

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ *AZOTOBACTER VINELANDII* *IMB B-7076* І *BACILLUS SUBTILIS* *IMB B-7023* В НАНОКОМПЗИТІ БЕНТОНІТУ

І.К. Курдиш, А.О. Рой, С.І.Войчук

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail:Kurdish@serv.imv.kiev.ua*

*Розробка високоефективних форм мікробних препаратів для рослинництва є актуальним завданням науки, що сприятиме подальшій біологізації землеробства і отриманню високоякісної продукції. **Мета роботи.** Дослідження впливу взаємодії штамів азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* *IMB B-7076* та фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* *IMB B-7023* з наночастками природного глинистого мінералу бентоніту на життєздатність клітин. **Методи.** Азотфіксувальні бактерії *A. vinelandii* *IMB B-7076* культивували в середовищі Ешбі, фосфатмобілізувальні бактерії *B. subtilis* *IMB B-7023* – в глюкозо-мінеральному середовищі. Виготовляли 10-20% нанокмпозит бентоніту, до якого додавали 10% суспензії чистих культур чи змішаної культури бактерій. Життєздатність штамів визначали після їх зберігання при кімнатній температурі протягом 1–6 місяців. Електронну мікроскопію бактерій проводили на трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1400 (Jeol, Японія). **Результати.** Взаємодія *A. vinelandii* *IMB B-7076* і *B. subtilis* *IMB B-7023* – компонентів комплексного бактеріального препарату, з наночастками 10 – 20% нанокмпозиту бентоніту значно підвищувала життєздатність цих бактерій. Після 6 місяців їх зберігання в 20% бентоніті кількість життєздатних клітин азотобактера знижувалась на 45%, а баціл – на 11,5%, тоді як у середовищі без наноматеріалу – більше, ніж на 2 порядки і в 2,2 рази відповідно. За бактеризації насіння пшениці нанокмпозитним комплексним бактеріальним препаратом суттєво зростала довжина паростків рослин. **Висновки.** Взаємодія *A. vinelandii* *IMB B-7076* і *B. subtilis* *IMB B-7023* з наночастками бентоніту значно підвищувала життєздатність цих штамів, що є передумовою для виготовлення нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату для рослинництва на основі даних бактерій.*

Ключові слова: A. vinelandii IMB B-7076, B. subtilis IMB B-7023, життєздатність бактерій, нанокмпозит бентоніту.

Застосування мікробних препаратів у рослинництві дозволяє в певній мірі корегувати біотичні процеси в агроєкосистемах [1], сприяє підвищенню їх продуктивності, отриманню якісної рослинної продукції [2–6]. Найбільш ефективними є комплексні мікробні препарати, створені на основі двох чи більшої кількості мікроорганізмів, що спричиняють різноспрямований позитивний вплив на ріст і розвиток рослин, їх захист від хвороб і шкідників [3,7,8]. Одним з них є комплексний бактеріальний препарат Азогран, створений на основі азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* *IMB B-7076* [9] і фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* *IMB B-7023* [10]. Азогран застосовується в рослинництві у вигляді культуральної рідини цих бактерій, гранульованого препарату на основі взаємодії даних штамів з частками глинистих мінералів чи сипкого

препарату, виготовленого за застосування часток спученого вермикуліту.

За зберігання суспензії бактерій чисельність життєздатних клітин в ній швидко знижується, в той час як в гранульованій та сипкій препаративних формах Азогран є стабільним при тривалому зберіганні [3, 11]. Слід відмітити, що за передпосівної бактеризації насіння рослин мікробними препаратами доцільно використовувати прилипач, застосування якого помітно підвищує кількість адгезованих бактерій на зерновій поверхні. Нами показано, що одним з кращих прилипачів може бути 10-20% наноккомпозит бентоніту [12]. Його застосування в процесі бактеризації насіння значно підвищувало кількість адгезованих на ньому клітин та сприяло виживанню бактерій на зерні при тривалому зберіганні.

