

**РІСТ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* I
AZOSPIRILLUM BRASILENSE У ЗМІШАНІЙ
КУЛЬТУРИ В УМОВАХ *IN VITRO***

Козар С.Ф., Усманова Т.О., Жеребор Т.А.

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

*У результаті проведених досліджень виявлено істотніший вплив азоспірил на ростову активність бульбочкових бактерій у порівнянні з впливом *Bradyrhizobium japonicum* на ріст *Azospirillum brasilense*. Найвищу чисельність досліджуваних бактерій спостерігали за середньої початкової концентрації (0,272 млрд/см³) клітин бактерій кожного виду при їх вихідному співвідношенні 1:1. Показано, що змішане культивування бульбочкових бактерій сої і азоспірил зменшує дію стресових факторів на ріст *B. japonicum* у лаг-фазі.*

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, динаміка росту.

Застосування мікробних препаратів на основі азотфіксувальних бактерій набуває все більшого значення в сільськогосподарському виробництві. У зв'язку з цим дослідження умов росту ґрунтових мікроорганізмів є, безперечно, актуальними, оскільки вони є базою для вирішення проблеми отримання додаткової мікробної біомаси і продуктів метаболізму діазотрофів, а також для результативної інтродукції останніх у кореневу зону рослин.

Підвищити ростову, а також функціональну активність діазотрофів можливо за рахунок впливу різних чинників. Одним із перспективних є використання змішаних культур мікроорганізмів. Так, N. Goldenfeld, C. Woese [1] зазначають, що найближчим часом, у зв'язку з відкриттям горизонтального переносу генів, взагалі можлива зміна парадигми в мікробіології шляхом відмови від вивчення чистих культур, які вони вважають неприродними.

З літературних джерел відомо, що сполуки, які продукують бактерії, можуть позитивно впливати на ріст інших мікроорганізмів, як аеробних так і анаеробних [2, 3]. Це свідчить про можливість підвищення ростової активності мікроорганізмів різних видів, у

т.ч. діазотрофів, при сумісному культивуванні. Крім того, змішані культури можуть бути функціональнішими при застосуванні. Так, є дані щодо перспективності змішаної інокуляції рослин різними видами ризобактерій, у т.ч. *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* [5, 6]. Зазначається, що сумісна інокуляція сої цими мікроорганізмами сприяє утворенню на корінні більшої чисельності активних бульбочок, збільшенню активності азотфіксації і засвоєнню рослинами сполук азоту, що сприяє зростанню маси рослин і урожайності. У той же час відзначається необхідність більш глибокого вивчення цього питання [6].

Метою даної роботи було дослідження особливостей росту в умовах *in vitro* популяцій ґрунтових діазотрофів, які належать до видів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense*, за різного початкового співвідношення цих бактерій.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були такі діазотрофи: *Bradyrhizobium japonicum* М-8, *Azospirillum brasilense* 410, *Azospirillum brasilense* 18-2 (отримані з Національної колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології Національної академії аграрних наук України).

Посівну культуру *A. brasilense* вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці при 220 об./хвилину за температури 28 ± 2 °С. Використовували поживне середовище наступного складу (г/дм³): кукурудзяний екстракт – 30,0, м'яса – 30,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,10, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, K_2HPO_4 – 0,25, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,20, CaCO_3 – 0,30.

Бактерії роду *Bradyrhizobium* культивували за тих же умов у рідкому поживному середовищі наступного складу (г/дм³): відвар насіння гороху – 100, глюкоза – 10, сахароза – 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, CaCO_3 – 0,3.

Для визначення оптимального співвідношення цих мікроорганізмів при їх сумісному культивуванні до поживних середовищ із бактеріями одного виду вносили різну кількість інокульому бактерій іншого виду. Так, при мінімальній (min) концентрації бактеріальних клітин їх початковий титр становив 0,082 млрд/см³, середній (mid) – 0,272 млрд/см³. При максимальній (max) же концентрації мікробних клітин початкова чисельність бактерій у поживному середовищі була 0,680 млрд/см³.

