>V. radiata</i> , к3098) 18 июня 2014 г.	Мд-12	4	3	н	0	0							
	Мд-14	4	3	н	1,2	30							
	Мд-15	4	3	н	0,2	10							
	Мд-16	4	3	н	0	0							
	Мд-17	4	3	н	0	0							
	Мд-18	4	3	н	0,5	20							
	Мд-19	3	2	н	0,3	10							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к3098 28 июля 2014 г.	Br-20	2	1	н	5,6	60							
	Br-21	2	1	н	2,6	40							
	Br-22	2	1	н	10,7	100							
	Br-23	2	1	н	2,6	60							
	Br-24	2	2	+	5,4	100							
	Br-25	2	1	н	6,7	67							
	Br-26	2	1	н	15,7	100							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. radiata</i>), к3098 28 июля 2014 г.	By-13	4	3	н	0,7	33							
	By-14	3	3	н	0	0							
	By-15	4	4	н	1,0	80							
	By-18	4	3	н	0,5	25							
	By-19	4	3	+	0	0							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. unguiculata</i>), к460 28 июля 2014 г.	F3-28	3	4	+	0	0							
	F3-29	2	1	н	3,5	75							
	F3-30	3	3	+	0	0							
	F3-31	3	4	+	3,8	20							
	F3-32	2	1	н	6,0	100							
	By-20	4	3	+	5,0	100							
	By-22	4	4	+	4,2	100							
Амурская область, с. Садовое, вигна (<i>V. unguiculata</i>), к463 7 сентября 2015 г.	By-23	4	3	+	4,7	100							
	By-25	4	3	+	4,1	80							
	By-26	3	3	+	2,8	83							
	By-30	4	3	+	3,5	80							
	By-31	3	3	+	1,5	50							
	By-33	4	3	+	3,3	78							
	By-39	3	1	н	3,5	89							
Почва из Сахалина, вигна (<i>V. radiata</i>), к3098	Br-31	2	2	—	2,6	80							

бактериальной культуры на агаризованной среде МРС с маннитом (табл. 1).

В 2014–2016 годах с целью поиска и отбора новых штаммов, наиболее эффективно нодулирующих сою, на опытном участке ВНИИ сои выращивали различные зернобобовые культуры. Наиболее активное и ежегодное образование клубеньков было отмечено у *Vigna angularis* и различных сортов сои. У люпина, лобии и чечевицы образование клубеньков на корнях не происходило на протяжении трех лет наблюдений. У остальных зернобобовых культур (фасоль, горох, нут, бобы, арахис, вигна *Vigna radiate* и *Vigna unguiculata*) образование клубеньков было неустойчивым.

В 2014 году выделение в чистую культуру ризобий проводили из клубеньков вигны (*Vigna radiate*, *Vigna unguiculata* и *Vigna angularis*), люпина, чины, нута, бобов, гороха, арахиса, сои и фасоли (табл. 1).

В 2015 г. из клубеньков вигны (*Vigna radiate* и *Vigna unguiculata*), выращенной на луговой черноземовидной почве Амурской области, выделено в чистую культуру и оставлено в коллекции 9 штаммов ризобий.

В августе 2015 года был получен образец почвы из г. Южно-Сахалинска. В контейнер с этой почвой были высажены семена сои и вигны (*Vigna radiate* и *Vigna angularis*). Клубеньки образовались только на корнях вигны *Vigna radiate*, из них был выделен штамм ризобий и оставлен в коллекции для дальнейшей работы (табл. 1).

Таким образом, в 2012, 2014, 2015 годах из природных популяций российского Дальнего Востока выделено в чистую культуру 92 штамма ризобий, которые показали различную интенсивность роста на агаризованной среде МРС с маннитом и лактозой. Эти штаммы были проверены по показателям роста на контрольной среде МПА. Большинство штаммов ризобий, выделенных в чистую культуру из почв Амурской, Магаданской и Сахалинской областей, оказались вирулентными на сое. Вирулентность выделенных в чистую культуру ризобий проверяли на сое сортов Гармония, МК-100 и Хабаровская-4. Из них в коллекции для дальнейшего изучения было оставлено 76 штаммов.

Оценка чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам. Для подтверждения видового статуса выделенных штаммов, предположительно отнесенных к виду *B. elkanii*, была проведена оценка устойчивости их к 6 антибиотикам: налидиксовой кислоте, карбенициллину, стрептомицину, эритромицину, рифампицину и тетрациклину (табл. 2).