Метою роботи було дослідження впливу взаємодії азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 з наночастками природного глинистого мінералу бентоніту на життєздатність клітин для визначення перспективності застосування такого підходу в процесі створення нової наноккомпозитної форми комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були азотфіксувальні бактерії *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 [7] та фосфатмобілізувальні бактерії *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 [8]. Бактерії *A. vinelandii* ІМВ В-7076 культивували протягом 3 діб при 28⁰ С на качалках (220 об/хв) в 750 мл колбах Ерленмейера в 100 мл середовища Ешбі [13]. Бактерії *B. subtilis* ІМВ В-7023 вирощували протягом двох діб при 28⁰С в подібних умовах в глюкозо-мінеральному середовищі [14].

Для виготовлення наноккомпозиту використовували бентоніт Дашуківського родовища глинистих мінералів. Бентоніт є сумішшю природних глинистих мінералів монтморилоніту і палигорськіту [15]. Для виготовлення наноккомпозиту бентоніту в фізіологічний розчин вносили різні масові долі цього мінералу (10, 15 чи 20%). Суміш перемішували на гомогенізаторі MPW-302 (Польща) при максимальній кількості обертів протягом 5 хвилин, а потім піддавали обробці на ультразвуковому дезінтеграторі Jachpan ultrasonic desintegrator type UD - 20 (Польща) впродовж 4 хв [3]. Отриманий наноккомпозит розливали у флакони об'ємом 200 мл, створюючи в них шар композиту різної товщини (10, 50, 100 мм), що повинно було забезпечувати різний ступінь надходження кисню в рідку фазу. До підготовленого наноккомпозиту додавали 10% (об'ємних) суспензії окремих штамів чи їх змішаної (1:1) суспензії. В контрольні флакони вносили відповідні об'єми фізіологічного розчину. Флакони стерилізували двічі при 1,5 атмосфери, а потім в них вносили 10% суспензії бактерій, ретельно перемішували і зберігали в статичних умовах при кімнатній температурі.

Чисельність життєздатних клітин азотобактера чи бацил на початку зберігання та через 1 – 6 місяців визначали після ретельного перемішування вмісту флаконів. Для цього 1 мл наноккомпозитного комплексного препарату чи суспензії бактерій суспендували в 90 мл фізіологічного розчину, струшували протягом 30 хвилин на лабораторному шейкері, готували серійні десятикратні розведення і висівали на агаризоване середовище

Ешбі (для *A. vinelandii*) чи на картопляний агар (для *B. subtilis*). Після культивування посівів при температурі 28⁰С проводили підрахунок колоній, що виростили на поверхні середовищ.

Для вивчення впливу обробки насіння нанокompозитним препаратом на його схожість нестерильне бактеризоване насіння розкладали для пророщування в чашки Петрі по 50 штук на зволожений фільтрувальний папір. Насіння пророщували 6 – 8 діб згідно ДСТУ [16], після чого визначали середні біометричні показники проростків.

Електронно-мікроскопічні дослідження виконували на трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1400 (Jeol, Японія). Всі дослідження проводились в трьох незалежних повторях не менше 3 разів. Результати досліджень обробляли з використанням методів варіаційної статистики [17].

Результати. Взаємодія бактерій з наночастками бентоніту спричиняла значний позитивний вплив на життєздатність *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076. За зберігання даних бактерій у фізіологічному розчині (контроль) протягом 3 місяців, товщина шару якого становила 10 мм, чисельність життєздатних клітин азотобактера знижувалась більш, ніж на 2 порядки, а після зберігання протягом 6 місяців цей показник знижувався майже на 3 порядки у порівнянні з їх кількістю на початку експерименту (табл.1). В той же час за зберігання цих бактерій в нанокompозиті бентоніту товщиною шару 10 мм протягом 3 і 6 місяців чисельність життєздатних клітин досягала 71% та 15,3% відповідно від їх показників на початку експерименту.

