

## ПОРІВНЯННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ R- ТА S-ФОРМ ШТАМУ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 18/2

**Горбань В.П.**

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

*У виробничого штаму Azospirillum brasilense 18/2, який тривалий період зберігається методом періодичних пересівів на агаризованому середовищі, виявлено здатність до дисоціації на R- та S- форми. Встановлено, що ефективну асоціативну систему з рослинами гречки може формувати лише вихідний штам A. brasilense 18/2.*

Ключові слова: дисоціація, азоспірили, потенційна азот-фіксувальна активність, гречка.

Дисоціація бактерій – це розщеплення однорідної популяції на варіанти, які розрізняються генетичними, фізіолого-біохімічними і морфологічними ознаками. Відомо, що дисоціація постійно відбувається у природних популяціях, реалізується в межах норми реакції генотипу і для мікроорганізмів має важливе пристосувальне значення до умов довкілля [1]. Однак, у мікробіологічній практиці дисоціація може призводити до небажаних змін властивостей мікроорганізмів.

Особливу увагу цьому явищу приділяють медичні та ветеринарні мікробіологи, оскільки зі зміною морфології колоній може змінюватися вірулентність та антигенні властивості патогенних мікроорганізмів [2]. Актуальним є це питання і для біотехнологів. Адже в процесі субкультивування виробничі штами мікроорганізмів (комерційно важливі продуценти білка, амінокислот, вітамінів, ферментів і т. ін.) можуть дисоціювати, втрачаючи при цьому біосинтетичну активність [3].

Явище дисоціації має важливе практичне значення у ґрунтової мікробіології, оскільки штами бактерій, які використовуються для виготовлення біопрепаратів, повинні бути генетично однорідними та стійкими за виробничо-цінними ознаками. Так, наприклад, у представників виду *Bacillus thuringiensis* в процесі дисоціації з високою частотою виникають клітини, що повністю або

частково втрачають здатність до спороутворення, внаслідок чого вони формують сірі прозорі колонії (R-форми). У таких дисоціантів змінюється і низка інших ознак, зокрема, кристалоутворення, метаболічна активність і, відповідно, їх ентомоцидна дія [4]. У випадку, якщо штам є біоагентом бактеріального препарату, його дія буде не ефективною.

Виявлена здатність до дисоціації і у бульбочкових бактерій люцерни, конюшини, вики, еспарцету [5]. Показано, що бульбочкові бактерії слизистих, пастоподібних і шорсткуватих колоній відрізнялися за низкою біохімічних властивостей, стійкістю до антибіотиків, деяких протруєвачів, ультрафіолетового опромінення. Однак, не знайдено чіткої відповіді на питання щодо зв'язку між формою колоній та ефективністю дисоціантів.

У колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів при Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН з метою гарантованого зберігання культур постійно контролюється життєздатність, чистота і функціональна активність всіх штамів мікроорганізмів за різних методів зберігання. У процесі перевірки чистоти музейних культур виявлено розщеплення популяції штаму *Azospirillum brasilense* 18/2, який тривалий час зберігається методом періодичних пересівів, на варіанти за морфологією колоній.

Метою нашої роботи було встановити, чи існує корелятивна залежність між морфологічними змінами у дисоціантів та їх агрономічно цінними властивостями.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень був штам *A. brasilense* 18/2, виділений із ризосферного ґрунту рослин гречки сорту Ідель у 1985 році В.І. Лоховою та О.В. Надкерничою.

Перевірку чистоти штаму проводили на живильному середовищі такого ж складу, що використовується для його підтримання: картопляний відвар (200 г картоплі на 1 л водопровідної води) – 1,0 л, яблучна кислота – 2,5 г, цукроза – 2,5 г, КОН – 2,0 г, агар-гар – 1,5 %, рН до стерилізації – 6,8.

Чутливість азоспірил до антибіотиків вивчали згідно методики, описаної у роботі О.А. Полтавської [6]. Визначення нітрогеназної активності штаму *A. brasilense* 18/2 та його S- і R-варіантів в чистій культурі проводили на середовищі Доберейнер ацетиленовим методом. Потенційну активність азотфіксації на коренях рослин гречки та в ґрунті ризосфери визначали згідно з загальноприйнятою методикою [7].

