

**РЕГУЛЮВАННЯ РОСТОВОЇ АКТИВНОСТІ
ПОПУЛЯЦІЙ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM В УМОВАХ *IN VITRO***

Козар С.Ф., Усманова Т.О.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: isgm@ukrpost.ua

*Наведено результати досліджень щодо оптимізації процесу культивування бульбочкових бактерій сої шляхом підбору оптимальних середовищ, а також з визначення ростової активності популяцій *Bradyrhizobium japonicum* за дії продуктів метаболізму симбіотичних і асоціативних діазотрофів в умовах *in vitro*. Найвища ростова активність цих мікроорганізмів виявлена при їх культивуванні в середовищі з додаванням стерилізованої бактеріальної суспензії з екзо- і ендо-метаболітами *Azospirillum brasilense*.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, діазотрофи, ростова активність.

Симбіотичні діазотрофи *Bradyrhizobium japonicum* належать до мікроорганізмів, які використовують при виробництві мікробних препаратів для інокуляції сої. Передпосівна обробка насіння біопрепаратами, діючою основою яких є ці бактерії, сприяє надходженню у рослини біологічного азоту, що приводить до покращення живлення сої, а також підвищення врожайності та поліпшення якості зерна цієї зернобобової культури [1, 2].

Для виробництва препаратів використовують специфічні конкурентоздатні штами бульбочкових бактерій, які мають високу нітрогеназну активність. При цьому часто не враховується така властивість мікроорганізмів як їхня ростова активність, яка може значно вплинути на ефективність та технологічність виробництва бактеріальних препаратів [3]. Досягнення високої ростової активності діазотрофів обумовлено необхідністю отримання препарату з високим вмістом життєздатних клітин. За літературними даними відомо [2, 3], що для утворення на корінні рослин сої достатньої кількості бульбочок необхідно перед посівом нанести препарат з розрахунку до 500 тис. клітин бульбочкових бактерій на одну

насінину. Низька ж ростова активність мікроорганізмів призводить до того, що виготовлений препарат має низький титр, який не може забезпечити утворення бульбочок на корені, у зв'язку з тим, що під дією несприятливих факторів навколишнього середовища частина клітин гине на насінні, в ґрунті і кореневій зоні.

Крім того, інокулянт з високим вмістом життєздатних клітин може бути застосований у меншій кількості, а це, у свою чергу, забезпечує значну економію ресурсів при пакуванні, зберіганні, перевезенні і застосуванні. Високий титр також сприяє подовженню терміну зберігання препарату.

У зв'язку з вищезазначеним актуальними є дослідження, спрямовані на оптимізацію процесу культивування і регулювання ростової активності популяцій *Bradyrhizobium japonicum* в умовах *in vitro*.

Метою наших досліджень було оптимізувати умови культивування активних штамів *Bradyrhizobium japonicum* за рахунок підбору поживних середовищ для вирощування цих мікроорганізмів, а також вивчити можливість використання метаболітів симбіотичних і асоціативних діазотрофів для підвищення їхньої ростової активності в умовах *in vitro*.

Матеріали й методи. У роботі використовували активні штами симбіотичних азотофіксувальних бактерій *Bradyrhizobium japonicum* В-76 (М-8), *Bradyrhizobium japonicum* В-124 (КН-10), *Bradyrhizobium japonicum* В-167 (6346). Використовували стерилізовану суспензію ризобактерій, які сприяють росту рослин (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) з екзо- і ендо-метаболітами:

симбіотичних діазотрофів *Rhizobium leguminosarum* В-169 (2486), *Rhizobium leguminosarum* В-170 (250a), *Rhizobium leguminosarum* В-42 (31);

асоціативних азотофіксувальних бактерій *Agrobacterium radiobacter* В-61 (204), *Azospirillum brasilense* В-30 (18-2), *Azospirillum brasilense* В-65 (410), *Azospirillum brasilense* Sp.7 (ATCC 12157), *Azotobacter chroococcum* В-72 (М-70), *Azotobacter vinelandii* В-73 (М-Х), *Enterobacter aerogenes* В-67 (30-ф), *Pseudomonas fluorescens* В-149^г (В-17).

Усі мікроорганізми отримано з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН [4].

