

УДК 579.64

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *AZOTOBACTER* НА НАСІННІ *CUCUMIS SATIVUS* L. ЗА ДІЇ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

О. М. Білоконська, С. Ф. Козар, Т. А. Євтушенко, Т. О. Усманова

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: obilokonska@ukr.net

Представлено результати досліджень впливу температури на збереженість клітин *Azotobacter chroococcum* M-70 та *Azotobacter vinelandii* M-X на насінні *Cucumis sativus* L. Через три місяці кількість бактеріальних клітин на насінні, яке зберігали за температури +4°C, була істотно більшою за показники варіанту зі зберіганням насіння за температурою +28°C. Цисти азотобактера зберігалися краще за вегетативні клітини. Для підвищення життєздатності клітин бактерій на насінні запропоновано використовувати комплекс хімічних речовин, який забезпечує кращу виживаність як вегетативних клітин, так і цист азотобактера. Отримані результати досліджень можуть бути використані для розробки нових способів підвищення життєздатності корисних ґрунтових мікроорганізмів на насінні сільськогосподарських культур.

Ключові слова: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, цисти, температура, комплекс хімічних речовин, збереженість, життєздатність.

Сьогодні існує підвищений інтерес до використання ґрунтових азотфіксуючих бактерій як альтернативи хімічним та синтетичним добривам у сільськогосподарському виробництві, оскільки ці мікроорганізми сприяють підвищенню урожайності культур та поліпшенню якості рослинницької продукції, не забруднюючи навколишнє середовище. Одним із представників діазотрофів є азотобактер, який активно фіксує атмосферний азот та переводить його в доступну для рослин форму. Відома також здатність представників роду *Azotobacter* до продукування фізіологічно активних речовин, що позитивно впливає на ріст і розвиток сільськогосподарських культур. Інтродукція азотобактера в ризосферу рослин відбувається шляхом передпосівної обробки насіння, але за дії факторів зовнішнього середовища (зокрема, несприятливої температури) бактерії можуть гинути в проміжку часу від бактеризації до початку розвитку сільськогосподарських культур. Зменшення чисельності клітин азотобактера на насінні може негативно вплинути на ефективність бактеризації [9; 12].

Бактерії роду *Azotobacter* здатні переходити у стан спокою, утворюючи цисти [5]. Цисти мікроорганізмів стійкіші до дії не-

сприятливих факторів, ніж вегетативні клітини [10]. Це в свою чергу дає змогу проводити бактеризацію насіння завчасно.

Виходячи з вищезазначеного, актуальним є дослідження впливу різних температур на збереженість азотобактера як у формі цист, так і вегетативних клітин, що дозволить розширити знання про бактерії роду *Azotobacter* та забезпечити збільшення строків збереження життєздатності бактерій на насінні.

Матеріали і методи. Дослідження проводили з *Azotobacter chroococcum* M-70 [2; 8] та *Azotobacter vinelandii* M-X [1; 8; 11]. Мікроорганізми отримано з колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Для отримання вегетативних клітин бактерії культивували в рідкому живильному середовищі Ешбі [7]. Досліджувані мікроорганізми вирощували 72 години в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці при 220 об./хвилину за 28 °С.

Для утворення цист азотобактером бактеріальну суспензію висівали поверхнево на агаризоване середовище Ешбі, після чого чашки Петрі поміщали в термостат на 6 діб

при температурі 28 ± 2 °С. Після цього чашки Петрі з біомасою бактерій поміщали на 5 діб у термостат з температурою 44 °С [12; 13]. Утворення цист контролювали методом фарбування фіксованого мазка з подальшим мікроскопуванням. Фарбування цист здійснювали за методикою, запропонованою О. Вісом [13].

