

## ВПЛИВ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ВЕГЕТАТИВНИХ КЛІТИН І ЦИСТ *AZOTOBACTER CHROOCCUM* 2.1

О. М. Білоконська

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: obilokonska@ukr.net

**Мета.** Вивчити вплив ультрафіолетового випромінювання (УФ-випромінювання) на збереженість цист та вегетативних клітин *Azotobacter chroococcum* 2.1 на живильному середовищі та насінні огірка, у т. ч. за використання полісахаридно-білкового комплексу. **Методи.** Мікробіологічні, мікроскопічні, фізичні, статистичні. **Результати.** Показано значний негативний ефект впливу УФ-випромінювання на життєздатність *A. chroococcum* 2.1. Цисти *A. chroococcum* 2.1 стійкіші до впливу УФ-випромінювання, ніж вегетативні клітини. Ефект впливу УФ-випромінювання на життєздатність азотобактера залежить від часу, протягом якого опромінювали бактеріальні клітини. На живильному середовищі чисельність цист *A. chroococcum* 2.1 була вищою за чисельність вегетативних клітин на 88 % за мінімального часу опромінення. За дії УФ-випромінювання протягом 60 с усі вегетативні клітини на середовищі гинули, тоді як невисока кількість цист залишалася. На бактеризованому насінні, за рахунок складчастої поверхні оболонки, життєздатні цисти азотобактера, на відміну від вегетативних клітин, спостерігали навіть за опромінення протягом 30 хв. Для зменшення негативного впливу УФ-випромінювання застосовано полісахаридно-білковий комплекс (ПБК), який сприяв подовженню строків збереження життєздатності клітин мікроорганізмів. Найвищу виживаність бактеріальних клітин спостерігали у варіанті з *A. chroococcum* 2.1 у формі цист з додаванням ПБК. За таких умов вегетативні клітини виявлено лише у варіанті з додаванням ПБК. **Висновки.** УФ-випромінювання негативно впливає на виживаність *A. chroococcum* 2.1 як на живильному середовищі, так і на насінні огірка, водночас більшою мірою гинуть вегетативні клітини, аніж цисти. Для підвищення виживаності на насінні *A. chroococcum* 2.1 як у формі цист, так і вегетативних клітин, доцільно використовувати полісахаридно-білковий комплекс. Отримані дані є підставою для подальших досліджень щодо можливостей збереженості життєздатних клітин бактерій роду *Azotobacter* на насінні за впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища.

Ключові слова: азотобактер, цисти, УФ-випромінювання, полісахаридно-білковий комплекс, життєздатність бактеріальних клітин.

**Вступ.** Сьогодні перспективи використання мікробних препаратів на основі азотфіксувальних бактерій у технологіях вирощування сільськогосподарських культур вже не викликають сумніву. Біопрепарати сприяють підвищенню урожайності та поліпшенню якості рослинницької продукції, їх застосування дозволяє зменшити агрохімічне навантаження на агроценози.

Інтродукцію діазотрофів, як правило,

здійснюють шляхом передпосівної бактеризації насіння сільськогосподарських культур. Проте за впливу несприятливих умов навколишнього середовища (зокрема, УФ-випромінювання) значна частина азотфіксувальних бактерій гине, що знижує ефективність бактеризації [1].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** УФ-випромінювання є короткохвильовою частиною сонячного спектру, що має

широку біологічну дію та володіє енергією, достатньою для впливу на хімічні зв'язки, в тому числі і в живих клітинах. УФ-випромінювання з довжиною хвилі 280–200 нм має бактерицидну здатність. Максимальна бактерицидна дія відповідає довжині хвилі 264 нм. Енергія ультрафіолетової компоненти сонячного світла за довгострокової дії викликає ушкодження мікроорганізмів на клітинному і генетичному рівнях [2].

Як відомо, бактерії роду *Azotobacter* здатні утворювати цисти [3]. У цьому стані мікроорганізми стійкіші до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища, ніж вегетативні клітини [4; 5]. Так, зокрема, вони краще витримують дію ультрафіолетового випромінювання, висушування, гамма-випромінювання, сонячної радіації, дії ультразвуку, проте не стійкі до високих температур [3].

Оскільки бактерії роду *Azotobacter* здатні переходити у стан спокою, це може бути одним із шляхів вирішення проблеми збереженості інокулянта на насінні. Попередні дослідження щодо збереженості бактерій роду *Azotobacter* на насінні огірка за дії різних температур [6] засвідчили, що цисти досліджуваних штамів азотобактера краще зберігають життєздатність, ніж вегетативні клітини.

Важливим є збереження життєздатності інокулянта на насінні сільськогосподарських культур від моменту обробки до висіву його в ґрунт, що є актуальним, оскільки ультрафіолет як частина сонячного світла, є однією з причин загибелі нанесених на насіння мікроорганізмів. На нашу думку, перспективним у цьому напрямі є застосування азотобактера у формі цист, а також використання речовин, здатних послаблювати дію ультрафіолетового опромінення.

**Мета досліджень** — вивчити вплив УФ-випромінювання на збереженість *A. chroococcum* 2.1 у формі вегетативних клітин та цист за впливу полісахаридно-білкового комплексу.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили з новим штамом *Azotobacter chroococcum* 2.1. Попередніми дослідженнями показано суттєвий вплив штаму на ріст і розвиток рослин огірка за передпосівної бактеризації насіння цієї культури. *A. chroococcum* 2.1 зберігається в робочій колекції лабораторії фізіології мікроорганізмів Інституту

сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Для опромінення бактерій використовували ультрафіолетову газорозрядну лампу низького тиску на парах ртуті Philips 30W G 30 T 8, що випромінює ультрафіолетові промені з максимальною довжиною хвилі 253,7 нм.