Бактерії *Bradyrhizobium japonicum* вирощували у рідких напівсинтетичних поживних середовищах, до складу яких входили: відвар насіння гороху або люпину, кукурудзяний екстракт, дріжджі пекарські і кормові, меляса, глюкоза, маніт, цукор, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (табл. 1). Додавали також стерилізовану бактеріальну суспензію вищезазначених діазотрофів з розрахунку 0,1 %, 1,0 %, 3,0 %, 5,0 %, 10,0 %, 20,0 %, 50,0 % від об'єму середовища. Культивування мікроорганізмів здійснювали глибинно у періодичній культурі у 3-літрових скляних бутелях на підвісних мікробіологічних качалках при частоті коливань робочої платформи 220 об./хв за температури $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Стерилізовану бактеріальну суспензію отримували шляхом нагрівання до температури 98°C протягом 10 хвилин.

Чисельність життєздатних клітин *Bradyrhizobium japonicum* визначали чашковим методом [5] шляхом підрахунку на 10-12-й дні колоній на агаризованому гороховому поживному середовищі.

Таблиця 1. Склад напівсинтетичних середовищ для культивування *Bradyrhizobium japonicum*

№ середовища	Відвар насіння гороху	Відвар насіння люпину	Кукурудзяний екстракт	Дріжджі пекарські	Дріжджі кормові	Меляса	Глюкоза	Маніт	Цукор	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	CaCO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$
1	X*	-	-	-	-	-	X	-	X	X	X	X	X	X	-
2	-	-	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X	-
3	-	-	-	-	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	-
4	-	-	X	X	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	-
5	-	-	X	X	-	X	-	-	-	X	X	X	X	X	-
6	-	X	-	-	-	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X

Примітка. * – компонент входить до складу поживного середовища.

Результати та їх обговорення. Ростова активність мікроорганізмів в умовах *in vitro* характеризується показником щільності популяції, який нами досліджено для симбіотичних діазотрофів *Bradyrhizobium japonicum* у різних напівсинтетичних

середовищах. З рис. 1 видно, що найвищу щільність популяції отримано у середовищах з відварами насіння гороху і люпину (між якими не спостерігали істотної різниці щодо цього показника), а найнижчу – на середовищі на основі кукурудзяного екстракту з дріжджами пекарськими (менша у середньому на 80 %). Цю закономірність можна прослідкувати як за даними, отриманими по кожному досліджуваному штаму бактерій, так і по середніх показниках.

За ростою активністю штами *Br. japonicum* М-8 і *Br. japonicum* 6346 переважали штам *Br. japonicum* КН-10, на що вказує більша щільність популяції – у середньому на 22 і 25 %, відповідно.

Виявити закономірності росту популяції *Br. japonicum* у періодичній культурі в умовах *in vitro* можна, прослідкувавши залежність логарифму числа живих клітин від часу. Нами вивчено цю залежність у середовищах з високою і низькою кінцевою щільністю популяції бактерій – це, відповідно, поживне середовище на основі кукурудзяного екстракту з дріжджами пекарськими і на основі відвару насіння гороху.

Порівнюючи криві росту *Br. japonicum* М-8 у рідких напівсинтетичних поживних середовищах, контрастних за ростом у них популяції цих мікроорганізмів, виявлено, що за логарифмічною шкалою число клітин у перші 24 години швидше збільшується у середовищі на основі відвару насіння гороху (рис. 2). За цією ж шкалою у період з 24 по 72 годину криві, які характеризують ріст у обох середовищах, мали близький кут нахилу, хоча число клітин збільшувалось інтенсивніше у середовищі з відваром. Представлені дані свідчать про те, що у цьому середовищі раніше настає період, коли кількість клітин бульбочкових бактерій вже не збільшується, тобто закінчується фаза експоненціального росту і починається стаціонарна фаза.

У табл. 2 представлено показники швидкості росту бактерій у різні часові проміжки. Константа швидкості поділу клітин *Br. japonicum* у перші 24 години при вирощуванні у середовищі з відваром гороху майже у три рази була більшою, ніж у середовищі на основі кукурудзяного екстракту та дріжджів пекарських. У наступні 24 години цей показник дещо вирівнюється у двох варіантах. У фазу експоненціального росту він стає однаковим ($v=0,195 \text{ год}^{-1}$). У наступний період відбувається зменшення константи поділу, навіть

до негативних показників у варіанті з відваром, що свідчить про настання стаціонарної фази з переходом у фазу деградації, коли клітини починають гинути.