Для подовження збереженості мікроорганізмів застосовували раніше підібраний комплекс хімічних речовин (КХР) [3], який складається з полісахаридів (альгінат натрію, крохмаль) і речовин білкової природи (желатин). Насіння *Cucumis sativus* L. (сорт огірка — Конкурент) [4] бактеризували одночасно із застосуванням комплексу хімічних речовин. Вихідна чисельність бактерій складала $3,5 \times 10^4$ клітин на насінину. Бактеризоване насіння зберігали без доступу світла за температури $+4 \pm 2$ °С; $+12 \pm 2$ °С; $+20 \pm 2$ °С; $+28 \pm 2$ °С.

Схема досліду № 1 з *A. chroococcum* М-70 включала чотири блоки:

I. Зберігання насіння за температури $+4 \pm 2$ °С.

II. Зберігання насіння за температури $+12 \pm 2$ °С.

III. Зберігання насіння за температури $+20 \pm 2$ °С.

IV. Зберігання насіння за температури $+28 \pm 2$ °С.

У кожному блоці досліду передбачено такі варіанти:

1. Бактеризація насіння *A. chroococcum* М-70 у вигляді цист.

2. Бактеризація насіння *A. chroococcum* М-70 у вигляді цист з одночасною обробкою КХР.

3. Бактеризація насіння *A. chroococcum* М-70 у вигляді вегетативних клітин.

4. Бактеризація насіння *A. chroococcum* М-70 у вигляді вегетативних клітин з одночасною обробкою КХР.

Схема досліду № 2 з *A. vinelandii* М-Х така ж як і досліду № 1.

Чисельність бактерій на насінні визначали на 30, 60 та 90-у добу методом послідовних розведень з наступним висівом на агаризоване середовище Ешбі [5; 6]. Попередньо на насінні огірка визначали чисельність епіфітних бактерій, здатних рости на середовищі Ешбі.

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням пакета програм Excel.

Результати та їх обговорення. Визначення чисельності епіфітних бактерій, здатних до росту на безазотному середовищі Ешбі, свідчить, що їх кількість не перевищує 2×10^2 клітин/насінину. Цю кількість бактеріальних клітин враховували при проведенні обліку діазотрофів на насінні в обох дослідах.

На рис. 1 наведено результати вивчення збереженості життєздатності цист *A. chroococcum* за впливу різних температур. У ході досліджень встановлено, що за дії температури $+4$ °С цисти бактерій зберігалися на насінні довше у порівнянні з іншими температурами.

У результаті проведених досліджень встановлено, що чисельність цист *A. chroococcum* М-70 за зберігання бактеризованого насіння при температурі $+4$ °С протягом 90 діб була у 3,2 раза менша, ніж за зберігання протягом 60 діб. За температури $+12$ °С різниця у чисельності мікроорганізмів за зберігання насіння протягом 30 діб та 60 діб становила 30,6 %. При зберіганні бактеризованого насіння за температури $+20$ °С різниця в показниках між 30-ю добою та 60-ю добою зберігання становила 29,4 %, а з 60-ї доби чисельність клітин істотно знижувалась. Кількість бактеріальних цист за температури зберігання насіння $+28$ °С різко знижувалась вже після зберігання протягом 30 діб, а на 90-у добу при зберіганні інокульованого насіння за цієї температури життєздатних клітин не виявлено.

На насінні, інокульованому *A. chroococcum* М-70 у вигляді цист із додаванням КХР, через 90 діб зберігання кількість бактерій перевищила показник варіанту інокуляції клітинами азотобактера у вигляді цист без додавання КХР за зберігання при температурі $+4$ °С на 50 %, а за зберігання насіння, обробленого азотобактером у вигляді цист з додаванням КХР при $+12$ °С — у 2,3 раза. Слід зазначити, що за впливу температури $+20$ °С через три місяці зберігання було виявлено життєздатні клітини азотобактера, а за температури $+28$ °С у всіх варіантах життєздатних клітин *A. chroococcum* М-70 не виявлено.