Польовий дослід проводили в ґрунтово-кліматичних умовах Полісся (дослідна ділянка Інституту сільськогосподарської мікробіології). Ґрунт дерново-підзолистий, супіщаний ( $\text{pH}_{\text{сол.}}$  –5,6, вміст гумусу в орному шарі (за Тюрнімом) – 1,0-1,2 %, загального азоту – 0,08-0,12 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 16,0-18,0 мг  $\text{P}_2\text{O}_5$ , обмінного калію (за Кірсановим) – 10,0-4,0 мг  $\text{K}_2\text{O}$  на 100 г ґрунту. Повторність дослідів чотирьохкратна. Облікова площа ділянки 5 м<sup>2</sup>. Посів широкорядний з шириною міжрядь 40 см. Норма висіву насіння – 2 млн схожих насінин на 1 га.

Насіння гречки сорту Антарія перед посівом обробляли суспензією бактерій *A. brasilense* 18/2 та його S- і R- форм із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину. У контрольному варіанті насіння зволожували водою.

**Результати та їх обговорення.** При розсіві популяції *A. brasilense* 18/2 на картопляне середовище з янтарною кислотою утворювалось два типи колоній:

одні з них – округлі, прозорі, слизисті, блискучі, діаметром 5-7 мм, при пересіві штрих слизистий, з перламутровим блиском і блідо-рожевим забарвленням (S-форма);

інші – матові, випуклі, рожевого кольору, діаметром 3 мм, при пересіві штрих складчастий, не слизистий, з рожевим забарвленням та перламутровим блиском (R-форма).

За літературними даними [1] перші фенотипові зміни при дисоціативних переходах відбуваються в клітинній оболонці, що може змінити інтенсивність надходження речовин у клітини, і як наслідок, – швидкість росту, стійкість клітин до дії фізичних і хімічних факторів, активність ферментів, пов'язаних з мембранами.

Проведені дослідження показали, що дисоціанти не відрізнялися між собою за швидкістю росту. Так, колонії обох типів на поверхні агаризованого середовища з'являлись на третю добу. При посіві на напіврідке середовище Доберейнер бактерії як зі слизистих, так і з шорсткуватих колоній через 3 доби утворювали плівку на поверхні середовища та змінювали його забарвлення, що є характерним для азоспірил. При мікроскопії встановлено, що бактерії обох варіантів не втрачали рухомості, як це іноді спостерігається при переході в R-форму.

Дослідження стійкості бактерій до антибіотиків показало, що як вихідний штам *A. brasilense* 18/2, так і його R- і S-форми

були резистентними до ампіциліну, оксациліну та поліміксину, малочутливими до цефотаксиму і чутливими до інших антибіотиків, які використовували в досліді (табл. 1). Відмічено незначне зменшення діаметру зони затримки росту у S-форми як у порівнянні з вихідним штамом, так і з R-формою.

**Таблиця 1. Антибіотикочутливість *A. brasilense* 18/2 та його R- і S-форм**

Антибіотики та механізм їх біологічної дії	Діаметр зони затримки росту, мм		
	<i>A. brasilense</i> 18/2	<i>A. brasilense</i> 18/2 (S-форма)	<i>A. brasilense</i> 18/2 (R-форма)
Інгібітори синтезу білка:			
<i>гентаміцин</i>	45,0	43,3	42,7
<i>еритроміцин</i>	36,0	32,7	40,0
<i>фурадонін</i>	47,7	37,7	41,0
Інгібітори синтезу клітинної стінки:			
<i>ампіцилін</i>	0	0	0
<i>оксацилін</i>	0	0	0
<i>цефотаксим</i>	16,7	13,7	17,6
Інгібітори транскрипції і синтезу нуклеїнових к-т:			
<i>норфлоксацин</i>	60,7	54,0	60,3
<i>ципрофлоксацин</i>	59,6	61,3	61,7
Інгібітор функціонування ЦПМ			
<i>поліміксин</i>	0	0	0

Відомо, що бактерії роду *Azospirillum* є одними з найбільш активних азотфіксаторів і утворюють з різними видами рослин ефективні асоціації. Штам *A. brasilense* 18/2 активно колонізує корені рослин гречки та сприяє підвищенню рівня фіксації молекулярного азоту у кореневій зоні. На його основі створено препарат Діазобактерин, застосування якого у технології вирощування гречки забезпечує істотне підвищення урожайності (від 12,4 до 18,1 %) та якості зерна [8]. Тому, важливо було з'ясувати, чи впливає зміна морфології колоній *A. brasilense* 18/2 на активність азотфіксації.

