

УДК 579:631.461

ОПТИМІЗАЦІЯ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ СУМІСНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* І *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

С. Ф. Козар

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: isgm@ukrpost.ua

Представлено результати досліджень з оптимізації живильного середовища для сумісного культивування діазотрофів *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* за періодичного культивування. Виявлено, що при вирощуванні цих мікроорганізмів у змішаній культурі чисельність бульбочкових бактерій може коливатися від 0,76 до 6,72 млрд. кл./см³ залежно від концентрації компонентів середовища. Показано, що ефект впливу меляси, кормових дріжджів і фосфатів на ростову активність *B. japonicum* залежить не лише від кількості хімічних сполук у середовищі, але й від штаму *A. brasilense*, з яким здійснюється культивування. За результатами багатофакторного експерименту запропоновано оптимізоване середовище для сумісного вирощування ризобій і азоспірил.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, культивування, середовище, оптимізація.

Перспективним є створення мікробних препаратів на основі змішаних культур діазотрофів, зокрема до складу яких входять бактерії *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* [1; 2]. Це обумовлено тим, що при сумісному культивуванні цих азотфіксаторів підвищується їх ростова активність, що сприяє отриманню високого титру мікроорганізмів у біопрепараті. Крім того, за передпосівної інокуляції насіння сої бульбочковими бактеріями разом з азоспірилами на корінні рослини утворюється більша, у порівнянні з монобактеризацією, кількість бульбочок і підвищується активність азотфіксації, що, у свою чергу, сприяє отриманню додаткового урожаю цієї зернобобової культури.

Важливим і непростим етапом розробки мікробних препаратів є оптимізація середовища для культивування мікроорганізмів, які є їх діючою основою. Особливо складним це завдання є при одночасному культивуванні двох і більше видів бактерій, які мають неоднакові потреби щодо джерел живлення [3]. При цьому слід забезпечувати як наявність специфічних компонентів середовища для кожного виду мікроорганізмів, так і особли-

вості можливої конкуренції за певні сполуки біогенних елементів.

Виходячи з вищенаведеного, метою досліджень була оптимізація складу рідкого живильного середовища для сумісного вирощування у періодичній культурі *B. japonicum* і *A. brasilense*.

Матеріали й методи. Об'єкти досліджень: *B. japonicum* М-8 [4], *A. brasilense* 18-2 [5], *A. brasilense* 410 [6]. Усі мікроорганізми отримані з Національної колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Висловлюємо щире вдячність авторам за люб'язно надані штами.

Чисельність *B. japonicum* визначали чашковим методом шляхом глибинного висіву суспензій в агаризоване середовище на основі горохового відвару [7]. Чисельність *A. brasilense* визначали чашковим методом в агаризованому середовищі такого складу, г/дм³: картопляний відвар — 1, яблучна кислота — 3,6, сахароза — 2,5; рН 7,2–7,4 (доведено розчином NaOH), агар-агар — 11 г.

Чашки Петрі витримували в термостаті за температури (28,0 ± 2,0) °С. Підрахунок

колоній *B. japonicum* здійснювали на десяту добу, *A. brasilense* — на четверту добу.

Культивування бактерій здійснювали в посудинах об'ємом 500 см³ на качалці з частотою обертів 240 об./хв. за температури (28,0 ± 2,0) °С. Посівний матеріал *B. japonicum* і *A. brasilense* вносили у співвідношенні 1:1. Тривалість культивування 72 год.

Оптимізацію середовища здійснювали, використовуючи алгоритм визначення ефектів впливу факторів, що змінюються, на процес сумісного культивування мікроорганізмів *Bradyrhizobium* і *Azospirillum*. Для цього на основі попередньо отриманих даних щодо впливу джерел біогенних елементів на ріст *B. japonicum* і *A. brasilense* проведено оптимізацію за допомогою симетричних планів, у яких всі фактори варіюються на однаковому числі рівнів. Оптимізацію проводили за допомогою методу ортогональних латинських прямокутників [8–10]. Критерієм оптимізації була чисельність життєздатних клітин бактерій.