Из всех 76 изучаемых штаммов 6 (By-4, Br-22, By-34, By-35, By-37, By-38) были резистентны ко всем 6 антибиотикам, 22 штамма были резистентны к 5 антибиотикам, 19 штаммов — к 4 антибиотикам,

Рис. 1. Качественный показатель резистентности штаммов к антибиотикам

Fig. 1. Quantitative indicator of antibiotic resistance of strains

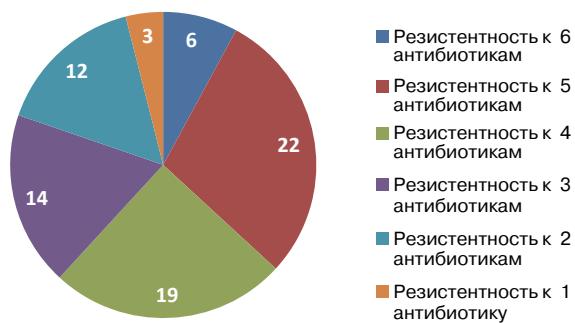


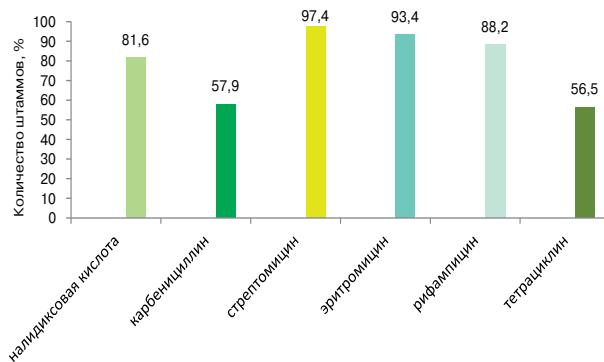
Таблица 2. Устойчивость штаммов *B. elkanii* к антибактериальным препаратам, определенная диско-диффузионным методом

Table 2. Resistance of *B. elkanii* strains to antibacterial drugs, determined by the disk diffusion test

№ п/п	Штамм	Налидиксовая кислота	Карбенициллин	Стрептомицин	Эритромицин	Рифампицин	Тетрациклин
1.	By-4	R	R	R	R	R	R
2.	By-3	I	S	R	I	R	I
3.	By-5	R	I	R	R	I	S
4.	By-30	HS	S	R	I	R	S
5.	By-6	R	S	R	R	R	R
6.	By-26	S	S	R	S	R	HS
7.	By-8	R	S	R	R	R	I
8.	By-25	I	I	R	R	R	I
9.	By-9	R	S	R	R	R	R
10.	By-23	R	I	R	R	I	S
11.	By-10	R	S	I	R	I	R
12.	By-22	R	R	R	R	R	S
13.	By-11	R	R	I	I	R	S
14.	By-20	R	R	R	R	R	I
15.	By-12	S	HS	R	R	R	S
16.	By-19	I	R	R	I	R	S
17.	By-13	R	R	R	R	I	HS
18.	By-18	R	R	R	R	I	HS
19.	By-14	R	I	R	R	S	HS
20.	By-15	R	R	R	R	I	HS
21.	By-33	R	S	R	R	R	HS
22.	Br-22	R	R	R	R	R	R
23.	Br-24	R	S	R	R	R	R
24.	By-34	R	R	R	R	R	R
25.	By-35	R	R	R	R	R	R
26.	Br-23	R	S	R	S	R	R
27.	By-37	R	R	R	R	R	R
28.	Br-21	R	S	R	R	R	I
29.	By-38	R	R	R	R	R	R
30.	Br-20	R	S	R	R	R	R
31.	By-40	S	HS	R	S	S	S
32.	Br-15	R	I	R	R	R	I
33.	Br-1	R	S	R	R	R	R
34.	Br-13	S	HS	R	R	I	S
35.	Br-3	R	S	R	R	R	R
36.	Br-11	S	I	R	R	S	S
37.	Br-4	R	S	R	R	S	I
38.	Br-9	I	I	R	R	R	I
39.	Br-5	S	HS	R	R	S	S
40.	Br-25	I	S	R	R	R	R
41.	Br-26	R	S	R	R	R	R
42.	Br-29	R	S	R	R	R	R
43.	Br-31	S	R	R	S	R	R
44.	Br-33	R	I	R	R	R	R
45.	Br-34	I	I	R	R	R	R
46.	Br-36	R	R	S	R	R	R
47.	Br-38	R	S	R	R	R	R
48.	Br-39	R	R	R	R	R	I
49.	Ф3-1	R	I	R	R	R	R
50.	Ф3-32	R	S	R	R	R	I
51.	Ф3-3	R	S	R	R	R	S
52.	Ф3-31	S	S	I	R	I	I
53.	Ф3-5	R	I	R	R	R	S
54.	Ф3-5	I	I	R	I	R	I
55.	Ф3-7	R	S	R	R	R	S
56.	Ф3-29	I	S	R	R	R	R
57.	Ф3-9	R	I	R	R	R	R
58.	Ф3-28	I	I	R	R	R	I
59.	Ф3-14	R	R	R	R	R	I
60.	Ф3-27	R	I	I	R	I	HS
61.	Ф3-15	R	R	R	R	R	I
62.	Ф3-25	R	R	R	R	R	S
63.	Ф3-17	R	R	R	R	R	I
64.	Ф3-23	R	I	S	S	S	S
65.	Ф3-18	S	S	R	R	I	S
66.	Ф3-22	I	I	R	R	R	I
67.	Ф3-19	R	R	R	R	R	S
68.	Ф3-20	R	I	I	R	R	S
69.	Мд-0	R	S	R	R	R	S
70.	Мд-1	S	S	R	R	S	S
71.	Мд-2	R	I	R	R	S	S
72.	Мд-3	R	R	R	R	I	S
73.	Мд-5	R	R	R	R	R	S
74.	Мд-6	S	I	R	R	I	I
75.	Мд-7	R	S	I	R	S	S
76.	Мд-12	S	R	R	I	R	R

