УДК 579.841.2:[577.152.1:544.478.1]:66.08

Курдиш І.К., Герасименко І.О.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ *AZOTOBACTER VINELANDII* IMB B-7076

***Мета**. На фізіолого-біохімічну активність бактерій, що входять до складу мікробних препаратів для рослинництва, може впливати ряд чинників. Метою роботи було дослідження впливу деяких фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність Azotobacter vinelandii IMB B-7076 − компонента комплексного бактеріального препарату Азогран. **Методи.** В роботі застосовувались мікробіологічні, біохімічні та статистичні методи досліджень. Бактерії вирощували в умовах періодичного культивування. Дегідрогеназну активність визначали методом відновлення безбарвної солі 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду (ТТХ) в червону сполуку трифенілформазан (ТФФ) в анаеробних умовах. **Результати**. Встановлено, що дегідрогеназна активність A. vinelandii IMB B-7076 досягає максимальних значень за температури культивування 28°С в середовищі, що містить 10 г/л глюкози і має pH 9,0. Внесення в середовище іонів кальцію і магнію за певних концентрацій стимулювало дегідрогеназну активність досліджуваних бактерій, а іони заліза, навпаки, інгібували активність бактерій навіть в найменших дозах. **Висновки.** Визначена залежність дегідрогеназної активності бактерій A. vinelandii IMB B-7076 від ряду фізико-хімічних факторів середовища. Це розширює уявлення про властивості даних бактерій і дозволяє в певній мірі прогнозувати перспективність застосування препарату Азогран в різних агроекосистемах.*

Ключові слова: Azotobacter vinelandii IMB B-7076, дегідрогеназна активність, фізико-хімічні фактори.

Фукціональна активність мікроорганізмів у природних умовах в значній мірі визначається їх ферментними системами, серед яких важлива роль належить дегідрогеназному комплексу. Ці ферменти визначають метаболічний статус мікроорганізмів [15].

Дегідрогенази відносяться до класу ферментів оксидоредуктаз [5,10]. Вони функціонують внутрішньоклітинно в аеробних і анаеробних мікроорганізмах і відіграють важливу роль в окисно-відновних реакціях, в процесі яких відбувається перенесення водню від органічних сполук до акцепторів [16]. Роль останніх виконують нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) чи нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат (НАДФ) або флавінаденіндинуклеотид (ФАД) чи флавінмононуклеотид (ФМН) [5, 14].

Дегідрогеназна активність мікроорганізмів залежить від значної кількості фізико-хімічних факторів [1,9,11,12]. Попередніми нашими дослідженнями було встановлено, що ці фактори спричиняють значний вплив на дегідрогеназну активність фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7023 [1,2], які, поряд з азотфіксувальними бактеріями *Azo-*

© Курдиш І.К., Герасименко І.О., 2017

tobacter vinelandii IMB B-7076, є компонентами створеного нами високоефективного комплексного препарату Азогран [3].

Метою даної роботи є дослідження впливу ряду фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076.

Матеріали і методи. Об′єктом дослідження був високоефективний штам азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 [8], що входить до складу комплексного бактеріального препарату Азогран для рослинництва [3]. Бактерії культивували в 750 мл колбах Ерленмейера, що містили по 100 мл живильного середовища Берка з глюкозою (10 г/л) [2, 7], при 28^0C і перемішуванні (240 об/хв.) протягом 24 годин. Клітини бактерій з отриманої суспензії *A. vinelandii* осаджували на центрифузі ОПН-8 при 5000g протягом 25 хв. Отриманий осад клітин ресуспендували в К-фосфатному буфері, pH 7,1. Готували суспензії *A. vinelandii* оптичною густиною 1,5 од., визначаючи її на фотоколориметрі КФК-2МП за довжини оптичного шляху 5 мм при λ=540 нм.

Дегідрогеназну активність азотобактера визначали, застосовуючи метод відновлення безбарвної солі 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду (ТТХ) в червону сполуку трифенілформазан (ТФФ) в анаеробних умовах [6] з наступною екстракцією останнього етиловим спиртом. Для цього в пробірки Тунберга вносили 2 мл бактеріальної суспензії, 1 мл 2% розчину глюкози, а у боковий відросток – 0,5 мл 1% розчину ТТХ. Після цього пробірки вакуумували, вміст бокового відростку переливали в головне відділення пробірки. Суміш інкубували протягом години за температури 28^oC, а при дослідженні її впливу на дегідрогеназну активність − в діапазоні температур 18−50^oC. Після цього в пробірки Тунберга додавали 5 мл 96% етанолу, вміст перемішували і залишали на 20 хв для екстракції формазану. Отриману суміш центрифугували 15 хв при 5000g. У супернатанті визначали оптичну густину формазану (ОГ) вищеописаним методом при λ=490 нм у кюветах 10 мм. Кількість ТФФ визначали за калібрувальною кривою [2]. Дегідрогеназну активність виражали у мг ТФФ/ $г^{-1}$ сухої біомаси· $год^{-1}$. Суху біомасу визначали ваговим методом [1].