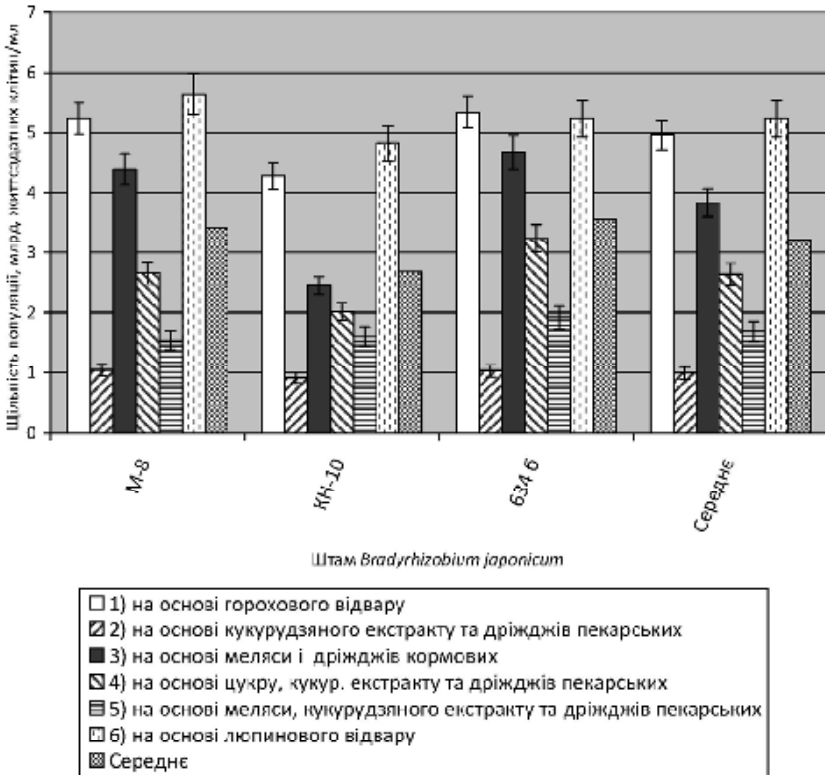


Рис. 1. Щільність популяції *Br. japonicum* при глибинному вирощуванні у рідких напівсинтетичних середовищах в умовах *in vitro*

Дану закономірність росту бульбочкових бактерій підтверджують показники тривалості генерації. Отримані дані свідчать про те, що тільки після трьох діб культивування цей показник росту *Br. japonicum* у середовищі з кукурудзяним екстрактом і дріжджами пекарськими був більшим у порівнянні з варіантом з середовищем на основі відвару гороху. У обох середовищах тривалість генерації була найменшою у часовий проміжок з 48 по 72 годину: g дорівнювало 5,1 години, що на 58-86 % менше, ніж за першу добу і

на 48-60 %, ніж за другу.

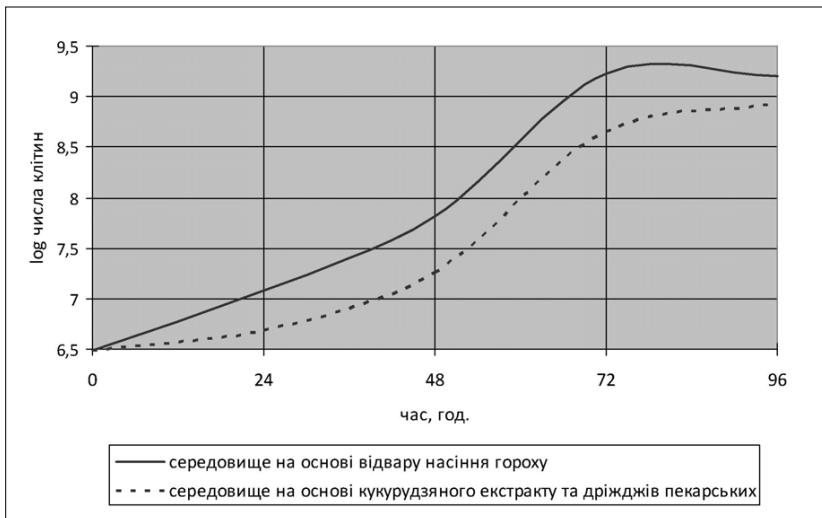


Рис 2. Динаміка росту *Br. japonicum* M-8 у рідких напівсинтетичних поживних середовищах