Ще більш помітне виживання азотобактера спостерігали при зберіганні в нанокompозиті за товщини його шару 50 та 100 мм. Після зберігання цих бактерій в нанокompозиті товщиною шару 100 мм протягом 3 місяців життєздатними залишалось 76,7%, а після 6 місяців зберігання в таких умовах – 56,2% від їх кількості на початку експерименту.

Таким чином, за зберігання *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 у фізіологічному розчині чисельність життєздатних клітин значно знижувалась при збільшенні доступу кисню (за меншої товщини шару суспензії) та терміну зберігання. В той же час в нанокompозиті бентоніту життєздатність азотобактера знижувалась менш помітно. Після 6 місяців зберігання бактерій в нанокompозиті товщиною 100 мм цей показник у порівнянні до кількості бактерій на початку зберігання знижувався лише на 43,8%. Це обумовлено формуванням на поверхні клітин азотобактера шару наночасток бентоніту, що розміщені в полісахаридній капсулі бактерій (рис.1).

Встановлено, що при зберіганні *B. subtilis* ІМВ В-7023 протягом 6 місяців за відсутності наночасток у фізіологічному розчині товщиною шару 10 мм кількість життєздатних бактерій знижувалась майже на 69 %, а за товщини шару такої суспензії 100 мм – на 54%. В той же час за їх зберігання протягом такого ж терміну в нанокompозиті 10% бентоніту товщиною шару 10 мм цей показник знижувався значно менше – на 40% (табл.2), а в нанокompозиті товщиною шару 100 мм протягом 6 місяців зберігання чисельність життєздатних бацил знижувалась лише на 15%. Таким чином, виживання бактерій *B.subtilis* ІМВ В-7023, як і *A. vinelandii* ІМВ В-7076 значно зросло в нанокompозиті 10% бентоніту за збільшення товщини його шару до 100 мм.

Таблиця 1
Чисельність життєздатних клітин *Azotobacter vinelandii* IMB B-7076 (кл/мл) при зберіганні у фізіологічному розчині (контроль) та в 10 % нанокмпозиті бентоніту в залежності від товщини його шару

Тривалість зберігання, місяці	Кількість життєздатних клітин в 1 мл фізіологічного розчину (контроль) та нанокмпозиту за товщини шару					
	10 мм		50 мм		100 мм	
	контроль	нанокмпозит	контроль	нанокмпозит	контроль	нанокмпозит
0	$(7,1 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(7,2 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(7,6 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(7,4 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(7,3 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(7,3 \pm 0,5) \cdot 10^8$
1	$(9,0 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$(6,1 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^8$	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^8$
3	$(5,1 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(5,1 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(5,9 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(5,2 \pm 0,7) \cdot 10^8$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(5,6 \pm 0,4) \cdot 10^8$
6	$(7,8 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(8,4 \pm 0,8) \cdot 10^5$	$(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(4,1 \pm 0,6) \cdot 10^8$

Примітка: бактерії зберігали в стаціонарних умовах при кімнатній температурі.

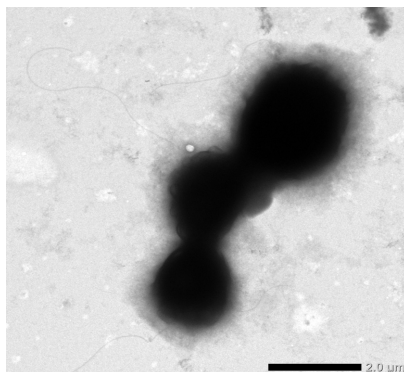


Рис. 1. *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 в нанокompозиті з наночастками бентоніту

Таблиця 2
Чисельність життєздатних клітин *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023
при зберіганні у фізіологічному розчині (контроль) та
10% нанокompозиті бентоніту за різної товщини його шару

Термін зберігання, місяці	Товщина шару 10 мм		Товщина шару 100 мм	
	контроль	нанокompозит	контроль	нанокompозит
0	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^8$
1	$(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(9,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^8$
3	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(7,2 \pm 0,5) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$
6	$(4,9 \pm 0,5) \cdot 10^7$	$(9,6 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$(6,9 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^8$

Примітка: бактерії зберігали в стаціонарних умовах при кімнатній температурі.