Залежність дегідрогеназної активності від pH суспензії *A. vinelandii* визначали в фосфатному буфері, що мав pH 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 та 10,0. Розчини глюкози для реакційних сумішей також готували на основі зазначених буферів. В процесі дослідження впливу концентрації джерел вуглецю та енергії на дегідрогеназну активність вміст глюкози в реакційних сумішах задавали на рівні 1, 5, 10 і 20 г/л.

При визначенні впливу катіонів Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} на дегідрогеназну активність азотобактера використовували їх сульфати та хлориди. Усі розчини готували на основі тріс-HCl буфера pH 7,1. Після культивування бактерії двічі відмивали у вказаному розчині, готували суспензію з заданою оптичною густиною *A. vinelandii* – 1,5 од. В пробірки Тунберга вносили по 2 мл отриманої суспензії, додавали по 1 мл розчинів солей певних концентрацій та по 1 мл 0,2М розчину глюкози, а у боковий відросток – 0,5 мл 1% розчину ТТХ. Дегідрогеназну активність визначали за вищеописаною методикою. Результати досліджень підлягали статистичній обробці, визначаючи довірчий інтервал середніх показників з ймовірність 95% [4].

Результати досліджень. На дегідрогеназну активність бактерій *A. vinelandii* IMB B-7076 значний вплив спричиняла температура їх культивування. Найвищих значень ця активність досягала за інкубації даних бактерій при температурі 28 і 37°С (рис. 1). За температури 18°С відбувалось її зниження на 48%, а при підвищенні до 50°С дегідрогеназна активність знижувалась на 54% у порівнянні з показниками, отриманими при 28°С.

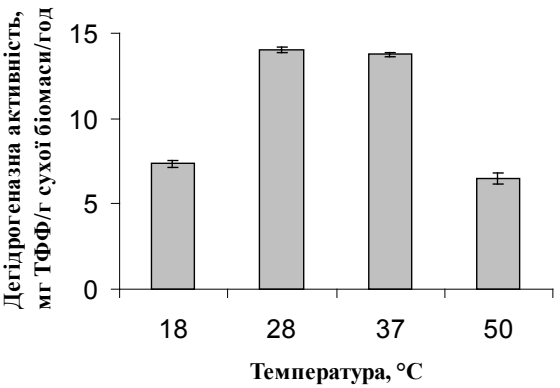

Рис. 1. Вплив температури на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076

Виявлено, що *A. vinelandii* IMB B-7076 характеризується найвищою дегідрогеназною активністю в середовищі, що мало pH 9,0. Дещо нижчими були її показники при pH 8,0 (рис. 2). Однак за pH 7,0 і 6,0 дегідрогеназна активність цих бактерій знижувалась на 33,2 та 98,4% відповідно. За підвищення pH до 10,0 також відбувалось зниження активності на 33 %. Таким чином, оптимальне значення pH для дегідрогеназної активності *A. vinelandii* виявилось у межах 8,0 – 9,0.

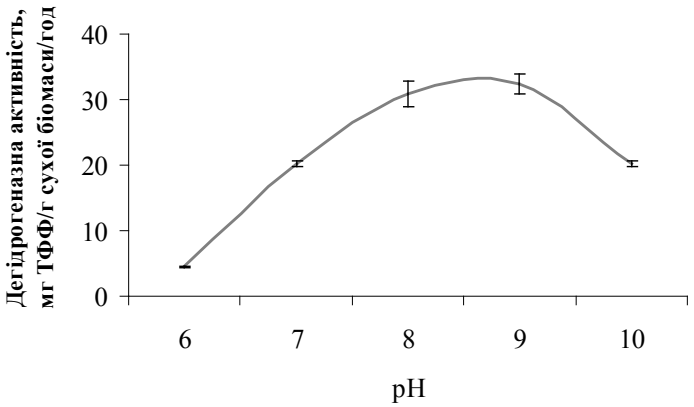

Рис.2. Залежність дегідрогеназної активності *A. vinelandii* IMB B-7076 від pH середовища

Значний вплив на дегідрогеназну активність азотобактера спричиняла наявність глюкози в реакційній суміші. Найвищі показники дегідрогеназної активності цих бактерій спостерігались за її концентрації 10 г/л (табл.1). При зниженні вмісту глюкози до 5 і 1 г/л відбувалось зниження

цієї активності на 12,4 і 26,8% відповідно. За підвищення концентрації глюкози до 20 г/л дегідрогеназна активність знижувалась на 11,4%.