Таблиця 2. Швидкість поділу клітин і тривалість генерації *Bradyrhizobium japonicum* M-8 у рідких напівсинтетичних поживних середовищах

Варіант	Константа швидкості поділу ν , год ⁻¹ за період (год.)				Тривалість генерації g , год. за період (год.)			
	0-24	24-48	48-72	72-96	0-24	24-48	48-72	72-96
Середовище на основі горохового відвару	0,081	0,102	0,195	-0,003	12,3	9,8	5,1	-340,9
Середовище на основі кукурудзяного екстракту та дріжджів пекарських	0,028	0,078	0,195	0,038	36,3	12,8	5,1	26,6

Отримані результати досліджень свідчать про те, що вища щільність популяції *Br. japonicum* у «технологічнішому» середовищі на основі відвару насіння гороху, досягається за рахунок

інтенсивнішого росту бактерій у лаг-фазі, на що вказують криві росту цих мікроорганізмів, більша константа швидкості росту (до трьох разів) та менша тривалість генерації.

За даними інших авторів відомо [6], що регулювання росту мікроорганізмів можливе за рахунок внесення добавки на основі стерильних сполук бактеріального походження. Також відомий спосіб використання для підвищення росту анаеробних і аеробних бактерій добавки попередньо оброблених іонізуючим випромінюванням ліофілізованих бактерій [7], які нездатні до розмноження, але препарати зберігають багато продуктів їхнього метаболізму: ферментів і біологічно активних сполук. Дослідження щодо впливу продуктів життєдіяльності бактерій на ріст діазотрофів фактично відсутні. У зв'язку з вищезазначеним нами вивчався вплив на ріст *Br. japonicum* М-8 метаболітів, які містяться в стерилізованій суспензії інших ризобактерій. Виявлено, що невисокі концентрації такої суспензії не мали істотного впливу на щільність популяції, тоді як додавання її з розрахунку більше 10 % загального об'єму середовища сприяло істотному зниженню цього показника (рис. 3). Найвищий стимулювальний ефект виявлено при додаванні стерильної суспензії *Azospirillum brasilense* з розрахунку 5 % від об'єму середовища – щільність популяції збільшувалась від 1,2 до 2,2 раза у порівнянні з контролем.

Аналогічні результати отримано при дослідженні штаму *Br. japonicum* КН-10 (рис. 4) і *Br. japonicum* 634б (рис. 5): щільність популяції збільшилась до 1,8 раза у варіантах з *Br. japonicum* КН-10 та до 1,5 раза у варіантах з штамом *Br. japonicum* 634б.

Таким чином, можна зробити висновок, що підбір середовища є важливою складовою регулювання ростової активності популяції *Br. japonicum* в умовах *in vitro*. Найкращі показники, які характеризують ріст цих мікроорганізмів, отримано у варіантах з середовищами на основі відварів гороху і люпину; при цьому щільність популяції бульбочкових бактерій була вищою на 22-81 % у порівнянні з іншими поживними середовищами. У середовищі з відваром гороху вища щільність популяції бульбочкових бактерій досягається за рахунок більш швидкої адаптації мікроорганізмів, що підтверджує вища константа швидкості росту і менша тривалість генерації у лаг-фазу.