Примечание: R — резистентные; I — умеренно резистентные; S — чувствительные; HS — высокочувствительные

Рис. 2. Частота устойчивости штаммов к антибиотикам (%)
Fig. 2. Frequency of antibiotic resistance of strains (%)



14 штаммов — к 3 антибиотикам, 12 штаммов — к 2 антибиотикам и 3 штамма (By-40, Ф3-31 и Ф3-23) — к 1 антибиотику (рис. 1).

Большинство изучаемых штаммов были резистентны к стрептомицину (97,4%), эритромицину (93,4%), rifampицину (88,2%), а также к налидиксовой кислоте (81,6%). Устойчивость к тетрациклину и карбенициллину показали 56,5% и 57,9% штаммов соответственно. Штаммы *B. elkanii* с индексами By-4, By-34, By-35, By-37, By-38, Br-22 были резистентны ко всем 6 исследуемым антибиотикам (рис. 2, табл. 3).

Все авторы несут ответственность за свою работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в эту научную работу.

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плафият.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Zabaloy M.C., Gomez M.A. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biologi and Fertility of Soils*. 2005;42:83-88. DOI 10.1007/s00374-005-0012-2.
- Yong Fa Zhang et al. Bradirhizodium elkanii, Bradirhizodium yuamingense and Bradirhizodium jponicum are the main rhizobium associated with Vigna unguiculata and Vigna radiate in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol.Lett.* 2008; 285: 146-154. DOI 10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x
- Jordan D.S. Transfer of Rhizobium jponicum, Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen.nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982; 32: 136-139. DOI 10.1099/00207713-32-1-136.
- Scholla M.N., Elkan G.H. Rhizobium fredii ssp.nov., a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J. SystBacteriol.* 1984; 34: 484-486. DOI 10.1099/00207713-34-4-484.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. *Int J SystBacteriol.* 1988; 38: 392-397. DOI 10.1099/00207713-38-4-392
- Kuykendall L.D., Roy M.A., O'Neill J.J. Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of Bradyrhizobium japonicum. *International Jornal of systematic Bacteriology*. 1988; 38(4): 358-361. DOI 10.1099/00207713-38-4-358.
- Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38(6): 501-505. DOI 10.1139/m92-082.
- Бегун С.А., Тильба В.А., Якименко М.В. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах. Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе: сб. науч. тр. Владивосток: 2011; С. 95-102.
- Kennedy A.S. Carbon utilization and fatty acid profiles for characterization of bacteria. In: Weaver R.W. Angle S., Bottomly P. (eds): *Methods of Soil Analysis. Biochemical Properties. Soil Sciences Society of America*. Madison: 1994; p.554-556.
- Swelim D.M., Hashem F.M., Kuykendall L.D., Hegazi N.I., Wahab S.M. Host specificity and phenotypic diversity of Rhizobium strains nodulating Leucaena, Acacia, and Sebania in Egypt. *Biology and Fertility of Soils*. 1997; 25: 224-232. DOI 10.1007/s003740050307.
- Antoun H., Bordeleau L.M., Prevost D. Strain identification in rhizobium meliloti using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant and soil*, 1982; 66: 45-50. DOI 10.1007/BF02203401.
- Mueller J., Skipper H., Shipe E., Grimes L., Wagner S. Intrinsic antibiotic resistance in Bradyrhizobium japonicum. *Soil BiolBiochem.* 1988; 20: 879-882. DOI 10.1016/0038-0717(88)90097-1.