Математичну обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу на кількість життєздатних клітин для всіх рівнів досліджуваних факторів. Ефект впливу різних рівнів розраховували за різницею середнього арифметичного значення виходу процесу (чисельність клітин) в усіх варіантах, де фактор перебував на даному рівні і середнього значення усіх серій дослідів згідно формул:

$$b_0 = \frac{\sum_{j=1}^N Y_j}{N}, \quad b_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^N Y_{ij}^k}{N/m} - b_0,$$

де b_0 — середнє арифметичне чисельності бактерій по всіх варіантах;

$\sum_{j=1}^N Y_j$ — сума чисельності бактерій по всіх варіантах дослідів;

b_{ik} — ефект кожного рівня;

y_i — вихід в i -му варіанті планування;

N — загальне число варіантів в плані;

m — число рівнів кожного фактора;

$\sum_{j=1}^N Y_{ij}^k$ — сума виходів у тих варіантах плану, де i -ий фактор перебував на k -му рівні.

Матрицю планування склали за схемою 3і3к (табл. 1), що дозволило вивчити в умовах одного експерименту взаємний вплив на ріст *B. japonicum* і *A. brasilense* трьох фак-

торів на трьох рівнях. За основу було обране середовище після першого етапу оптимізації, до складу якого входять: меляса, дріжджі кормові (сухі), глюкоза, (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, CaCO₃.

Таблиця 1. Схема планування експерименту при 3 факторах і 3 рівнях їх варіювання

Номер варіанту j	Рівні факторів k		
	Фактор i_1	Фактор i_2	Фактор i_3
1	1	1	1
2	2	1	2
3	3	1	3
4	1	2	2
5	2	2	3
6	3	2	1
7	1	3	3
8	2	3	1
9	3	3	2

Статистичну обробку експериментальних даних виконували за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Дослідження ростової активності *B. japonicum* і *A. brasilense* при культивуванні у змішаній культурі здійснювали у середовищі, до складу якого входили джерела різних біогенних елементів, вплив яких нами було вивчено на першому етапі його оптимізації [11]. На другому етапі задавали такі рівні компонентів середовища:

– меляса: 10,0; 15,0; 20,0 г/дм³ (крок — 5 г/дм³);

– кормові дріжджі: 3,0; 4,0; 5,0 г/дм³ (крок — 1 г/дм³);

– фосфати (1:1) (KH₂PO₄ + K₂HPO₄·3H₂O): 0,3; 0,4; 0,5 г/дм³ (крок — 0,1 г/дм³).

Аналізуючи отримані дані багатофакторного експерименту (табл. 2) слід відмітити, що чисельність бактерій *B. japonicum* М-8 при сумісному культивуванні з *A. brasilense* 18-2 коливалася від 1,68 до 6,61 млрд. кл./см³. Чисельність азоспірил при цьому коливалась у вужчому діапазоні: від 0,83 до 2,91 млрд. кл./см³. При отриманні інокулянту для сої слід орієнтуватися, в першу чергу, на титр ризобій, тому оптимальним у даному

Таблиця 2. Чисельність бактерій *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 18-2 у варіантах багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища, млрд. кл./см³

Варіанти дослідів	Концентрація компонентів середовища, г/дм ³			Чисельність бактерій <i>B. japonicum</i> М-8	Чисельність бактерій <i>A. brasilense</i> 18-2
	М'яса	Кормові дріжджі	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O + KH ₂ PO ₄ (1:1)		
1	10	3	0,3	2,57	1,37
2	15	3	0,4	2,27	1,03
3	20	3	0,5	5,91	2,67
4	10	4	0,4	5,25	2,77
5	15	4	0,5	3,73	2,91
6	20	4	0,3	6,72	2,63
7	10	5	0,5	1,92	1,25
8	15	5	0,3	6,61	2,45
9	20	5	0,4	1,68	0,83

випадку, на нашу думку, слід вважати середовище, яке представлено у варіанті 6.

Були вираховані ефекти впливу всіх факторів на їх рівнях на чисельність *B. japonicum* М-8, які сумісно культивували з *A. brasilense* 18-2. Виявлено, що максимальний ефект для м'яса по відношенню до бульбочкових бактерій отримано за її концентрації 20 г/дм³ (табл. 3), по відношенню до азоспірил — за концентрації 15 г/дм³ (табл. 4). Максимальні ефекти щодо впливу кормових дріжджів по відношенню до обох досліджуваних мікроорганізмів спостерігалися за використання концентрації компонента 4,0 г/дм³. При дослідженні впливу різного вмісту фосфорнокислих солей на ріст бульбочкових

Таблиця 3. Ефекти багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища для *B. japonicum* М-8