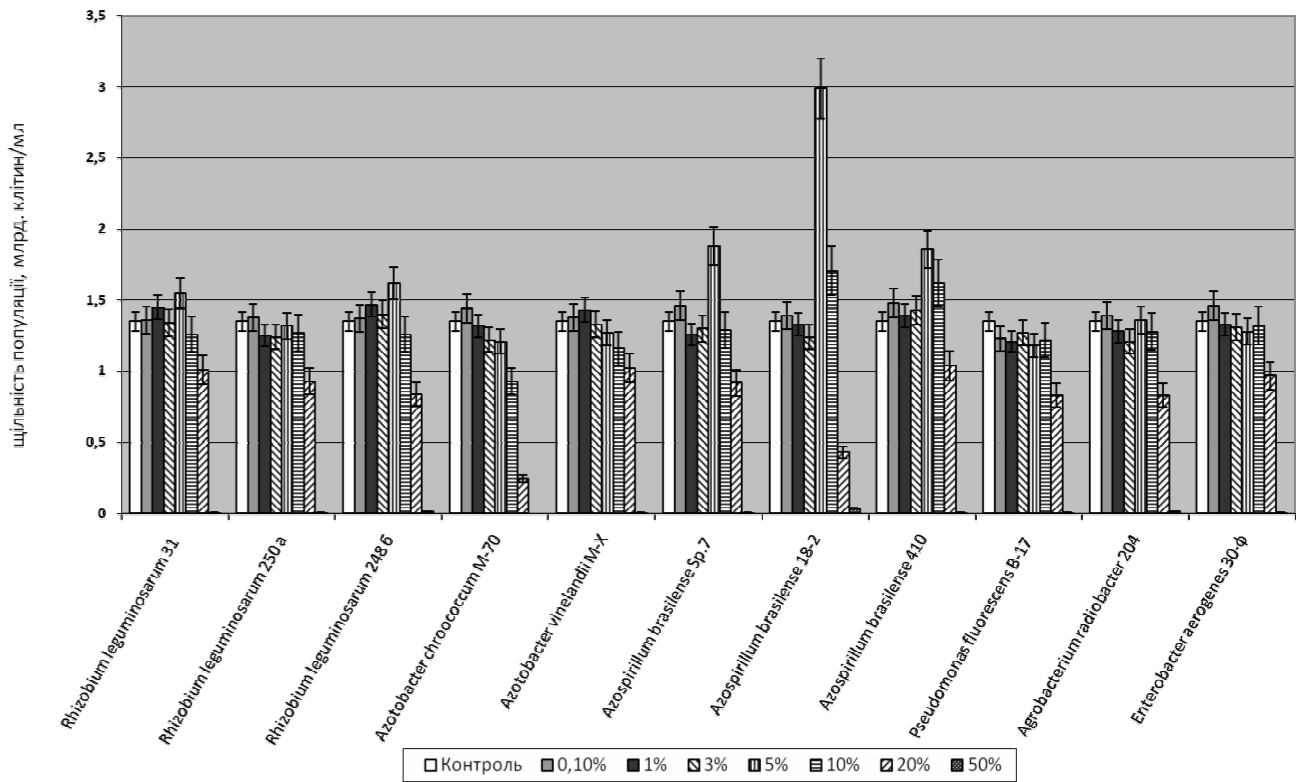


Рис. 3. Вплив продуктів метаболізму діазотрофів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* M-8.