Таблица 3. Характеристика чувствительности/резистентности штаммов к антибиотическим веществам

Table 3. Characteristics of sensitivity/resistance of strains to antibiotic substances

Исследованные на АБП	Удельный вес резистентных и чувствительных штаммов <i>B. elkanii</i> (% \pm m)	
	резистентные	чувствительные
Налидиксовая кислота	81,6 \pm 0,04	17,1 \pm 0,04
Карбенициллин	57,9 \pm 0,05	40,8 \pm 0,04
Стрептомицин	97,4 \pm 0,03	2,6 \pm 0,05
Эритромицин	93,4 \pm 0,03	6,6 \pm 0,04
Рифампицин	88,2 \pm 0,04	11,9 \pm 0,04
Тетрациклин	56,5 \pm 0,05	42,1 \pm 0,04

Примечание: m — статистическая ошибка средней

Выводы / Conclusion

Анализ результатов показал, что большинство исследуемых штаммов *B. elkanii* имеют множественную лекарственную устойчивость к нескольким антибиотикам (в основном к rifampицину, стрептомицину, эритромицину и налидиксовой кислоте) и могут быть отнесены к виду *Bradyrhizobium elkanii*.

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors have made an equal contribution to this scientific work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Zabaloy M.C., Gomez M.A. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biologi and Fertility of Soils*. 2005;42:83-88. DOI 10.1007/s00374-005-0012-2.
- Yong Fa Zhang et al. Bradirhizodium elkanii, Bradirhizodium yuamingense and Bradirhizodium jponicum are the main rhizobium associated with Vigna unguiculata and Vigna radiate in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol.Lett.* 2008; 285: 146-154. DOI 10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x
- Jordan D.S. Transfer of Rhizobium jponicum, Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen.nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982; 32: 136-139. DOI 10.1099/00207713-32-1-136.
- Scholla M.N., Elkan G.H. Rhizobium fredii ssp.nov., a fast growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J. SystBacteriol.* 1984; 34: 484-486. DOI 10.1099/00207713-34-4-484.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. *Int J SystBacteriol.* 1988; 38: 392-397. DOI 10.1099/00207713-38-4-392.
- Kuykendall L.D., Roy M.A., O'Neill J.J. Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of Bradyrhizobium japonicum. *International Jornal of systematic Bacteriology*. 1988; 38(4): 358-361. DOI 10.1099/00207713-38-4-358.
- Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38(6): 501-505. DOI 10.1139/m92-082.
- Бегун С.А., Тильба В.А., Якименко М.В. Природные популяции ризобий сои и их использование в соевых агроценозах. Инновационная деятельность аграрной науки в Дальневосточном регионе: сб. науч. тр. Владивосток: 2011; С. 95-102.
- Kennedy A.S. Carbon utilization and fatty acid profiles for characterization of bacteria. In: Weaver R.W. Angle S., Bottomly P. (eds): *Methods of Soil Analysis. Biochemical Properties. Soil Sciences Society of America*. Madison: 1994; p.554-556.
- Swelim D.M., Hashem F.M., Kuykendall L.D., Hegazi N.I., Wahab S.M. Host specificity and phenotypic diversity of Rhizobium strains nodulating Leucaena, Acacia, and Sebania in Egypt. *Biology and Fertility of Soils*. 1997; 25: 224-232. DOI 10.1007/s003740050307.
- Antoun H., Bordeleau L.M., Prevost D. Strain identification in rhizobium meliloti using the antibiotic disk susceptibility test. *Plant and soil*, 1982; 66: 45-50. DOI 10.1007/BF02203401.
- Mueller J., Skipper H., Shipe E., Grimes L., Wagner S. Intrinsic antibiotic resistance in Bradyrhizobium japonicum. *Soil BiolBiochem.* 1988; 20: 879-882. DOI 10.1016/0038-0717(88)90097-1.