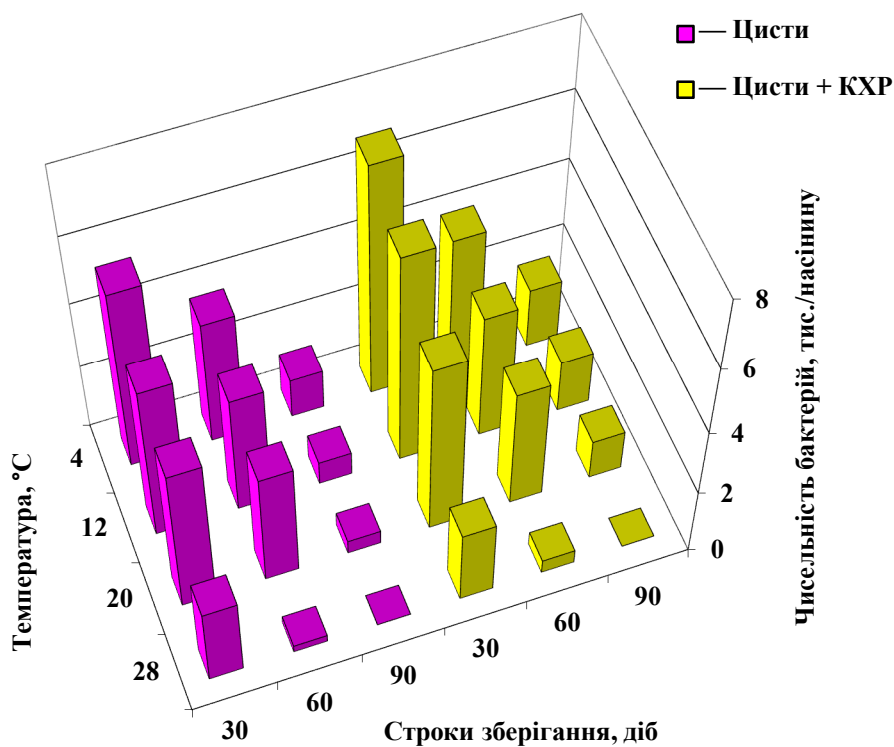


Рис. 1. Вплив температури на збереженість цист *A. chroococcum* M-70 на насінні огірка.

КХР сприяв кращому збереженню *A. chroococcum* M-70 при бактеризації насіння цистами, про що свідчить більша чисельність життєздатних клітин азотобактера у порівнянні з варіантом без КХР. Кращу збереженість азотобактера за дії КХР можна пояснити тим, що він захищає бактерії від несприятливого впливу зовнішнього середовища, а також, можливо, слугує для азотобактера джерелом поживних речовин при виході клітин із стану спокою.

На рис. 2 наведено результати вивчення збереженості життєздатності вегетативних клітин *A. chroococcum* M-70 на насінні огірка за впливу різних температур. Встановлено, що чисельність клітин азотобактера за зберігання насіння при температурі +4°C на 90-у добу була в 3,2 раза меншою, ніж на 60-у добу. За температури +12 °C чисельність мікроорганізмів на 60-у добу зберігання була на 72 % меншою, ніж на 30-у добу. Кількість клітин за температури +28 °C різко знижувалася вже після зберігання протягом 30 діб, а на 90-у добу при зберіганні інокульованого насіння за температури +28 °C життєздатних клітин не виявлено.

На насінні, інокульованому *A. chroococcum* M-70 з додаванням КХР, через 90 діб

зберігання кількість клітин азотобактера перевищила варіант бактеризації без додавання КХР за зберігання при температурі +4 °C на 80 %, за зберігання при температурі +12 °C — на 75 %, а за дії температури +20 °C — в 2,1 раза. За впливу температури +28 °C через три місяці зберігання життєздатних клітин азотобактера не виявлено.