Чисельність мікроорганізмів у бактеріальній суспензії визначали мікробіологічними методами [7, 8]. Для обробки експериментальних даних використовували комп'ютерну програму Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. У наших попередніх роботах досліджено вплив продуктів метаболізму, які містяться в стерильній культуральній рідині бактерій родів *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* на ріст діазотрофів [9]. У результаті виявлено, що для підвищення ростової активності симбіотичних діазотрофів *B. japonicum* ефективним є додавання в поживне середовище для їх культивування стерильної культуральної рідини з продуктами метаболізму бактерій *A. brasilense*. При змішаному культивуванні бульбочкових бактерій сої та азоспірил відбувається поступове накопичення мікробних метаболітів у середовищі. При цьому, екзометаболіти мікроорганізмів впливають безпосередньо на ріст популяції і життєдіяльність клітин бактерій іншого виду.

Враховуючи різні вимоги *B. japonicum* і *A. brasilense* до джерел живлення, нами підібрано поживне середовище (табл. 1), в якому ростова активність була високою і не поступалася росту в рекомендованих середовищах. У подальших дослідженнях *B. japonicum* і *A. brasilense* культивували саме в цьому середовищі.

Таблиця 1. Склад напівсинтетичних середовищ для культивування *B. japonicum* і *A. brasilense*

Поживне середовище для культивування бактерій	Компоненти поживних середовищ										
	відвар насіння гороху	кукурудзяний екстракт	глюкоза	меляса	сахароза	кормові дріжджі	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ × 7H ₂ O	CaCO ₃
<i>B. japonicum</i>	×	–	×	–	×	–	×	×	×	×	×
<i>A. brasilense</i>	–	×	–	×	–	–	×	×	×	×	×
<i>B. japonicum</i> і <i>A. brasilense</i>	–	–	×	×	–	×	×	×	×	×	×

Примітка. × – компонент входить до складу поживного середовища.

Досліджено параметри росту *B. japonicum* і *A. brasilense* у поживному середовищі, підбраному нами для сумісного культивування цих мікроорганізмів. Вивчено зміни чисельності бактерій *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 на початку лаг-фази у чистій і змішаній культурі. Виявлено, що протягом перших шести годин при періодичному культивуванні відбувалося зменшення чисельності життєздатних клітин (рис. 1). Найбільше зниження кількості бактерій – у 28 разів – виявлено при культивуванні *B. japonicum* М-8 у чистій культурі. Чисельність *A. brasilense* 18-2 зменшилася в 6,2 раза. При цьому слід відзначити, що в змішаній культурі спостерігався більш пізній початок фази деградації росту *B. japonicum*.

Отримані дані свідчать про те, що культивування діазотрофів у змішаній культурі зменшує дію стресових факторів (зміна консистенції середовища, концентрації поживних речовин, умов культивування тощо) на ріст досліджуваних азотфіксувальних бактерій при періодичному культивуванні. Так, за сумісного культивування з азоспірилами чисельність *B. japonicum* М-8 максимально знизилася у 2,5 раза, а *A. brasilense* 18-2 – у 4,4 раза. Виявлено істотніший вплив екзометаболітів азоспірил на ростову активність бульбочкових бактерій у порівнянні з впливом метаболітів *B. japonicum* на ріст популяції *A. brasilense*.

У попередніх дослідах нами виявлено взаємний позитивний вплив *B. japonicum* і *A. brasilense* на їх ріст у контрольованих умовах при рекомендованій початковій концентрації клітин. Однак, суттєвий вплив на розвиток бактерій при змішаному культивуванні може мати початкове співвідношення зазначених діазотрофів. У зв'язку з цим, перед нами постало завдання вивчити закономірності росту *B. japonicum* і *A. brasilense* у змішаній культурі за різної вихідної концентрації клітин.