13. Date R., Hurse L. Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of population of indigenous *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Desmodium intortum* and *Macroptilium atropurpureum* three soils of S.E. Queensland. *Soil Biology and Biochemistry*. 1991; 23: 551-561. DOI 10.1016/0038-0717(91)90112-W.
14. Ladha J.K., So R.B. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994; 44: 62-63. DOI 10.1099/00207713-44-1-62.
15. Abaidoo R.S., Keyser H.H., Singleton P.W., Borthakur D. Comparison of molecular and antibiotic resistance profile methods for the population analysis of *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates that nodulate the new TGx soybean cultivars in Africa. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 92: 109-117. DOI 10.1046/j1365-2672.2002.01518x.
16. Mahaveer P. Sharma, Khushboo Srivastava, Sushil K. Sharma. Biochemical characterization and metabolic diversity of soybean rhizobia isolated from Malwa region of Central India. *Plant Soil Environ.* 2010; 56(8): 375-383.
17. Berrada H., Nouiou I., IraquiHoussaini M., El. Ghachoui N. et al. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6(25): 5314-5324.
18. Subha Dhull, Rajesh Gera, Hardeep Singh S., Ridham Kakar. Phosphate Solubilization Activity of Rhizobial Strains Isolated From Root Nodule of Cluster Bean Plant Native to Indian Soils. *Int.J.Curr. Microbiol. App. Sci.* 2018; 7(4): 255-266. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.704.029.
19. Grönemeyer J.L., Hurek T., Bünger W., Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66: 62-69.
20. Zinga M.K., Jaiswal S.K., Dakora F.D. Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. *FEMS Microbiol.. Ecol.* 2017; 93: 1-16. DOI 10.1093/femsec/fiw236.
21. Ndungu S. M. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018; 261: 161-171.
22. Jaiswal S.K., Dakora F.D. Widespread distribution of highly adapted *Bradyrhizobium* species nodulating diverse legumes in Africa. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1-16. DOI 10.3389/fmicb.2019.00310.
23. Fadimata Y.I. Ibny, Sanjay K. Jaiswal, Mustapha Mohammed, Felix D. Dakora. Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny. *Scientific Reports*. 2019; 9:1-17. DOI 10.1038/s41598-019-48944-1.
24. Puozaa D.K., Jaiswal S. K., Dakora F.D. Phylogeny and distribution of *Bradyrhizobium* symbionts nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their association with the physicochemical properties of acidic African soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 2019; 42: 403-414.
25. Yougang G.H.S., Ngo Nkot L., Asseng C.C., Nyaka Ngolisa A.I.C., Ngakou A., Nwaga D. Isolation and characterization of Legume Nodulating Bacteria isolated from Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules. *Global Scientific Journal*. 2020; 8(5): 1777-1792.
26. Ngo Nkot Laurette, Mba Edou Simon Jérémie, Yougang Gougueu Harris Stephane, Nyaka Ngobissa, Aurelie Irene Laure, Nwaga Dieudonné. In Vitro Assessment of IAA Production and Antibiotics Tolerance of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Nodulating. *Bacteria International Journal of Innovative Science and Research Technology*. 2021; 6: 1181-1187.
27. Козлов Р.С., Сидоренко С.В., Кафтырина Л.А., Васильев Н.В., Тарковский И.С. и др. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. 2015. Москва. Режим доступа: <https://flm.kz/files/14062184925c1281c1dfd6b.pdf> [Дата обращения 21.03. 2020]
28. Kuykendall L. Transfer of R- factor to and between genetically marked sublines of *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ Microbiol.* 1979; 37: 862-866.

ОБ АВТОРАХ:

Арина Игоревна Сорокина,

кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических исследований Федеральный Научный Центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», 19, ул. Игнатьевское шоссе, Благовещенск, Амурская область 675000, Российская Федерация
E-mail: aziradot@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4611-767x>

Мария Владимировна Якименко,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лаборатории биологических исследований, Федеральный Научный Центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», 19, ул. Игнатьевское шоссе, Благовещенск, Амурская область, 675000, Российская Федерация
E-mail: mariy-y@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1141-1900>

Степан Алексеевич Бегун,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических исследований Федеральный Научный Центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», 19, ул. Игнатьевское шоссе, Благовещенск, Амурская область, 675000, Российская Федерация
E-mail: sai@vniisoi.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7989-9068>