За результатами, наведеними на рис. 3, встановлено, що чисельність цист *A. vinelandii* M-X, за зберігання інокульованого насіння при температурі +4°C, на 90-у добу була в 3,4 раза менша, ніж на 60-у добу. За температури +12 °C чисельність життєздатних мікроорганізмів на 60-у добу була менша на 50 %, ніж на 30-у добу зберігання. Чисельність клітин за температури +20 °C на 60-у добу була менша на 38 %, ніж чисельність діазотрофів на 30-у добу. Кількість цист на 90-у добу знаходилася практично на тому ж рівні, що і на 60-у добу.

Слід зазначити, що за впливу температури +20 °C через три місяці зберігання насіння виявлено життєздатних цист азотобактера в 2,2 раза менше за показник варіанту з КХР, а за температури +28 °C життєздатних цист *A. vinelandii* M-X було в 7,1 раза менше відповідно.

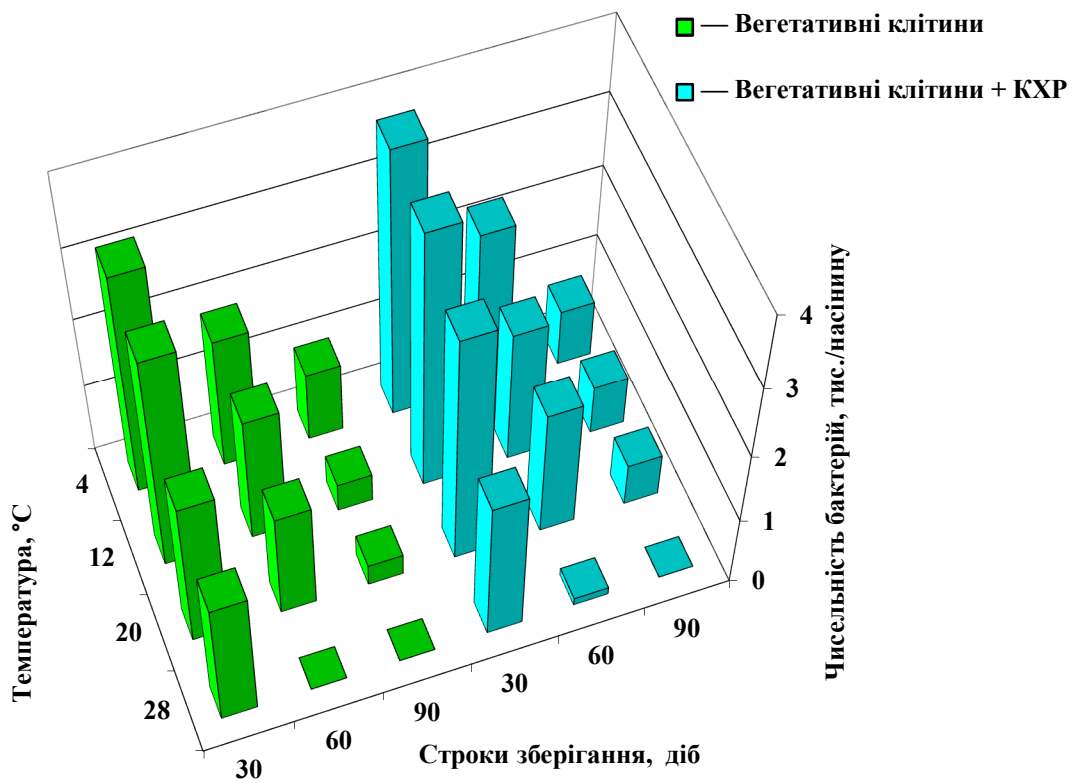


Рис. 2. Вплив температури на збереженість вегетативних клітин *A. chroococcum* M-70 на насінні огірка.