Проведені дослідження показали, що бактерії обох морфологічних варіантів *A. brasilense* 18/2 не втрачають здатності

фіксувати азот атмосфери в чистій культурі і за цим показником навіть перевищують вихідний штам. Так, вихідний штам фіксував  $6,4 \pm 0,42$  мкг N/мл середовища за 24 години, а його S- та R-варіанти відповідно  $7,5 \pm 0,20$  та  $11,1 \pm 1,61$  мкг N/мл середовища за 24 години.

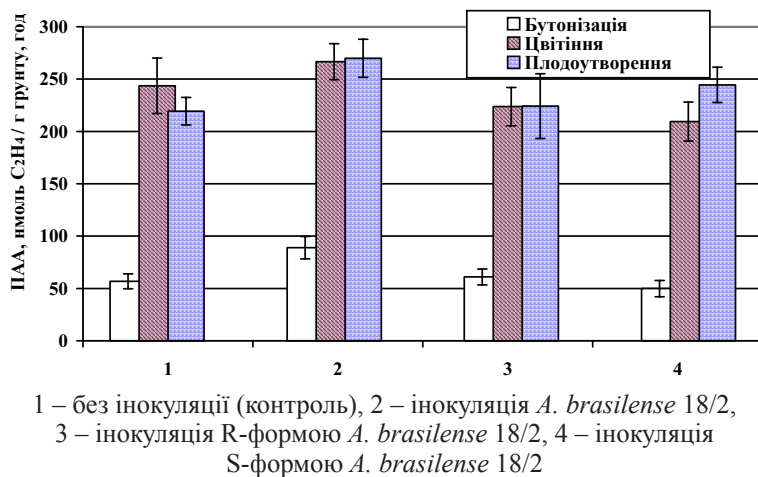


Рис. 1. Потенційна азотфіксувальна активність у ризосферному ґрунті рослин гречки сорту Антарія за інокуляції насіння штамом *A. brasilense* 18/2 та його R- і S-формами

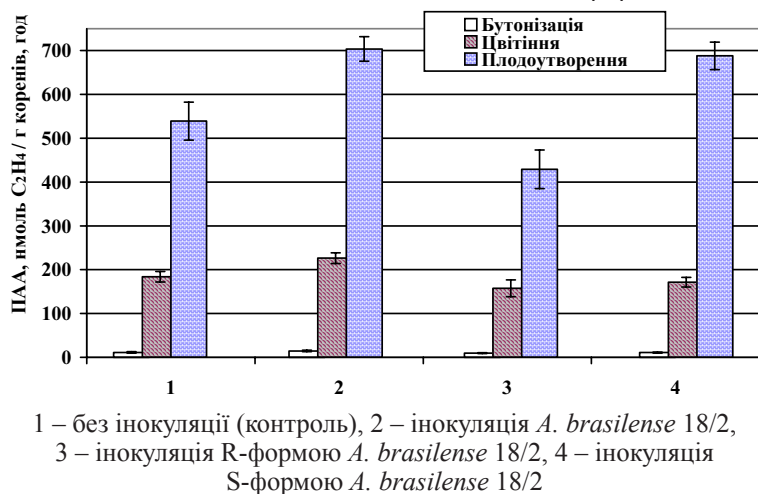


Рис. 2. Потенційна азотфіксувальна активність на корінні рослин гречки сорту Антарія за інокуляції насіння штамом *A. brasilense* 18/2 та його R- і S-формами

Здатність дисоціантів утворювати ефективні асоціації з гречкою вивчали у польовому досліді. Як видно з представлених на рис. 1 і 2 результатів досліджень, максимум активності процесу азотфіксації в кореневій зоні гречки припадав на період цвітіння рослин та плодоутворення.

Збільшення потенційної азотфіксувальної активності як у ризосферному ґрунті, так і на корінні рослин в усі фази їх розвитку відносно контролю відмічено лише у варіанті, де насіння було бактеризоване вихідним штамом. Це, ймовірно, сприяло оптимізації азотного живлення та позитивно позначилося на продуктивності культури: урожайність гречки під дією штаму *A. brasilense* 18/2 збільшилась на 24,8 % у порівнянні з варіантом без інокуляції (табл. 3).