При мінімальній концентрації клітин зазначених діазотрофів спостерігали повільний ріст бульбочкових бактерій (рис. 2А). При цьому найсуттєвішу різницю між чисельністю клітин *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 відмічено через 48 годин, і вона становила 2,0 млрд/см³. Чисельність азоспірил при цьому перевищувала кількість бульбочкових бактерій сої у п'ять разів. Аналізуючи подальшу динаміку росту азотфіксувальних бактерій, слід відмітити зближення показників їхньої чисельності. Кінцеве співвідношення *B. japonicum* і *A. brasilense* було 1:1,3. За сумісного культивування

бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 титр мікроорганізмів збільшувався протягом усього періоду культивування, проте чисельність азоспірил не значно перевищувала кількість *B. japonicum* М-8. Слід зазначити, що титр *A. brasilense* 410 був нижчим у порівнянні з *A. brasilense* 18-2, при цьому чисельність *B. japonicum* М-8 була вищою при культивуванні з *A. brasilense* 410, ніж із *A. brasilense* 18-2.

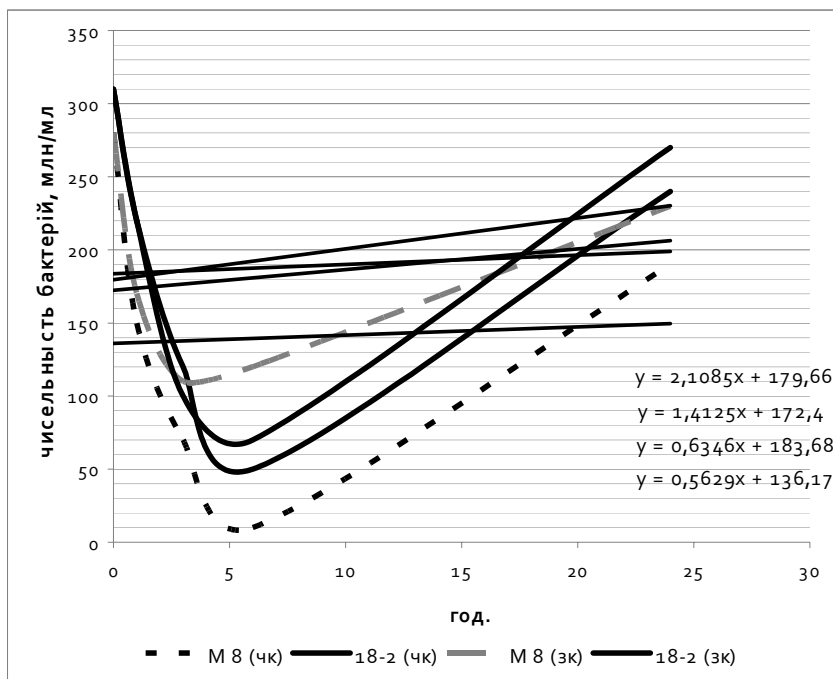


Рис. 1. Динаміка росту *Bradyrhizobium japonicum* М-8 і *Azospirillum brasilense* 18-2 на початку лаг-фази у чистій (чк) і змішаній культурі (зк)

При мінімальній початковій концентрації *B. japonicum* М-8 та середній *A. brasilense* 18-2 виявлено таку ж закономірність росту бульбочкових бактерій. Чисельність азоспірил у експоненційну фазу росту перевищувала чисельність *B. japonicum* у 8,5 раза (рис. 2). Кінцеве співвідношення *B. japonicum* і *A. brasilense* становило 1:1,6. Чисельність *A. brasilense* 410 була нижчою, ніж

A. brasilense 18-2, і в експоненційній фазі росту мікроорганізмів перевищувала чисельність бульбочкових бактерій у 1,6 раза, а кінцеве співвідношення становило 1:1,06.