Компоненти середовища	Концентрація, г/дм ³	Ефект
М'яса	10,0	-0,82
	15,0	0,13
	20,0	0,69
Кормові дріжджі	3,0	-0,49
	4,0	1,16
	5,0	-0,67
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O + KH ₂ PO ₄ (1:1)	0,3	1,22
	0,4	-1,00
	0,5	-0,22

Таблиця 4. Ефекти багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища для *A. brasilense* 18-2

Компоненти середовища	Концентрація, г/дм ³	Ефект
М'яса	10,0	-0,19
	15,0	0,14
	20,0	0,05
Кормові дріжджі	3,0	-0,30
	4,0	0,78
	5,0	-0,48
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O + KH ₂ PO ₄ (1:1)	0,3	0,16
	0,4	-0,45
	0,5	0,28

бактерій найбільший ефект отримано за використання мінімальної концентрації цього компонента, а на ріст *A. brasilense* 18-2 — за використання концентрації 0,5 г/дм³.

Слід відмітити, що бактерії *B. japonicum* М-8 були більш чутливі до зміни концентрацій досліджуваних компонентів середовища у порівнянні з *A. brasilense* 18-2 при вирощуванні цих мікроорганізмів у змішаній культурі.

Чисельність бактерій *B. japonicum* М-8 при сумісному культивуванні з діазотрофами *A. brasilense* 410 коливалась від 0,76 до 3,20 млрд. кл./см³. Чисельність азоспірил при цьому коливалась у діапазоні від 0,70 до 3,34 млрд. кл./см³. Оптимальним у даному

випадку слід вважати середовище, до складу якого входить м'яса у концентрації 20 г/дм³, кормові дріжджі — 5 г/дм³, фосфати — 0,4 г/дм³ (табл. 5).

Таблиця 5. Чисельність бактерій *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 у варіантах багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища, млрд. кл./см³

Варіанти дослідів	Концентрація факторів оптимізації, г/дм ³			Чисельність бактерій <i>B. japonicum</i> М-8	Чисельність бактерій <i>A. brasilense</i> 410
	М'яса	Кормові дріжджі	К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О + КН ₂ РО ₄ (1:1)		
1	10	3	0,3	1,20	1,90
2	15	3	0,4	1,83	2,20
3	20	3	0,5	2,24	2,56
4	10	4	0,4	0,76	0,70
5	15	4	0,5	2,46	3,00
6	20	4	0,3	2,21	1,33
7	10	5	0,5	2,62	3,08
8	15	5	0,3	2,01	1,23
9	20	5	0,4	3,20	3,34

У дослідженнях впливу всіх факторів на чисельність *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410, культивованих сумісно, виявлено, що максимальний ефект м'яса по відношенню до досліджуваних мікроорганізмів спостерігався за її концентрації у живильному середовищі 20 г/дм³, що являє собою її максимальне досліджуване значення. При вивченні ефектів інших досліджуваних компонентів виявлено (табл. 6–7), що найбільший вплив на чисельність вирощуваних бактерій спостерігався за максимальних значень концент-

Таблиця 6. Ефекти багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища для *B. japonicum* М-8, млрд. кл./см³

Компоненти середовища	Концентрація, г/дм ³	Ефект
М'яса	10,0	-0,39
	15,0	0,18
	20,0	0,63
Кормові дріжджі	3,0	-0,16
	4,0	-0,11
	5,0	0,69
К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О + КН ₂ РО ₄ (1:1)	0,3	-0,11
	0,4	0,01
	0,5	0,52

Таблиця 7. Ефекти багатofакторного експерименту по оптимізації живильного середовища для *A. brasilense* 410, млрд. кл./см³

Компоненти середовища	Концентрація, г/дм ³	Ефект
М'яса	10,0	-0,11
	15,0	0,14
	20,0	0,41
Кормові дріжджі	3,0	0,22
	4,0	-0,32
	5,0	0,55
К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О + КН ₂ РО ₄ (1:1)	0,3	-0,51
	0,4	0,08
	0,5	0,88

рації цих компонентів — 5 г/дм³ кормових дріжджів і 0,5 г/дм³ суміші фосфорнокислих солей. Виходячи з цих даних, можна відмітити, що для досягнення максимального впливу на ріст бактерій *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 необхідні підвищені концентрації кормових дріжджів і фосфатів.

Отже, за результатами багатofакторного експерименту запропоновано оптимізоване середовище для сумісного вирощування ризобій і різних штамів азоспірил. Показано,

що ефект впливу меляси, кормових дріжджів і фосфатів на ростову активність *B. japonicum* залежить не тільки від кількості хімічних сполук у середовищі, але й від штаму *A. brasilense*, з яким здійснюється культивування.