13. Date R., Hurse L. Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of population of indigenous *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Desmodium intortum* and *Macroptilium atropurpureum* three soils of S.E. Queensland. *Soil Biology and Biochemistry*. 1991; 23: 551-561. DOI 10.1016/0038-0717(91)90112-W.
14. Ladha J.K., So R.B. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994; 44: 62-63. DOI 10.1099/00207713-44-1-62.
15. Abaidoo R.S., Keyser H.H., Singleton P.W., Borthakur D. Comparison of molecular and antibiotic resistance profile methods for the population analysis of *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates that nodulate the new TGx soybean cultivars in Africa. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 92: 109-117. DOI 10.1046/j1365-2672.2002.01518x.
16. Mahaveer P. Sharma, Khushboo Srivastava, Sushil K. Sharma. Biochemical characterization and metabolic diversity of soybean rhizobia isolated from Malwa region of Central India. *Plant Soil Environ.* 2010; 56(8): 375-383.
17. Berrada H., Nouiou I., IraquiHoussaini M., El. Ghachoui N. et al. Phenotypic and genotypic characterizations of rhizobia isolated from root nodules of multiple legume species native of Fez, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6(25): 5314-5324.
18. Subha Dhull, Rajesh Gera, Hardeep Singh S., Ridham Kakar. Phosphate Solubilization Activity of Rhizobial Strains Isolated From Root Nodule of Cluster Bean Plant Native to Indian Soils. *Int.J.Curr. Microbiol. App. Sci.* 2018; 7(4): 255-266. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.704.029.
19. Grönemeyer J.L., Hurek T., Bünger W., Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66: 62-69.
20. Zinga M.K., Jaiswal S.K., Dakora F.D. Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. *FEMS Microbiol.. Ecol.* 2017; 93: 1-16. DOI 10.1093/femsec/fiw236.
21. Ndungu S. M. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018; 261: 161-171.
22. Jaiswal S.K., Dakora F.D. Widespread distribution of highly adapted *Bradyrhizobium* species nodulating diverse legumes in Africa. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1-16. DOI 10.3389/fmicb.2019.00310.
23. Fadimata Y.I. Ibny, Sanjay K. Jaiswal, Mustapha Mohammed, Felix D. Dakora. Symbiotic effectiveness and ecologically adaptive traits of native rhizobial symbionts of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) in Africa and their relationship with phylogeny. *Scientific Reports*. 2019; 9:1-17. DOI 10.1038/s41598-019-48944-1.
24. Puozaa D.K., Jaiswal S. K., Dakora F.D. Phylogeny and distribution of *Bradyrhizobium* symbionts nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and their association with the physicochemical properties of acidic African soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 2019; 42: 403-414.
25. Yougang G.H.S., Ngo Nkot L., Asseng C.C., Nyaka Ngolisa A.I.C., Ngakou A., Nwaga D. Isolation and characterization of Legume Nodulating Bacteria isolated from Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules. *Global Scientific Journal*. 2020; 8(5): 1777-1792.
26. Ngo Nkot Laurette, Mba Edou Simon Jérémie, Yougang Gougueu Harris Stephane, Nyaka Ngobissa, Aurelie Irene Laure, Nwaga Dieudonné. In Vitro Assessment of IAA Production and Antibiotics Tolerance of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Nodulating. *Bacteria International Journal of Innovative Science and Research Technology*. 2021; 6: 1181-1187.
27. Козлов Р.С., Сидоренко С.В., Кафтырина Л.А., Васильев Н.В., Тарковский И.С. и др. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. 2015. Москва. Режим доступа: <https://flm.kz/files/14062184925c1281c1dfd6b.pdf> [Дата обращения 21.03. 2020]
28. Kuykendall L. Transfer of R- factor to and between genetically marked sublines of *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ Microbiol.* 1979; 37: 862-866.

ABOUT THE AUTHORS:

Arina Igorevna Sorokina,

Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Biological Research, Federal Scientific Center "All-Russian Research Institute of Soybean", 19 str. Ignatievskoe highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000, Russian Federation
E-mail: aziradot@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4611-767x>

Maria Vladimirovna Yakimenko,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Biological Research, Federal Scientific Center "All-Russian Research Institute of Soybean", 19 str. Ignatievskoe highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000, Russian Federation
E-mail: mariy-y@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1141-1900>

Stepan Alekseevich Begun,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Biological Research, Federal Scientific Center "All-Russian Research Institute of Soybean", 19 str. Ignatievskoe highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000, Russian Federation
E-mail: sai@vniisoi.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7989-9068>