При мінімальній початковій концентрації *B. japonicum* М-8 та максимальній *A. brasilense* виявлено дуже повільне зростання чисельності бульбочкових бактерій (рис. 2В, 2Е). Чисельність азоспірил у всі фази росту перевищувала кількість бульбочкових бактерій.

Іншу закономірність спостерігали при середній початковій концентрації *B. japonicum* М-8 та мінімальній *A. brasilense* 18-2. Виявлено, що в перші 24 год. чисельність бульбочкових бактерій була вищою у порівнянні з азоспірилами (рис. 3А, 3Г). Чисельність азоспірил в експоненційну фазу росту перевищувала чисельність *B. japonicum* у 3,2 раза. Кінцеве співвідношення *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 становило 1,5:1, а *B. japonicum* і *A. brasilense* 410 – 1:0,9. Слід наголосити на тому, що по завершенні культивування титр бульбочкових бактерій сої перевищував титр азоспірил.

При середній початковій концентрації *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 виявлено велику різницю чисельності бактерій через 48 год. їх культивування. Чисельність азоспірил у експоненційну фазу росту перевищувала цей показник у *B. japonicum* у 6,1 раза (рис. 3Б). Через 72 годин культивування бактерій їхня чисельність зрівнялася. При культивуванні *B. japonicum* М-8 з *A. brasilense* 410 у тому ж співвідношенні не спостерігали істотної різниці в чисельності мікроорганізмів протягом усього періоду культивування (рис. 3Д).

За культивування *B. japonicum* М-8 з максимальною кількістю азоспірил, спостерігалася найбільша різниця в титрі цих бактерій. Так, в експоненційній фазі росту мікроорганізмів чисельність *A. brasilense* 18-2 перевищувала *B. japonicum* М-8 в 11 разів, а за культивування бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 ця різниця була істотно меншою (у 3 рази).

При співвідношенні *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 max : min (рис. 4) чисельність бульбочкових бактерій по завершенні періоду культивування у змішаній культурі перевищувала чисельність *A. brasilense* 18-2 втричі, тоді як за культивування з *A. brasilense* 410, чисельність азоспірил була такою ж, як і бульбочкових бактерій.