1. Comparacion entre coinoculacion con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulacion de N en el cultivo de soja / [Benintende S., Uhrich W., Herrera M. et al.] // AgriScientia. — 2010. — Vol. 27, № 2. — P. 71–77.

2. Enhanced soybean biomass by co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and plant growth promoting rhizobacteria and its effects on microbial community structures / [Thi Thi Aung, Banha Buranabanyat, Pongdet Piromyou et al] // Afr. J. microbiol. res. — 2013. — Vol. 7 (29). — P. 3858–3873.

3. Паников Н. С. Кинетика роста микроорганизмов: Общие закономерности и экологические приложения / Н. С. Паников. — М. : Наука, 1992. — 311 с.

4. Пат. 39545 А Україна МПК6 C12N 1/20, C12R 1/41, C05F 11/08, A01N 63/00, A01P 21/00, A01C 1/06. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 Kirchner, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої / М. З. Толкачов, В. П. Патица, І. О. Каменєва, Л. Ю. Грігчина ; заявник і патентовласник: Південний філіал ІСГМ УААН. — № 2000105680, заявл. 06.10.2000 ; опубл. 15.06.2001, бюл. № 5.

5. Пат. 40542 Україна МПК C05F11/08, C12N1/20. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для виробництва бактеріального добрива під гречку / В. І. Лохова, О. В. Надкернична ; заявник і патентовласник: УкрНДІСГМ УААН. — № 4323845/SU, заявл. 02.11.1987 ; опубл. 16.07.2001, бюл. № 6.

6. А. с. 1796603 СССР, МКИ C05F11/08, C12N1/12 Штамм бактерій *Azospirillum brasilense* для производства бактериального удобрения под костреч безостый / [В. В. Волкогон, Н. Н. Мальцева, Л. И. Онищенко и др.]. — опубл. 23.02.93, бюл. № 7.

7. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе : [метод. рек.] / ред. А. В. Хотянович. — Л., 1991. — 43 с.

8. Бирюков В. В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В. В. Бирюков, В. М. Кантере. — М. : Наука, 1985. — 296 с.

9. Лисенков А. Н. Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов / А. Н. Лисенков. — М. : Медицина, 1979. — 346 с.

10. Максимов В. Н. Многофакторный эксперимент в биологии / В. Н. Максимов. — М. : Изд-во МГУ, 1980. — 280 с.

11. Козар С. Ф. Вплив джерел біогенних елементів на ріст *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* за їх сумісного культивування / С. Ф. Козар // Сільськогосподарська мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. — Чернігів : Сівер-Друк, 2013. — Вип. 18. — С. 75–86.

ОПТИМИЗАЦИЯ СРЕДЫ ДЛЯ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* И *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

С. Ф. Козар

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Представлены результаты исследования по оптимизации питательной среды для совместного культивирования диазотрофов *Bradyrhizobium japonicum* и *Azospirillum brasilense* при периодическом культивировании. Выявлено, что при выращивании этих микроорганизмов в смешанной культуре числен-*

OPTIMIZATION OF CULTURAL MEDIA FOR JOINT CULTIVATION OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AND *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

S. F. Kozar

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The paper presents the results of studies on the optimization of culture media for joint cultivation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* bacteria at periodic passages. It was established that cultivation of studied microorganisms in a mixed culture the number of nodule bacteria vary from 0.76 to*

ность клубеньковых бактерий может колебаться от 0,76 до 6,72 млрд. кл./см³, в зависимости от концентрации компонентов среды. Показано, что эффект воздействия мелассы, кормовых дрожжей и фосфатов на ростовую активность *B. japonicum* зависит не только от количества химических соединений в среде, а и от штамма *A. brasilense*, с которым осуществляется культивирование. По результатам многофакторного эксперимента предложена оптимизированная среда для совместного выращивания ризобий и азоспирил.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, культивирование, среда, оптимизация.

6.72 billion cells/cm³, depending on the concentration of medium components. It was shown that the effect of molasses, fodder yeast and phosphates on growth activity of *B. japonicum* significantly depends not only on the amount of chemical components in the media, but also on the strain of *A. brasilense*, used for joint cultivation. Based on the results of multivariate experiment an optimized media for joint cultivation of studied microorganisms was proposed.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense*, cultivation, medium, optimization.