Таблиця 1

Залежність дегідрогеназної активності *A. vinelandii* IMB B-7076 від концентрації глюкози, мг ТФФ/г сухої біомаси·год$^{-1}$

Вид бактерії	Концентрація глюкози, г/л			
	1	5	10	20
A. vinelandii IMB B-7076	14,7 ± 0,3	17,6 ± 0,1	20,08 ± 0,1	17,8 ± 0,1

Нами досліджено вплив іонів Mg^{2+} (у формі $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076 (рис.3). Встановлено, що внесення в реакційне середовище цього катіону спричиняло незначний вплив на вказану активність бактерій. Найвищих значень дегідрогеназна активність досягала за вмісту в реакційній суміші 1 ммоль Mg^{2+}. В той же час за вищого та нижчого його вмісту стимулювальна дія даного катіону на дегідрогеназну активність азотобактера знижувалась, а при 10 ммоль цього катіону в реакційній суміші відбувалось її інгібування у порівнянні з контролем на 10% (рис.3).

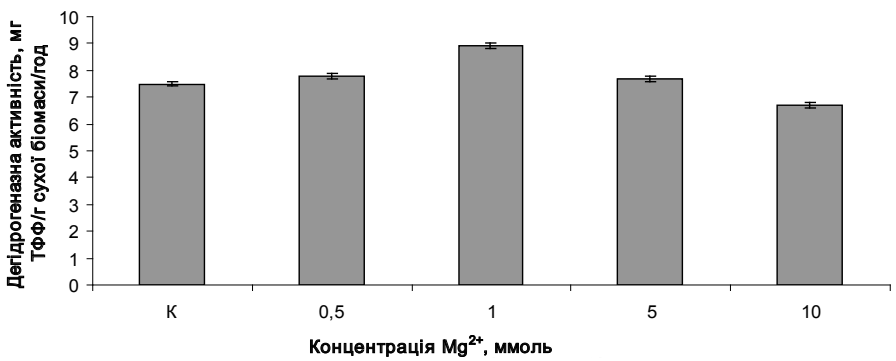

Рис. 3. Залежність дегідрогеназної активності *A. vinelandii* від вмісту в середовищі іонів магнію (в формі $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

В той же час катіони Mg^{2+} у формі хлориду помітніше впливали на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076 (рис.4). Найбільша стимулювальна дія цього іону спостерігалась за його концентрації 5 ммоль, за якої дегідрогеназна активність цих бактерій відносно контролю зростала на 48%. За зниження вмісту Mg^{2+} в реакційній суміші чи його підвищення стимулювальна дія знижувалась.

Певний стимулювальний вплив на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076 спричиняло внесення в реакційне середовище катіонів Ca^{2+} у вигляді хлориду. За його концентрації 0,025 − 1,0 ммоль показник цієї активності незначно зростав (рис. 5). В той же час за підвищення вмісту $CaCl_2$ до 10 ммоль цей показник знижувався відносно контролю майже на 20% .

Встановлено, що за культивування *A. vinelandii* в середовищі, яке міс-

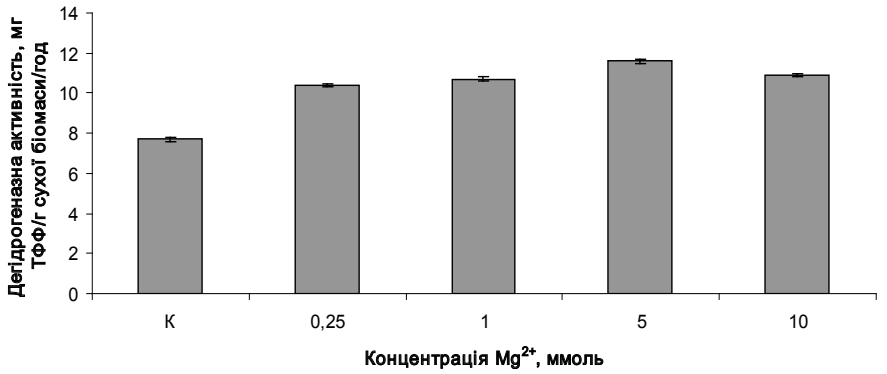

Рис. 4. Вплив іонів магнію у складі $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076