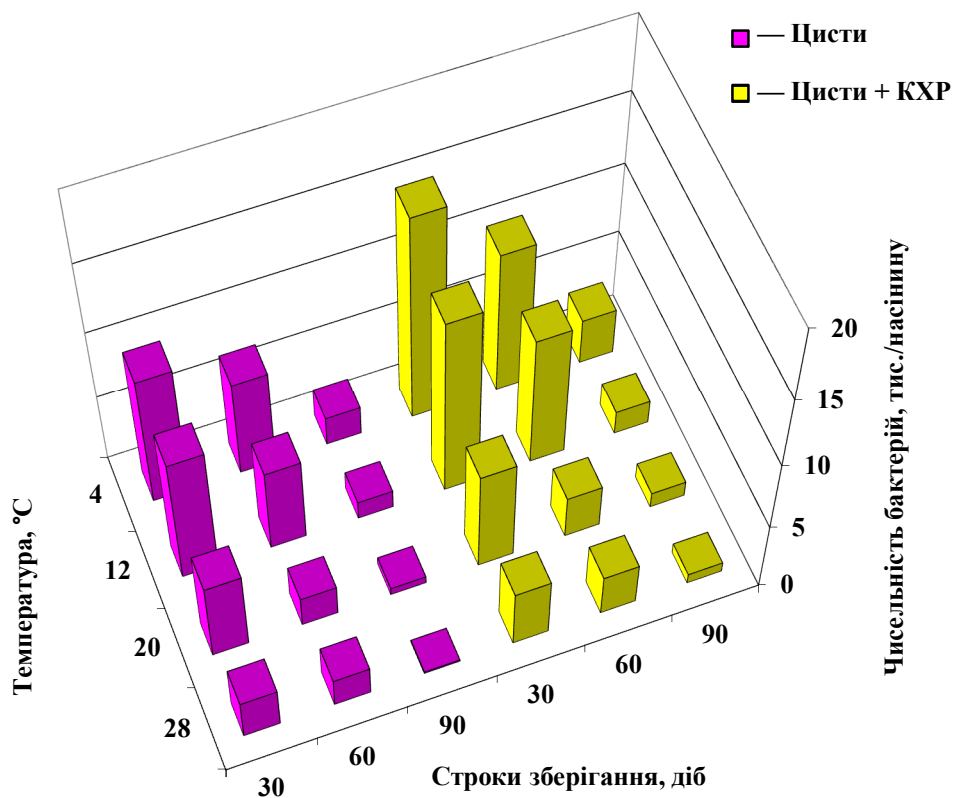


Рис. 3. Вплив температури на збереженість цист *A. vinelandii* M-X на насінні огірка.

Згідно із дослідженнями (рис. 4) чисельність вегетативних клітин за температури +28 °С різко знижується вже після 30 діб, а на 90-у добу такі умови зберігання насіння не дозволили виявити життєздатних вегетативних клітин.

На насінні, інокульованому *A. vinelandii* М-Х з додаванням КХР, через 90 діб зберігання кількість клітин азотобактера перевищила варіант бактеризації без додавання КХР у 2,3 рази за зберігання при температурі +4 °С; на 57 % за зберігання при температурі +12 °С; на 80 % — за дії температури +20 °С.

Отже, у результаті проведених досліджень показано вплив температури на збереженість *A. chroococcum* М-70 та *A. vinelandii* М-Х на насінні *Cucumis sativus*. Встановлено, що за температури від +4 °С до +28 °С цисти досліджуваних бактеріальних штамів краще зберігають життєздатність на насінні, ніж вегетативні клітини азотобактера; при цьому з підвищенням температури виживаність бактерій знижується. Досліджений комплекс хімічних речовин сприяє по-

довженню строків життєздатності клітин мікроорганізмів на насінні огірка.

1. А. с. 1459183 СССР, МКИ⁴ С 05 F 11/08, С 12 N 1/20, С 12 R 1:065). Штамм бактерій *Azotobacter vinelandii* для виробництва бактеріального добрива под кормову свеклу / Ю. М. Мочалов, В. І. Канівец. — № 4133167 / 31-13; заявл. 08.10.86.