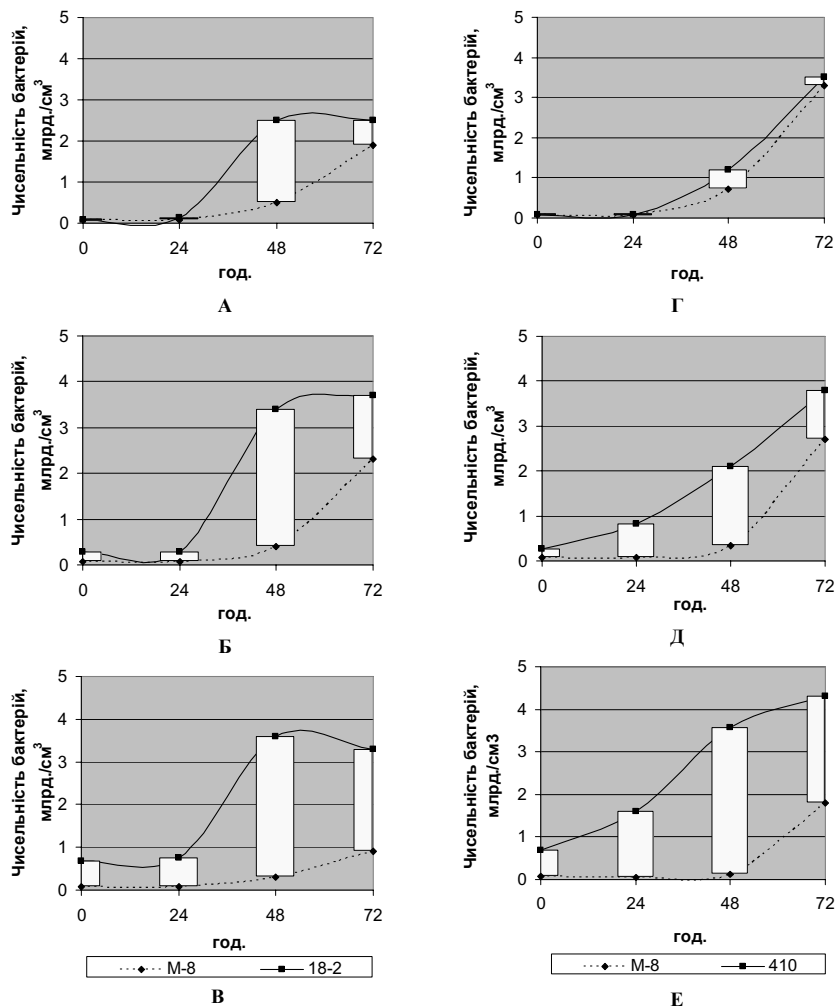


Рис. 2. Динаміка росту діазотрофів у змішаній культурі

- A – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 1:1 (min : min)
 B – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 1:3,3 (min : mid)
 B – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 1:2,5 (min : max)
 Г – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 410 3,3:1 (min : min)
 Д – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 410 1:1 (min : mid)
 Е – співвідношення *V. jaronicum* M-8 і *A. brasilense* 410 1:2,5 (min : max)

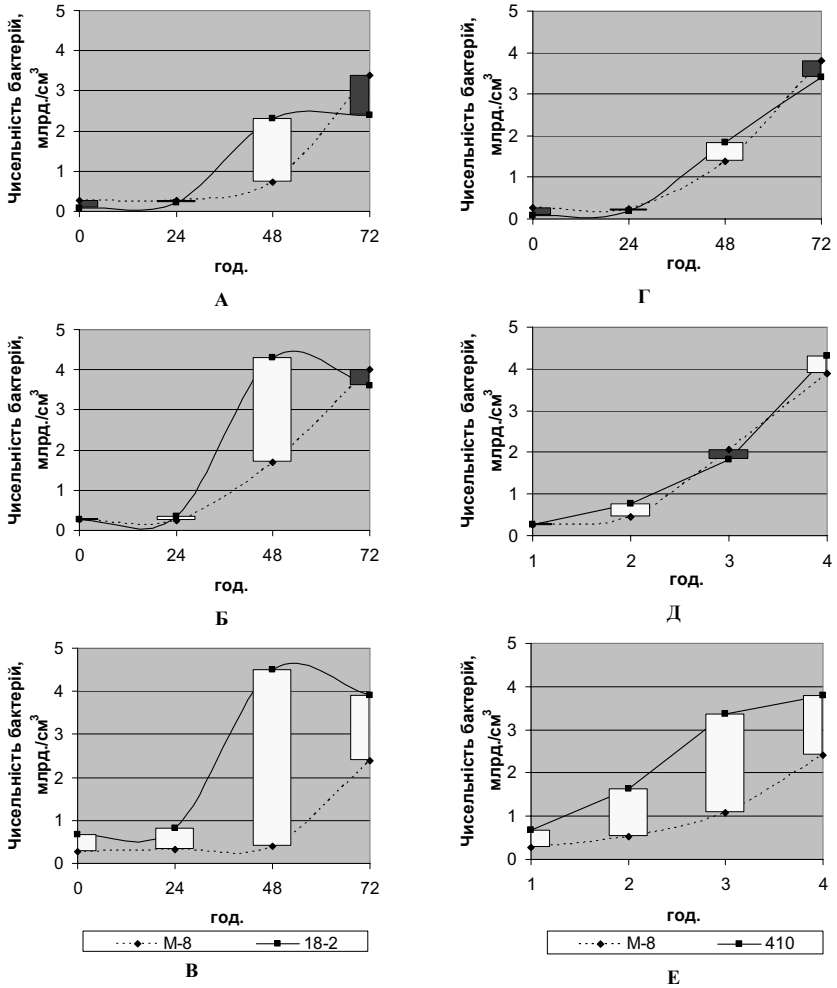


Рис. 3. Динаміка росту діазотрофів у змішаній культурі
 А – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 3,3:1 (mid : min)
 Б – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 1:1 (mid : mid)
 В – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 1:2,5 (mid : max,)
 Г – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 3,3:1 (mid : min)
 Д – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 1:1 (mid : mid)
 Е – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 1:2,5 (mid : max)