Життєздатність *B. subtilis* ІМВ В-7023 значно зростала при збільшенні вмісту наночасток бентоніту в композиті. Так, за зберігання *B. subtilis* ІМВ В-7023 протягом 3 місяців в 20% нанокompозиті за товщини шару 10 мм чисельність життєздатних бактерій знижувалась на 14,3%, а після 6 місяців зберігання – на 21,4%. Після зберігання цих бактерій в нанокompозиті, товщина шару якого досягала 100 мм, кількість життєздатних клітин була ще вищою. Після 6 місяців зберігання нанокompозиту їх чисельність складала 94% від показників на початку дослідження. Це свідчить про те, що зберігання *B. subtilis* ІМВ В-7023 в 10%, а особливо в 20% нанокompозиті бентоніту є ефективним засобом підвищення життєздатності бактерій при тривалому зберіганні їх суспензії (табл. 3).

Таблиця 3
Чисельність життєздатних клітин *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023
(кл/мл), при зберіганні у фізіологічному розчині (контроль) та
20% нанокompозиті бентоніту за різної товщини його шару

Час зберігання, місяць	Товщина шару 10 мм		Товщина шару 100 мм	
	Контроль	нанокompозит	контроль	нанокompозит
0	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$
1	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^8$
3	$(9,8 \pm 0,5) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$
6	$(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(9,6 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^8$

Примітка: бактерії зберігали в стаціонарних умовах при кімнатній температурі.

Досліджена життєздатність змішаної суспензії *A. vinelandii* IMB B-7076 та *B. subtilis* IMB B-7023 при їх зберіганні у фізіологічному розчині та 10 і 20% нанокompозиті бентоніту товщиною шару 10 і 100 мм (табл. 4). Встановлено, що після 3 місяців зберігання змішаної суспензії цих бактерій у фізіологічному розчині, товщина шару якого складала 10 мм, чисельність життєздатних клітин азотобактера становила 3,8%, а бацил – близько 82,4% від їх кількості на початку досліджу. Після 6 місяців зберігання змішаної культури у фізіологічному розчині чисельність життєздатних клітин азотобактера знижувалась до 2%, а кількість бацил – до 33,3% (табл.4). При зберіганні змішаної суспензії цих бактерій в нанокompозиті 10% бентоніту протягом 6 місяців кількість життєздатних клітин була вищою і становила для азотобактера 33,3%, а для бацили – 82,4%. При зберіганні протягом 6 місяців змішаної суспензії бактерій в 20% нанокompозиті чисельність життєздатних клітин азотобактера становила 54,0%, а бацили – 90,0%. Отримані результати свідчать про вищу життєздатність азотобактера при його зберіганні в змішаній культурі з бацилою.

Таблиця 4
Чисельність *A. vinelandii* IMB B-7076 (A) та *B. subtilis* IMB B-7023 (B), (кл/мл) у фізіологічному розчині та в нанокompозиті бентоніту в залежності від тривалості зберігання змішаної культури