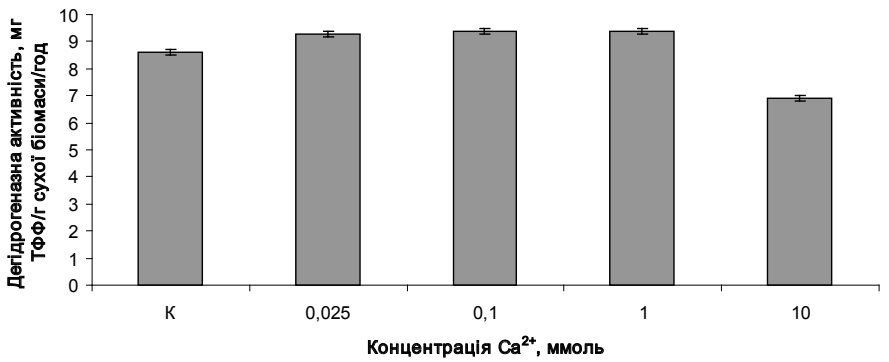

Рис. 5. Вплив іонів кальцію на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076

тило іони Fe^{2+} у вигляді $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, відбувалось пригнічення дегідрогеназнної активності (рис. 6). Навіть за концентрації 0,25 мкмоль цього катіону спостерігалось зниження даної активності на 3% у порівнянні з контролем. При вмісті катіону Fe^{2+} 25 мкмоль дегідрогеназна активність азотобактера знижувалась на 18%.

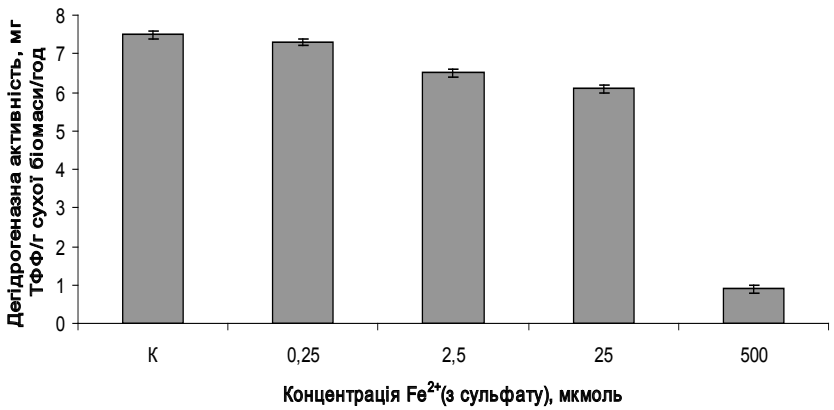

Рис. 6. Вплив іонів Fe^{2+} у складі $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076

Слід відмітити, що катіони тривалентного заліза (Fe^{3+} в формі хлориду) в меншій мірі пригнічували дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076 (рис.7). Так, за концентрацій 0,025 і 0,25 мкмоль Fe^{3+} в реакційному середовищі ферментативна активність залишається на рівні контролю, а за концентрацій 2,5 і 25 мкмоль відбувається певне зниження дегідрогеназної активності (рис. 7).

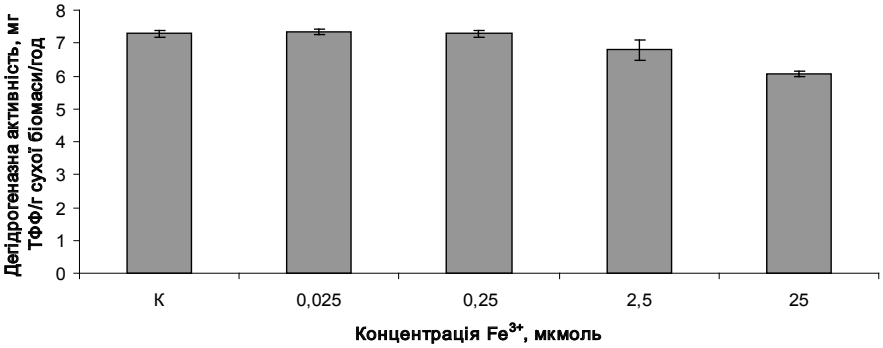

Рис. 7. Вплив іонів Fe^{3+} у складі $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ на дегідрогеназну активність *A. vinelandii* IMB B-7076