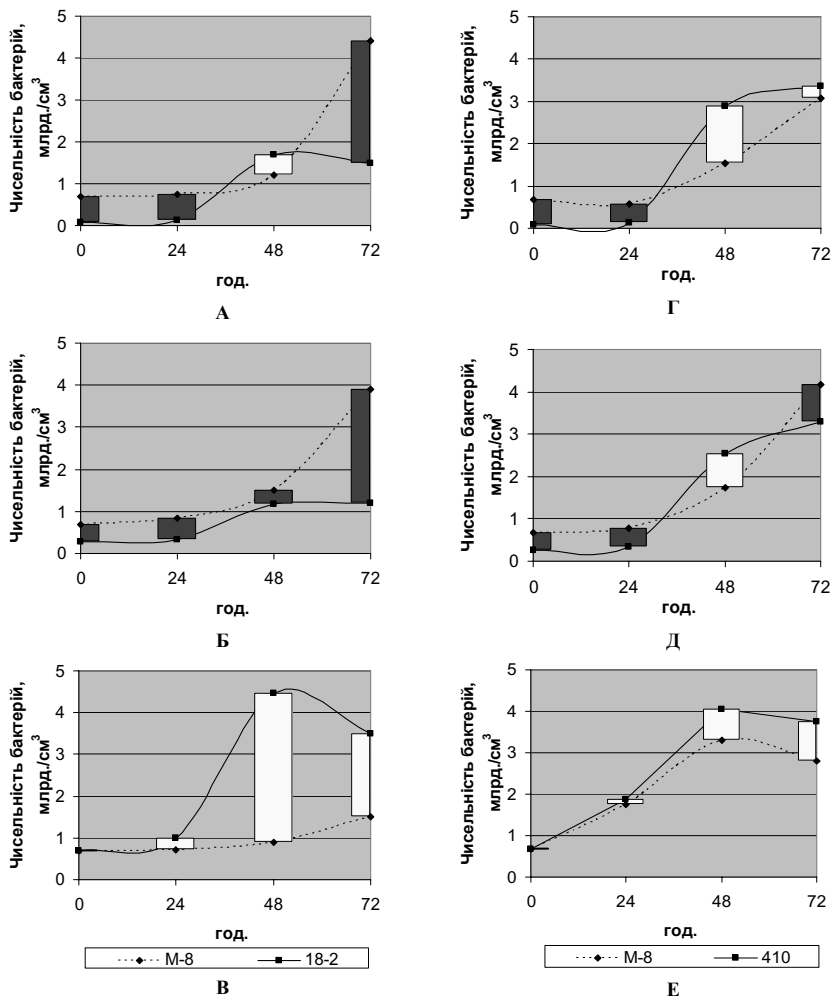


Рис. 4. Динаміка росту діазотрофів у змішаній культурі
 А – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 8,3:1 (max : min)
 Б – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 2,5:1 (max : mid)
 В – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 18-2 2,5:1 (max : max)
 Г – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 8,3:1 (max : min)
 Д – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 2,5:1 (max : mid)
 Е – співвідношення *V. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 2,5:1 (max : max)

За змішаного культивування *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* у співвідношенні max : mid, чисельність бульбочкових бактерій перевищувала кількість бактеріальних клітин *A. brasilense* 18-2 протягом усього періоду культивування й кінцеве співвідношення мікроорганізмів становило 3:1. У той же час, за культивування бульбочкових бактерій з *A. brasilense* 410 цей показник становив 1,3:1.