Варіанти досліджу	Термін зберігання, місяці			
	0	1	3	6
10 мл фіз. р-ну (контроль)	A(5,0±0,1)·10 ⁷ B(5,1±0,1)·10 ⁷	(2,5±0,3)·10 ⁷ (4,6±0,2)·10 ⁷	(1,9±0,1)·10 ⁶ (4,2±0,2)·10 ⁷	(1,0±0,1)·10 ⁶ (1,7±0,3)·10 ⁷
10 мм 10% нанобентоніту	A(5,1±0,2)·10 ⁷ B(5,1±0,2)·10 ⁷	(4,3±0,2)·10 ⁷ (4,9±0,2)·10 ⁷	(4,0±0,1)·10 ⁷ (4,6±0,2)·10 ⁷	(1,7±0,2)·10 ⁷ (4,2±0,1)·10 ⁷
10 мм 20% нанобентоніту	A(5,0±0,2)·10 ⁷ B(5,0±0,3)·10 ⁷	(4,3±0,1)·10 ⁷ (4,9±0,1)·10 ⁷	(4,1±0,5)·10 ⁷ (4,6±0,2)·10 ⁷	(2,7±0,1)·10 ⁷ (4,5±0,2)·10 ⁷
100 мм фіз. р-у (контроль)	A(5,1±0,2)·10 ⁷ B(5,0±0,3)·10 ⁷	(3,6±0,4)·10 ⁷ (4,5±0,3)·10 ⁷	(9,2±0,1)·10 ⁶ (4,2±0,5)·10 ⁷	(1,9±0,1)·10 ⁶ (2,4±0,2)·10 ⁷
100 мм 10% нанобентоніту	A(4,9±0,1)·10 ⁷ B(5,2±0,3)·10 ⁷	(3,8±0,1)·10 ⁷ (5,0±0,2)·10 ⁷	(3,4±0,2)·10 ⁷ (4,7±0,3)·10 ⁷	(2,7±0,8)·10 ⁷ (4,6±0,2)·10 ⁷
100 мм 20% нанобентоніту	A(5,2±0,1)·10 ⁷ B(5,3±0,3)·10 ⁷	(4,7±0,1)·10 ⁷ (5,2±0,3)·10 ⁷	(4,2±0,2)·10 ⁷ (5,1±0,1)·10 ⁷	(3,0±0,1)·10 ⁷ (5,0±0,2)·10 ⁷

Більш високі показники життєздатності бактерій спостерігали при зберіганні їх змішаної суспензії в 100 мм шарі фізіологічного розчину чи нанокompозиту. Так, після 3 місяців зберігання у фізіологічному розчині чисельність життєздатних клітин азотобактера становила 18%, а після 6 місяців – 3,7%. Кількість життєздатних клітин бацил в даних умовах зберігання складала 84,0% та 48% відповідно від їх чисельності на початку досліджу.

За зберігання змішаної суспензії цих бактерій в 10% нанокompозиті протягом 3 місяців чисельність азотобактера знижувалась значно менше і складала 69,4% , бацил – 90,4%, а після 6 місяців – до 55,1% та 88,5% відповідно. Після зберігання такої суспензії протягом 3 місяців у 20% нанокompозиті бентоніту чисельність життєздатних клітин *A. vinelandii* IMB

В-7076 складала 80,8%, *B. subtilis* ІМВ В-7023 – 96,2%, а після 6 місяців зберігання – 57,7% та 94,3% відповідно.

Встановлено, що бактеризація насіння пшениці сорту Почеретянка 2015 як змішаною суспензією цих штамів, так і нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом незначно підвищувала показники його проростання та схожості (табл.5). В той же час, за обробки насіння нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом, що зберігався протягом 1 місяця, довжина паростків була на 47,3% більшою у порівнянні до контролю (обробка водою) і на 21,2% більшою, ніж за бактеризації змішаною суспензією цих штамів. Менш помітний стимулювальний вплив спричиняла обробка насіння нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом на довжину коріння цих рослин.

Обговорення. Результати досліджень свідчать про те, що зберігання *A. vinelandii* ІМВ В-7076 і *B. subtilis* ІМВ В-7023 в 10 - 20% нанокompозиті бентоніту є ефективним засобом підвищення життєздатності бактерій при їх тривалому зберіганні. Зі збільшенням товщини шару нанокompозиту спостерігалось підвищення життєздатності досліджуваних бактерій. Так, після 6 місяців зберігання азотобактера його чисельність в нанокompозиті становила 33 – 55% (10 мм товщина шару) та 54,3 – 57,7 % (100 мм), а *B. subtilis* ІМВ В-7023 – 82,4% – 90,0% (10 мм) та 90,0 – 94,3% (100 мм) відповідно.