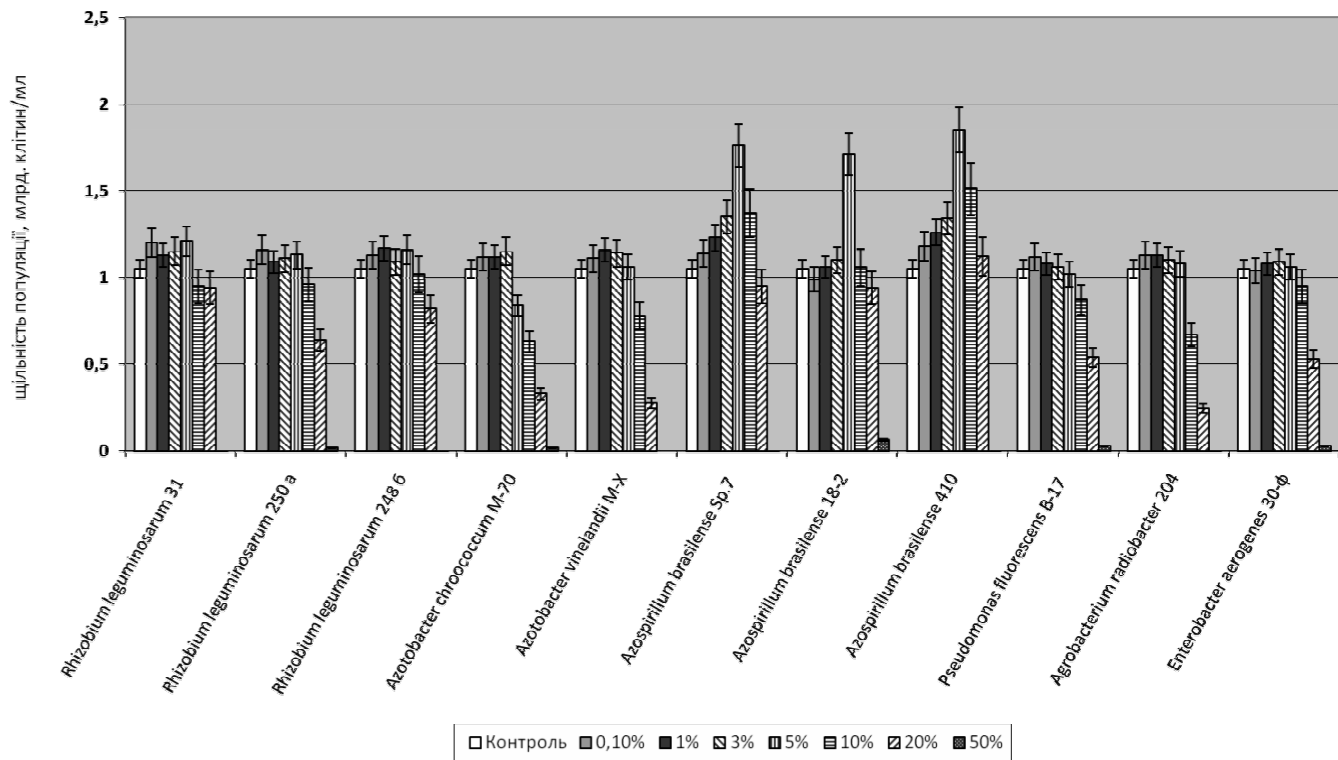


Рис. 4. Вплив продуктів метаболізму діазотрофів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* KH-10.