2. А. с. 1459184 СССР, МКИ⁴ С 05 F 11/08, С 12 N 1/20 // (С 12 N 1/20, С 12 R 1:065). Штамм бактерій *Azotobacter chroococcum* для виробництва добрива азотобактерина под кормову свеклу и овощные культуры / Ю. М. Мочалов. — № 4085950 / 22-13; заявл. 02.07.86.

3. Козар С. Ф Вплив речовин різного хімічного складу на життєздатність діазотрофів на насінні сільськогосподарських культур / С. Ф. Козар, Т. А. Євтушенко, В. М. Нестеренко // Сільськогосподарська мікробіологія. — 2017. — Вип. 27. — С. 10–17.

4. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості: ДСТУ 4138-2002. — [Чинний від 2004-01-01]. — К. : Держспоживстандарт України, 2004. — 178 с.

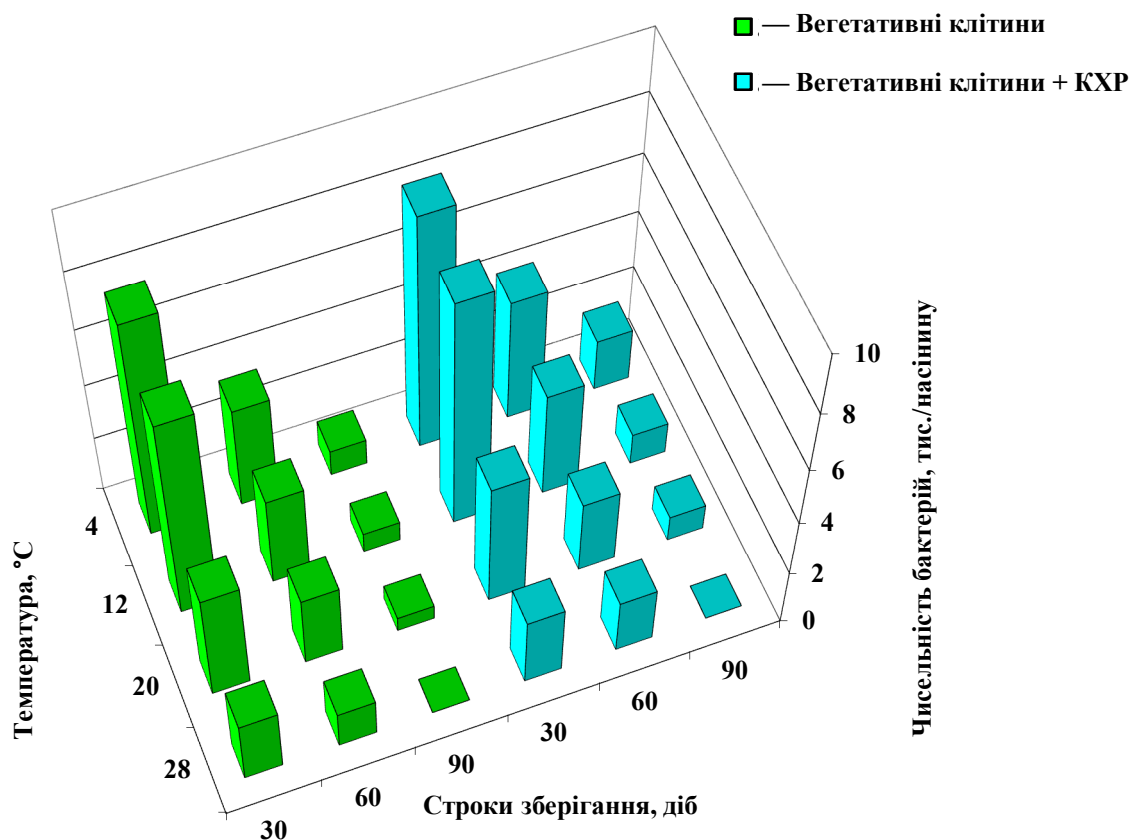


Рис. 4. Вплив температури на збереженість вегетативних клітин *A. vinelandii* М-Х на насінні огірка.

5. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги; [пер. с венг. под ред. Г. С. Муромцева]. — М. : Колос, 1983. — 296 с.

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

7. Хотянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе: методические рекомендации / А. В. Хотянович. — Ленинград, 1991. — 54 с.

8. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology / G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. — Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: Gammaproteobacteria. — Springer US, 2005. — 1106 p. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>.

9. Döbereiner J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* — *Azotobacter paspali* association // J. Döbereiner, J. M. Day, P. J. Dart. — Journal of General Microbiology. — 1972. — Vol. 71, № 1. — P. 103–116. <https://doi.org/10.1099/00221287-71-1-103>.

10. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii* / N. Funa, H. Ozawa, A. Hirata, S. Horinouchi // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2006. — Vol. 103, № 16. — P. 6356–6361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511227103>.

11. *Azotobacter vinelandii* aldehyde dehydrogenase regulated by 54: Role in alcohol catabolism and encystment / S. Gama-Castro, C. Núñez, D. Segura, S. Moreno, J. Guzmán, and G. Espín // Journal of Bacteriology. — 2001. — Vol. 183, № 21. — P. 6169–6174. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6169-6174.2001>.

12. Layne J. S. Natural factors involved in the induction of cyst formation in *Azotobacter* / J. S. Layne, E. J. Johnson // Journal of Bacteriology. — 1964. — Vol. 87, № 3. — P. 684–689.

13. Wyss O. Development and germination of the *Azotobacter* cyst / O. Wyss, M. G. Neumann, M. D. Socolofsky // Journal of Biophysical and Biochemical Cytology. — 1961. — Vol. 10, № 4. — P. 555–565.

СОХРАННОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOTOBACTER* НА СЕМЕНАХ *CUCUMIS SATIVUS* L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУР

О. М. Белокопская, С. Ф. Козар,
Т. А. Евтушенко, Т. О. Усманова

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Представлены результаты исследований влияния температуры на сохранность клеток *Azotobacter chroococcum* M-70 и *Azotobacter vinelandii* M-X на семенах *Cucumis sativus* L. Через три месяца количество бактериальных клеток на семенах, хранящихся при температуре +4 °С, было существенно больше показателей варианта с хранением семян при температуре 28 °С. Цисты азотобактера лучше сохранялись на семенах, чем вегетативные клетки. Для повышения жизнеспособности клеток бактерий на семенах предложено использовать комплекс химических веществ, который обеспечивал

PRESERVATION OF *AZOTOBACTER* ON *CUCUMIS SATIVUS* L. SEEDS UNDER DIFFERENT TEMPERATURES

О. М. Bilokonska, S. F. Kozar,
Т. А. Yevtushenko, Т. О. Usmanova

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

The results of studies on the effect of temperature on the preservation of *Azotobacter chroococcum* M-70 and *Azotobacter vinelandii* M-X cells on the seeds of *Cucumis sativus* L. are presented. In three months, the number of bacterial cells on the seeds, which were kept at +4 °C, was significantly higher than the parameters of the storage of seeds at +28 °C. *Azotobacter* cysts were preserved better than vegetative cells. To increase the viability of bacterial cells on the seeds, it is proposed to use a complex of chemical substances that provides better survival of both vegetative cells and *Azotobacter* cysts. The results of the studies can be

лучшую выживаемость как вегетативных клеток, так и цист азотобактера. Полученные результаты исследований могут быть использованы для разработки новых способов повышения жизнеспособности полезных почвенных микроорганизмов на семенах сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, цисты, температура, комплекс химических веществ, сохранность, жизнеспособность.

used to develop new ways to improve the viability of useful soil microorganisms on seeds of agricultural crops.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, cysts, temperature, complex of chemical substances, preservation, viability.

Отримано 23.05.2018