**Таблиця 3. Ефективність бактеризації насіння гречки сорту Антарія штамом *A. brasilense* 18/2 і його S- та R-варіантами (польовий дослід, 2009 р.)**

Варіанти дослідів	Урожайність, ц/га	Приріст до контролю	
		ц/га	%
Без інокуляції (контроль)	18,33	–	
Інокуляція <i>A. brasilense</i> 18/2	22,88	4,55	24,8
Інокуляція R-формою <i>A. brasilense</i> 18/2	20,80	2,47	13,5
Інокуляція S-формою <i>A. brasilense</i> 18/2	17,35	–	–
НІР <sub>0,5</sub>	2,17		

Слід відмітити зростання урожайності зерна і у варіанті з застосуванням для інокуляції R-форми досліджуваного штаму, хоча активність азотфіксації у цьому варіанті була на рівні контролю. Очевидно, цей факт можна пояснити тим, що позитивна дія азоспірил полягає не тільки у здатності фіксувати молекулярний азот, а і продукувати біологічно активні речовини, які позитивно впливають на ріст та розвиток рослин.

Отже, в процесі субкультивування виробничі штами можуть дисоціювати, що призводить до зниження їх активності. Тому, важливо контролювати популяційний склад виробничих штамів та відпрацьовувати методи їх довготривалого зберігання, за яких ризик генетичних змін мінімальний.

Автор висловлює подяку Ковалевській Т.М. та Губановій Л.С. за допомогу в проведенні досліджень.

1. Милько Е.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации /Е.С. Милько, Н.С. Егоров. – М.: Из-во МГУ, 1991. – 144 с.

2. Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* /Л.П. Мартынкина //Микробиол. – 1996. – Т. 5. – С. 352-356.

3. Сапунова Л.И. Хранение актинобактерий рода *Arthrobacter* под минеральным маслом /Л.И. Сапунова, С.В. Баева, И.О. Козакевич //Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии (Минск, 1-2 июня 2006 г.): матер. междунар. конф. – Минск, 2006. – С. 8-11.

4. Патыка В.Ф. Экология *Bacillus thuringiensis* /В.Ф. Патыка, Т.И. Патыка. – К.: Из-во ПДАА, 2007. – 226 с.

5. Васюк Л.Ф. К вопросу о диссоциации у *Rhizobium meliloti* /Л.Ф. Васюк, Б.В. Ченцов, И.Б. Иванова //Экология и физиология почвенных микроорганизмов: сб. науч. тр. – Л., 1976. – С. 87-93.

6. Полтавська О.А. Антибіотикочутливість біфідобактерій, ізольованих із різних природних джерел /О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко //Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 6. – С. 32-39.

7. Методичні рекомендації по визначенню активності азотфіксації в ґрунті та кореневій зоні рослин ацетиленовим методом /за ред. В.В. Волкогона. – Чернігів, 1997. – 14 с.

8. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика /[В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Т.М. Ковалевська та ін.]. – К.: Аграрна наука, 2006 – 312 с.

## **СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ R- И S-ФОРМ ШТАММА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 18/2**

**Горбань В.П.**

Інститут сільськогосподарської мікробиології УААН, г. Чернігов

*У производственного штамма *A. brasilense* 18/2, который продолжает длительное время сохраняется методом периодических пересеивов на агаризованной среде, установлена способность к диссоциации на R- и S-формы. Установлено, что эффективную ассоциативную систему с растениями гречихи может формировать только исходный штамм *A. brasilense* 18/2.*

Ключевые слова: диссоциация, азоспириллы, потенциальная азотфиксирующая активность, гречиха.

## **THE COMPARISON OF R- AND S-FORM OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 18/2 STRAIN EFFICIENCY**

**Gorban V.P.**

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*The dissociation ability for R- and S-form by the industrial strain A. brasilense 18/2 preserved for long period by method of periodical replanting on the agar medium was established. It was shown that only starting strain A. brasilense 18/2 had formed the effective associative systems with buckwheat plants.*

*Key words: dissociation, azospirillum, potential nitrogen-fixing activity, buckwheat.*