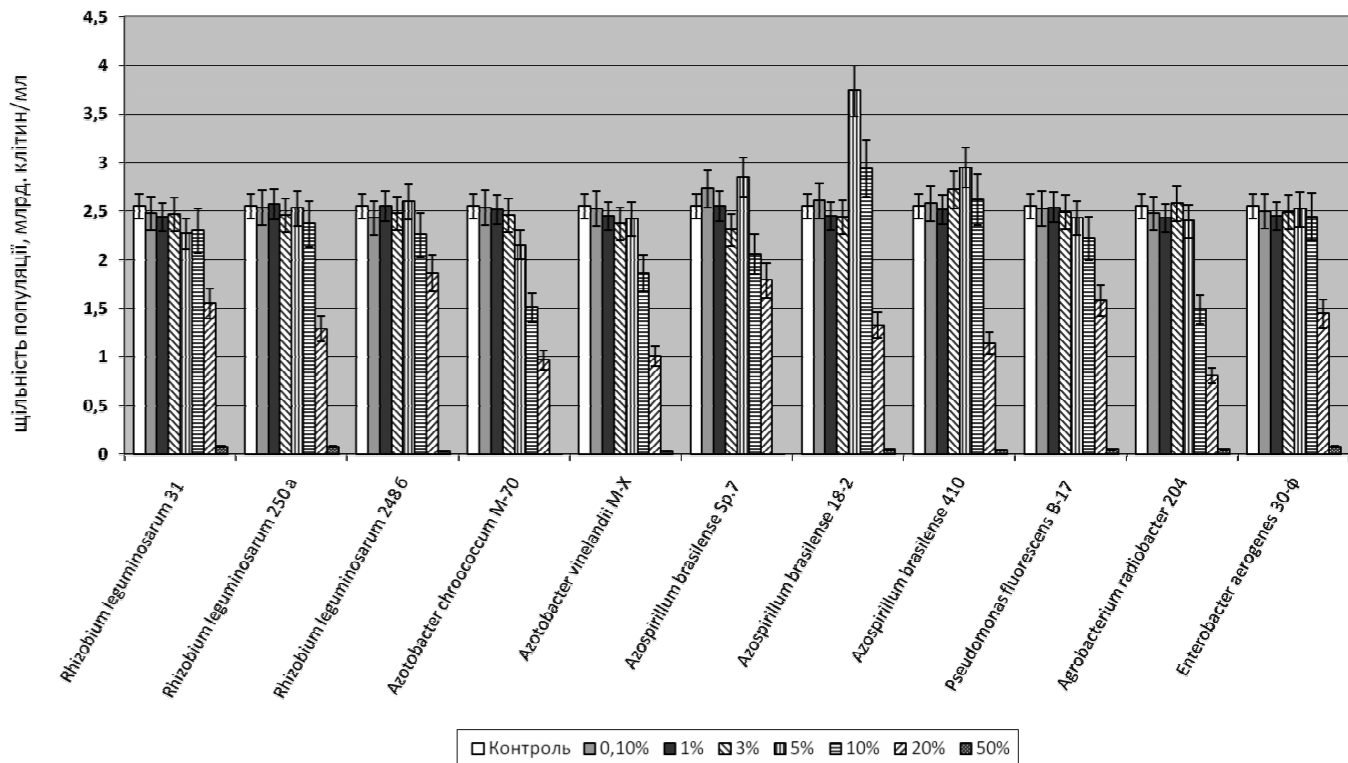


Рис. 5. Вплив продуктів метаболізму діазотрофів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* 634 б.

Виявлено, що перспективним для підвищення ростової активності *Br. japonicum* є додавання в поживне середовище для їх культивування стерилізованої бактеріальної суспензії з екзо- і ендо-метаболітами *Azospirillum brasilense* з розрахунку 5 % від об'єму середовища, що сприяє збільшенню щільності популяції бульбочкових бактерій до 2,2 раза.

1. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / [В. В. Волкогон, О. В. Надкернична, Т. М. Ковалевська та ін.]. — Київ. : Аграрна наука, 2006. — 321 с.

2. Біологічний азот / [В. П. Патики, С. Я. Коць, В. В. Волкогон та ін.]. — Київ. : Світ, 2003. — 424 с.

3. Хотянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе / Хотянович А. В. — Л. : ВНИИСХМ, 1991. — 60 с. — (Методические рекомендации).

4. Каталог культур мікроорганізмів / [за ред. В. В. Волкогона, О. В. Надкерничної, Т. М. Ковалевської] – Чернігів: ЦНТЕІ, 2007. — 46 с.

5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / [под ред. Д. Г. Звягинцева] — М. : Изд-во МГУ. — 1991. — 304 с.

6. United States Patent 5401639. Stabilized bilirubin calibrator solution and method therefore / Filing date: Aug 25, 1992; Issue date: Mar 28, 1995; Inventors: Louis Saldivar, Jr., Barbara J. England; Assignee: Abbott Laboratories; Primary Examiner: Ralph Gitomer.

7. United States Patent 6010896. Lyophilized ionizing radiation sterilized microorganisms as an additive for nutrient media for growing bacteria / Filing date: Jun 24, 1991; Issue date: Jan 4, 2000; Inventors: Eli Eshet Eisenberg, George L. Evans; Assignee: Becton, Dickinson and Company; Primary Examiner: Deborah Ware.

**РЕГУЛЯЦИЯ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ
ПОПУЛЯЦИЙ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM В УСЛОВИЯХ
*IN VITRO***

Козар С.Ф., Усманова Т.О.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, Чернигов

*Приведены результаты исследований относительно оптимизации процесса культивирования клубеньковых бактерий сои путем подбора оптимальных сред, определена ростовая активность популяций *Bradyrhizobium japonicum* под влиянием продуктов метаболизма симбиотических и ассоциативных diaзотрофов в условиях *in vitro*. Наивысшая ростовая активность этих микроорганизмов обнаружена при их культивировании в среде с добавлением стерилизованной бактериальной суспензии с экзо- и эндо-метаболитами *Azospirillum brasilense*.*

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, diaзотрофы, ростовая активность.

**REGULATION OF GROWTH ACTIVITY OF
POPULATION OF INDUSTRIAL *BRADYRHIZOBIUM
JAPONICUM* STRAINS *IN VITRO***

Kozar S.F., Usmanova T.O.

Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

*The results of researches on optimization of soya rhizobium cultivation process through choosing optimum environments are shown in the article. It also represents growth activity of *Bradyrhizobium japonicum* population influenced by products of symbiotic and associative diazotroph metabolism *in vitro*. The highest growth activity of these microorganisms is shown when their cultivation in the medium with sterile bacterial suspensions with exo- and endo- metabolites of *Azospirillum brasilense*.*

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, diaзotroph, growth activity.