Це обумовлено контактною взаємодією даних бактерій з наночастками бентоніту, в процесі якої поверхня клітин покривається наночастками даного мінералу, які захищають бактерії від негативної дії кисню. Подібний захисний вплив наночасток природних мінералів від негативного впливу кисню спостерігався за зберігання суспензії метанотрофних бактерій, а також інших мікроорганізмів [18].

Відомо, що за бактеризації насіння рослин суспензіями бактерій вони адгезуються незадовільно. Для покращення їх прикріплення застосовують різні прилипачі: патоку, мелясу, карбоксиметилцелюлозу, альгінат та інші субстанції [19 – 22], які можуть бути вартісними та не завжди забезпечують отримання хороших результатів.

Нами було показано, що застосування як прилипача 10-20% нанокompозиту бентоніту для бактеризації насіння рослин клітинами *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 – компонентами препарату Азогран, суттєво підвищувало їх чисельність на насінні досліджених рослин. Оброблене таким способом насіння мало вищу схожість. Рослини, що розвивались з насіння, бактеризованого нанокompозитним препаратом, формували довше коріння, більш високу надземну та загальну масу [23]. Використання мікроорганізмів, що входять до складу комплексного бактеріального препарату, з наночастками бентоніту для бактеризації насіння сільськогосподарських культур суттєво підвищує життєздатність *A. vinelandii* ІМВ В-7076 і *B. subtilis* ІМВ В-7023 на поверхні насіння при зберіганні, що дає змогу обробляти його за 7 – 9 діб до посіву [23]. Бактеризація насіння пшениці нанокompозитним комплексним бактеріальним препаратом сприяла значному підвищенню довжини паростків рослин.

Таблиця 5
Вплив змішаної культури *A. vinelandii* IMV В-7076 та *B. subtilis* IMV В-7023, нанокмпозитного комплексного бактеріального препарату після 1 місяця зберігання на насінні ярої пшениці Почерянка 2015

Варіанти досліджу	Проростання насіння		Схожість насіння		Довжина паростка		Довжина кореня	
	шт.	%	шт.	%	мм	%	мм	%
1. Насіння, оброблене водою	45,7±1,5	100,0	43,7±0,4	100,0	94,8±6,0	100,0	122,6±7,1	100,0
2. Насіння, оброблене змішаною культурою бактерій	46,3±0,4	101,3	46,0±0,5	103,5	110,1±0,8	116,1	160,2±22,8	130,7
3. Насіння, оброблене нанокмпозитом змішаної культури бактерій	47,3±0,4	103,5	46,7±1,2	106,9	139,6±4,2	147,3	164,0±10,5	133,7

Таким чином, взаємодія бактерій – компонентів препарату Азогран з наночастками бентоніту є передумовою створення високоефективного нанокompозитного комплексного бактеріального препарату для рослинництва.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *AZOTOBACTER VINELANDII* ИМВ В-7076 И *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023 В НАНОКОМПОЗИТЕ БЕНТОНИТА