При початковому співвідношенні бактерій max : max, чисельність *B. japonicum* М-8 була нижчою у порівнянні з азоспірилами протягом усього періоду культивування. Кінцеве співвідношення *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 становило 1:2,3, а з *A. brasilense* 410 – 1:1,3, що свідчить про те, що досліджувані штами азоспірил володіють більш високою ростою активністю у порівнянні з *B. japonicum* М-8.

Таким чином, найвищу чисельність досліджуваних бактерій спостерігали за середньої початкової концентрації клітин ($0,272$ млрд/см³) кожного виду при вихідному співвідношенні 1:1. Виявлено більш істотний вплив азоспірил на ростову активність бульбочкових бактерій у порівнянні з впливом *B. japonicum* на ріст *A. brasilense*. Показано, що змішане культивування бульбочкових бактерій і азоспірил на порядок зменшує дію стресових факторів (зміна консистенції середовища, концентрації поживних речовин, умов культивування тощо) на ріст бульбочкових бактерій сої.

1. Goldenfeld N. Biology's next revolution /Goldenfeld N., Woese C. //Nature. – 2007. – Vol. 445. – P. 369.

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

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

4. Maria D. Groppa. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants /Maria D. Groppa, Myriam S. Zawoznik, Maria L. Tomaro //Europ. J. of Soil Biol. – 1998. – Vol. 34. – P. 75-80.

5. Galal Y.G.M. Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium*

japonicum and *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.) /Galal Y.G.M. //Biology and Fertility of Soils. – 1997. – Vol. 24, N 3. – P. 317-322.

6. Benintende S. Comparison of coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* with inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* on nodulation, growth, and N accumulation in the soybean crop /[Benintende S. et al.]. – Agriscientia. – 2010. – Vol. 27. – P. 71-77.

7. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток /С.Дж. Перт; [пер. с англ. Т.А. Петровой, И.Н. Мозговой]; ред. И.Л. Работной. – М.: Мир, 1978. – 331 с.

8. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов /Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.; [ред. Шильниковой В.К.]. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.

9. Козар С.Ф. Регулювання ростої активності популяцій промислових штамів *Bradyrhizobium japonicum* в умовах *in vitro* /Козар С.Ф., Усманова Т.О. //С.-г. мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2008. – Вип. 7. – С. 36-47.

РОСТ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* И *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Козар С.Ф., Усманова Т.О., Жеребор Т.А.

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

*В результате проведенных исследований выявлено существенное влияние азоспирилл на ростовую активность клубеньковых бактерий по сравнению с влиянием *Bradyrhizobium japonicum* на рост *Azospirillum brasilense*. Наивысшую численность исследуемых бактерий наблюдали при средней начальной концентрации (0,272 млрд/см³) клеток бактерий каждого вида при их исходном соотношении 1:1. Показано, что смешанное культивирование клубеньковых бактерий сои и азоспирилл уменьшает действие стрессовых факторов на рост *B. japonicum* в лаг-фазе.*

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, динамика роста.

**THE GROWTH OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*
AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* IN THE MIXED
CULTURE *IN VITRO***

Kozar S.F., Usmanova T.O., Zhrebtor T.A.

Institute of Agricultural Microbiology NAAS of Ukraine, Chernihiv

*As a result of the conducted researches the substantial influence of azospirillum bacteria on the growth activity of nodule bacteria as comparing to the influence of *Bradyrhizobium japonicum* on growth of *Azospirillum brasilense* was found out. The greatest quantity of the studied bacteria was observed at average initial concentration (0,272 milliard/cm³) of bacterial cells of every kind at their initial ratio 1:1. It was shown that combined cultivation of soybean nodule bacteria and azospirillum bacteria reduces effect of stress factors on the growth of *B. japonicum* in the lag-phase.*

*Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, dynamics of growth.*