Обговорення результатів. Дегідрогеназна активність мікроорганізмів відіграє важливу роль в енергетичних процесах живих клітин [5]. В ґрунтах та інших еконішах вона використовується в якості аналітичного показника кількості і активності мікроорганізмів [13]. Дослідження впливу фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність бактерій-компонентів комплексного препарату Азогран для рослинництва є необхідним етапом, що дозволить прогнозувати їх потенціал за дії певних факторів середовища при інтродукції цих бактерій в агроекосистему.

Нами встановлено, що максимальні показники дегідрогеназної активності *A. vinelandii* IMB B-7076 досягаються при 28°C – температурі, оптимальній для росту цього штаму. В попередніх дослідженнях було показано, що оптимальна температура для дегідрогеназної активності *Bacillus subtilis* IMB B-7023, що також є компонентом даного бактеріального препарату [1], становить 37°C, що не співпадає з температурним оптимумом для росту цих бактерій.

Найвищі показники дегідрогеназної активності *A. vinelandii* IMB B-7076 спостерігались при pH 9,0, що значно перевищує показники pH-оптимуму для росту, але входить до діапазону pH, за яких здатен рости даний мікроорганізм. В той же час встановлено, що оптимальним значенням кислотності середовища для дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 є pH 7,0 [1]. Це корелює з його оптимумом для росту.

Встановлено, що, як для *A. vinelandii* IMB B-7076, так і для *B. subtilis* IMB B-7023, найвищі показники дегідрогеназної активності визначались за вмісту в реакційному середовищі 10 г/л глюкози. Такі її концентрації забезпечують інтенсивний ріст вказаних штамів.

Внесення в реакційне середовище солей кальцію та магнію за певних концентрацій стимулювало дегідрогеназну активність обох штамів-компонентів комплексного бактеріального препарату Азогран. В той же час

катіони, як двохвалентного, так і тривалентного заліза, інгібували активність бактерій навіть за його вмісту 0,25 мкмоль.

Таким чином, визначена залежність дегідрогеназної активності бактерій *A. vinelandii* ІМВ В-7076 від ряду фізико-хімічних факторів середовища. Отримані результати розширюють наші уявлення про властивості даних бактерій і дозволяють в певній мірі прогнозувати перспективність застосування препарату Азогран в різних агроекосистемах. В ґрунтових умовах показники pH і, особливо, температури, як правило, суттєво відрізняються від їх значень, оптимальних для дегідрогеназної активності вказаного штаму азотобактера і фосфатмобілізувальних бактерій *B. subtilis* ІМВ В-7023. Ймовірно, що бактерії-компоненти препарату Азогран, не дивлячись на те, що їх застосування в агроекосистемах підвищує урожайність рослин на 16-37% [3], ще не в повній мірі реалізують свій рістстимулювальний потенціал при їх використанні в рослинництві за дії фізико-хімічних факторів середовища.

Курдиш И.К., Герасименко И.А.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *AZOTOBACTER VINELANDII* ИМВ В-7076

Резюме

Цель. На физиолого-биохимическую активность бактерий, входящих в состав микробных препаратов для растениеводства, может воздействовать ряд факторов. Целью работы было исследование влияния некоторых физико-химических факторов на дегидрогеназную активность *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 − компонента комплексного бактериального препарата Азогран. **Методы.** В работе применяли микробиологические, биохимические и статистические методы исследования. Дегидрогеназную активность определяли, используя метод восстановления неокрашенной соли 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) в соединение красного цвета трифенилформазан (ТФФ) в анаэробных условиях. **Результаты.** Установлено, что дегидрогеназная активность *A. vinelandii* ИМВ В-7076 достигает максимальных значений при температуре культивирования 28°С в среде, содержащей 10 г/л глюкозы при pH 9,0. Внесение в среду определенных концентраций ионов кальция и магния стимулировало дегидрогеназную активность исследованных бактерий, тогда как ионы железа ингибировали эту активность. **Выводы.** Определена зависимость дегидрогеназной активности бактерий *A. vinelandii* ИМВ В-7076 от ряда физико-химических факторов среды. Это расширяет наши представления о свойствах данных бактерий и позволяет в определенной степени прогнозировать перспективность применения препарата Азогран в разных агроэкосистемах.