И.К. Курдиш, А.А. Рой, С.И. Войчук

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

Резюме

Разработка высокоэффективных форм микробных препаратов для растениеводства является актуальной задачей науки, которая будет способствовать дальнейшей биологизации земледелия и получению высококачественной продукции. **Цель работы.** Исследование влияния взаимодействия штаммов азотфиксирующих бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 с наночастицами природного глинистого минерала бентонита на жизнеспособность клеток. **Методы.** Азотфиксирующие бактерии *A. vinelandii* ИМВ В-7076 культивировали в среде Эшби, фосфатмобилизирующие бактерии *B. subtilis* ИМВ В-7023 – в глюкозо-минеральной среде. Изготавливали 10-20% нанокompозит бентонита, к которому добавляли 10% суспензии чистых культур или смешанной культуры бактерий. Жизнеспособность штаммов определяли после их хранения при комнатной температуре в течение 1–6 месяцев. Электронную микроскопию бактерий проводили на трансмиссивном электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония). **Результаты.** Взаимодействие *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 – компонентов комплексного бактериального препарата, с наночастицами 10–20% нанокompозита бентонита значительно повышало жизнеспособность этих бактерий. После 6 месяцев их хранения в 20% бентоните количество жизнеспособных клеток азотобактера снижалась на 45%, а бацилл – на 11,5%, тогда как в среде без наноматериала – больше, чем на 2 порядка и в 2,2 раза, соответственно. При бактериализации семян пшеницы нанокompозитным комплексным бактериальным препаратом существенно возрастала длина ростков растений. **Выводы.** Взаимодействие *A. vinelandii* ИМВ В-7076 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 с наночастицами бентонита значительно повышало жизнеспособность этих штаммов, что является предпосылкой для изготовления нанокompозитного комплексного бактериального препарата для растениеводства на основе данных бактерий.

Ключевые слова: *A. vinelandii* ИМВ В-7076, *B. subtilis* ИМВ В-7023, жизнеспособность бактерий, нанокompозит бентонита.

VIABILITY OF *AZOTOBACTER VINELANDII* IMV B-7076 AND *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7023 IN NANOCOMPOSITE OF BENTONITE

I.K. Kurdish, A.O. Roy, S.I. Voychuk

Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

The elaboration of highly efficient forms of microbial preparations for plant production is an urgent task of science which will promote further biologization of agriculture and obtaining high quality products. **Purpose.** The investigation of the effect of the interaction between the strains of nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 and phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* IMV B-7023 with nanoparticles of natural clay mineral – bentonite, on the viability of cells. **Methods.** Nitrogen-fixing bacteria *A. vinelandii* IMV B-7076 were cultivated in the Ashby medium, and phosphate-mobilizing bacteria *B. subtilis* IMV B-7023 – in glucose-mineral medium. In manufactured 10–20 % nanocomposite of bentonite 10% suspension of pure culture or the mixed bacterial culture were added. The viability of strains was determined after keeping them at room temperature during 1 – 6 months. Electronic microscopy of bacteria was conducted with the transmission electronic microscope JEM-1400 (Jeol, Japan). **Results.** The interaction between *A. vinelandii* IMV B-7076 and *B. subtilis* IMV B-7023 – components of a complex bacterial preparation and nanoparticles of 10–20 % nanocomposite of bentonite enhanced the viability of these bacteria considerably. After six months of keeping them in 20 % bentonite, the number of viable *Azotobacter* cells decreased by 45 %, and of bacilli – by 11.5 %, whereas in the medium without nanomaterials – by over 2 orders and 2.2 times respectively. The inoculation of wheat seeds with the complex nanocomposite bacterial preparation led to a considerable prolongation of the length of sprouts. **Conclusions.** The interaction between *A. vinelandii* IMV B-7076 and *B. subtilis* IMV B-7023 and nanobentonite enhanced the viability of these strains considerably, which is a prerequisite for manufacturing the complex nanocomposite bacterial preparation for plant growing using these bacteria.

Keywords: *A. vinelandii* IMV B-7076, *B. subtilis* IMV B-7023, viability of bacteria, nanocomposite of bentonite.

1. Kurdish IK, Roy AO, Belogubova EN, Tserkovniak LS, Dyrenko ДІ. The interaction of bacteria-components of the preparation complex action with some plant species [Fundamental and applied aspects of research on symbiotic systems]. Saratov, 2007. p.11. Russian
2. Van Veen JA., van Overbeek LS., van Elsas JD. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 1997; 61(2): 121 – 135.
3. Kurdish IK. [Granulated Microbial Preparation for Plant-growing: Science and Practice]. Kyiv. 2001. KVITs. ISBN 966-7192-33-4. Russian. 141 p.
4. Kurdish IK. [Introduction of microorganisms in agroecosystems]. Naukova dumka. Kyiv, 2010. 253p. Ukrainian.
5. [Microbial preparations in agriculture. Theory and practice].. Ed. VV. Volkohon. Kyiv. Agrarian science. 2006. 311 p. Ukrainian.

6. [Bioregulation of microbial-plant systems] Ed. GO.Iutynska, SP. Ponomarenko. Kiyv. Nichlava, 2010. 462 p. Russian.
7. Kurdish IK., Roy AO., Titova LV. [Granulated preparations of complex action based on nitrogen-fixing and phosphate-mobilizing bacteria] // Agrarian education an the beginning of the third millennium. Materials of International scientific-practical conference, 2001 September 18–21; Lviv. 2001. p. 189 – 194. Ukrainian.
8. Kasem Soyong. [Research and development of microbial products for agriculture in Thailand, P.R. China and Vietnam]. Biological protection of plants is the basis of the stabilization of agroecosystems: Materials of the stientific-practical conference. Krasnodar, 28.09- 01.10.2004. Krasnodar; 2004. p. 82 – 84. Russian.
9. Patent of Ukraine № 72856. Strain of bacteria *Azotobacter vinelandii* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing. Kurdish IK, Bega ZT. Published in 2006. 8. Ukraine.
10. Patent of Ukraine № 54923A. [Strain of bacteria *Bacillus subtilis* for bacterial fertilizer obtaining for plant-growing]. Kurdish IK, Roy AO. Published 2003. 3. Ukraine.
11. Patent for invention № 106135. [Method for obtaining a free-flowing complex bacterial preparation for plant growing]. Kurdish IK., Roy AO. Published 2014. 14. Ukraine.
12. Patent of Ukraine No. 95376. Kurdish IK., Bega ZT. [The method of bacterization of plant seeds]. Published 2011. 14. Ukraine.
13. Rubenchik LI. [*Azotobacter* and its application in agriculture]. Kyiv. Academy of Science publishers USSR.1960. 327p. Russian.
14. Menkina RA.[Bacteria, mineralizing organic compounds of phosphorus]. Mikrobiologia. 1950; 19 (4):308-315. Russian.
15. Tarasevich YuI., Ovcharenko FD. [Adsorbtion on clay minerals]. Kyiv. Naukova dumka, 1975; 352 p. Russian.
16. DSTU 4138-2003 – Seeds of agricultural crops. State Committee of Ukraine for Technical Regulation and Consumer Policy. 2003. 173 p.
17. Lakin GF. Biometry. Moskow. Wysshaya shkola. 1990. 352 p. Russian
18. Kurdish IK., Kigel NF, Bortnik SF. [Stabilization of physiological activity of methanotroph *Methylomonas rubra* 15III under storage]. Microbiol. Z.1993; 55(4):37 – 43. Russian.
19. Kolombet LV., Zhygletsova SK., Derbyshev VV., Ezhov DV., Kosareva NI., Bystrova EV. Study of mycofungicide – a preparation for plant disease control based on *Trichoderma viride*. Applied biochemistry and microbiology. 2001; 37 (1): 98 – 102.
20. Patent of Ukraine №40548. [The method of pre-treatment of seeds of winter rye]. Nadkernichna EV, Lochova VI. 2001; 6. Ukraine.
21. [Recommendations on effective application of microbial preparations in technologies of cultivating agricultural crops]. Ed. VV. Volkohon. Kyiv: MAPU. NAASU, 2007. – 52 p. Ukrainian.
22. Pankaj Trived, Anita Pandey , LMS. Palni. Carrier-based Preparations of Plant Growth-promoting Bacterial Inoculants Suitable for use in Cooler Regions. World J. Microbiol. Biotechnol. 2005. 21(6):941-945. DOI:10.1007/s11274-004-6820
23. Bega ZT., Kurdish IK.[Influence of bentonite on plant seeds bacterization efficiency]. Microbiol. J. 2011; 73(4):54 – 61. Ukrainian.

Отримано 31.05.2019