Ключевые слова: *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076, дегидрогеназная активность, физико-химические факторы.

Ivan Kurdish, Iryna Gerasimenko

Department of Microbiological processes on solid surfaces,
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine;
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine

INFLUENCE OF PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON DEHYDROGENASE ACTIVITY OF *AZOTOBACTER VINELANDII IMB* B-7076

Summary

Aim. Different factors were influence on physiology-biochemical activity of bacteria – components microbial preparations for plant-growth. The aim of this work was to study the influence of different factors on dehydrogenase activity of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 – compound of the complex bacterial preparation Azogran. **Methods.** In this experimental work was used microbiological, biochemical, and statistical methods. Dehydrogenase activity was measured accordingly to the method is based on the reduction of 2.3.5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) to red-colored triphenyl formazan (TF) in anaerobic conditions. **Results.** It was established, that the dehydrogenase activity of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 reached its maximum value at cultivation in nutrient medium with 10 g/L of glucose, pH 9.0 and 28°C. It was shown, that at addition of the certain concentration of ions Ca^{2+} and Mg^{2+} into a nutrient medium the dehydrogenase activity of bacteria increased. However, ions Fe^{2+} inhibited this activity. **Conclusion.** It has been determined depending of dehydrogenase activity of *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 from different physico-chemical factors. It over under standing about properties this bacteria and help predict prognoses the perceptivity use of preparation Azogran in different agroecosystems.

Keywords: Azotobacter vinelandii IMV B-7076, dehydrogenase activity, physico-chemical factors

1. *Herasymenko I.O., Kurdish I.K.* Influence of physical-chemical factors on dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis* IMV B-7023//Microbiology & Biotechnology. 2014;4: 61-68.
2. *Herasimenko I.O., Kurdish I.K.* Influence of vermiculite and silicon dioxide on dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis* IMV B-7023 and *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 // Microbiol. J. 2015; 77(1): 9-13.
3. *Kurdish I.K.* [Introduction of microorganisms in agroecosystems]. Naukova dumka, Kyiv, 2010. 253 p. Ukrainian.
4. *Lakin G.F.* [Biometria]. – Moscow: High School, 1990. 351 p. Russian.
5. *Lenindger A.* [Biochemistry]. – Moscow: Mir, 1974. 956 p.Russian.
6. [Practical Book of Agrochemistry]. – Moscow: MNU, 2001. 689 p.Russian.
7. *Rubenchik, L.I.* Azotobacter and its application in agriculture. Kyiv, Academy of Science publishers USSR. 1960. 327 p.
8. Patent of Ukraine No.72856. Strain of bacteria *Azotobacter vinelandii* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing / *Kurdish I.K., Bega Z.T.* Published in 2006, bulletin No.8. Ukrainian.
9. *Haziev F.H.* [Methods of soil enzymology]. – Moscow: Nauka, 2005. 252 p. Russian.
10. *Gu Y.; Wag P. & Kong C.* Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soils influenced by allelophatic Rice variety. European Journal of Soil Biology. 2009; 45: 436-441.

11. *Nweke C.O., Alisi C.S., Okolo J.S., Nwanyanwu C.E.* Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment// Appl. Ecol. and Environm. Res.2008; 5(1): 123-132.
12. *Mathew M., Obbard J.P.* Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contamined with petroleum// Biotechnol. Lett.2001; 23: 227-230.
13. *Salazar, S.; Sanchez, L.; Alvarez, J.; Valverde, A.; Galindo, P.; Igual, J.; Peix, A. & SantaRegina, I.* Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. Ecological Engineering. 2011; 37: 1123-1131.
14. *Subhani A.; Changyong H.; Zhengmiao Y.; Min L. and El-ghamry A.* Impact of soil environment and agronomic practices on microbial dehydrogenase enzyme activity in soil. A Review. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2001; 4: 333-338.
15. *Watts D.B., Torbert H.A., Feng Y., Prior S.A.* Soil microbial community dynamics as influenced by composted dairy manure, soil properties, and landscape position. Soil Science. 2010;175: 474–486.
16. *Zhang, N.; He, X.; Gao, Y.; Li, Y.; Wang, H.; Ma, D.; Zhang, R. & Yang, S.* Pedogenic carbonate and soil dehydrogenase activity in response to soil organic matter in *Artemisia ordosica* community. Pedosphere. 2010; 2: 229-235.

Отримано 15.06.2016