Вегетативні клітини отримували шляхом культивування бактерій на агаризованому середовищі Ешбі протягом 4 діб за температури  $28 \pm 2$  °C [7]. Для утворення цист *A. chroococcum* 2.1 культивували на агаризованому середовищі Ешбі протягом 6 діб за температури  $28 \pm 2$  °C. Після цього чашки Петрі з біомасою поміщали на 5 діб у термостат з температурою 44 °C [8]. Утворення цист контролювали методом фарбування фіксованого мазка за методикою, запропонованою О. Вісом [8], з подальшим мікроскопуванням.

Для визначення можливості подовження збереженості мікроорганізмів застосовували раніше підібраний полісахаридно-білковий комплекс (ПБК) [9], який складається з полісахаридів (альгінат натрію, крохмаль) і речовин білкової природи (желатин). Для визначення виживаності азотобактера на живильному агарі ПБК додавали до середовища безпосередньо під час його підготовки. У досліді з насінням *Cucumis sativus* L. (сорт Конкурент) [10] ПБК у відповідних варіантах застосовували одночасно з бактеріальною суспензією. Насіння попередньо стерилізували 5 %-м розчином гіпохлориту натрію [11].

Дослід з визначення виживаності *A. chroococcum* 2.1 за дії УФ-випромінювання передбачав такі варіанти:

1. Вегетативні клітини *A. chroococcum* 2.1.
2. Вегетативні клітини *A. chroococcum* 2.1 з одночасним використанням ПБК.
3. Цисти *A. chroococcum* 2.1.
4. Цисти *A. chroococcum* 2.1 з одночасним використанням ПБК.

Дослід передбачав два блоки:

І. Визначення впливу УФ-випромінювання на бактерії на агаризованому середовищі Ешбі.

Бактерії роду *Azotobacter*, висіяні на агаризоване середовище Ешбі, піддавали ультрафіолетовому випромінюванню протягом 5 с, 10 с, 30 с, 60 с. Відстань від джерела випромінювання становила 80 см.

II. Визначення впливу УФ-випромінювання на бактерії, нанесені на насіння огірка.

Бактеризоване насіння огірка піддавали впливу ультрафіолетового випромінювання протягом 5 с, 10 с, 30 с, 60 с, 5 хв, 10 хв, 20 хв, 30 хв. Відстань від джерела випромінювання до поверхні насіння — 80 см. Початкове навантаження бактерій становило  $35 \pm 2$  тис. клітин/насінину.

Чисельність бактерій на насінні визначали методом послідовних розведень з наступним висівом на агаризоване середовище Ешбі [12].

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням програми Microsoft Excel.

**Результати та їх обговорення.** На рис. 1 наведено результати впливу УФ-випромінювання на чисельність *A. chroococcum* 2.1 на живильному агаризованому середовищі. Аналіз отриманих даних свідчить, що цисти азотобактера мають вищу життєздатність, ніж вегетативні клітини. Так, у варіантах без ПБК через 5 с опромінення чисельність цист *A. chroococcum* 2.1 була вищою за кількість вегетативних клітин на 88 %, через 10 с — у 2,1 раз, через 30 с — у 11 разів, а наприкінці терміну експозиції (60 с) вегетативних клітин не виявлено.

За дії ультрафіолету найвищою на живильному середовищі була чисельність життєздатних клітин азотобактера у формі цист з додаванням ПБК: за дії опромінення протягом 5 с вона становила 45,3 % від початкової чисельності, через 10 с — 30,6 %, через 30 с — 29,9 %, а через 60 с — 2,2 %.

Збереження життєздатності бактерій на насінні за дії УФ-випромінювання є важливим етапом інтродукції мікроорганізмів, оскільки ультрафіолетові промені входять до

спектру сонячного світла. Тому, наступним етапом нашої роботи була перевірка виживаності *A. chroococcum* 2.1 на насінні огірка за впливу УФ-випромінювання.

Оболонка насіння виконує роль захисту зародка від механічних впливів та інших дій зовнішніх факторів, несприятливих для насіння. Вона має складчасту капілярно-пористу структуру [13; 14], за рахунок якої, на нашу думку, і відбувається захист бактерій, нанесених на насіння.

У досліді не виявлено значного зниження життєздатності бактеріальних клітин на насінні за дії УФ-випромінювання протягом 5 с, 10 с, 30 с та 60 с в усіх варіантах досліді. Враховуючи зазначене, нами подовжено час опромінення бактеризованого насіння до 30 хв — подальші дослідження проводили в такому часовому алгоритмі: 5 хв, 10 хв, 20 хв, 30 хв (рис. 2).

За УФ-випромінювання найкраще азотобактер зберігав життєздатність на насінні у варіанті з бактеризацією клітинами у формі цист з додаванням ПБК. Так, через 5 хв опромінення кількість клітин знизилася з 35 тис. до 13 тис./насінину, або на 37,1 %. При цьому чисельність бактерій у формі цист з додаванням ПБК на 61,9 % перевищувала їх кількість в аналогічному варіанті, але без додавання ПБК.

Чисельність азотобактера зменшується зі збільшенням терміну дії УФ-випромінювання. Проте навіть наприкінці терміну експозиції (30 хв) у відповідних варіантах залишаються життєздатні клітини у формі цист. Найвищу виживаність бактеріальних клітин спостерігали у варіанті з *A. chroococcum* 2.1 у формі цист з додаванням ПБК.

Отже, у результаті проведених досліджень встановлено, що УФ-випромінювання

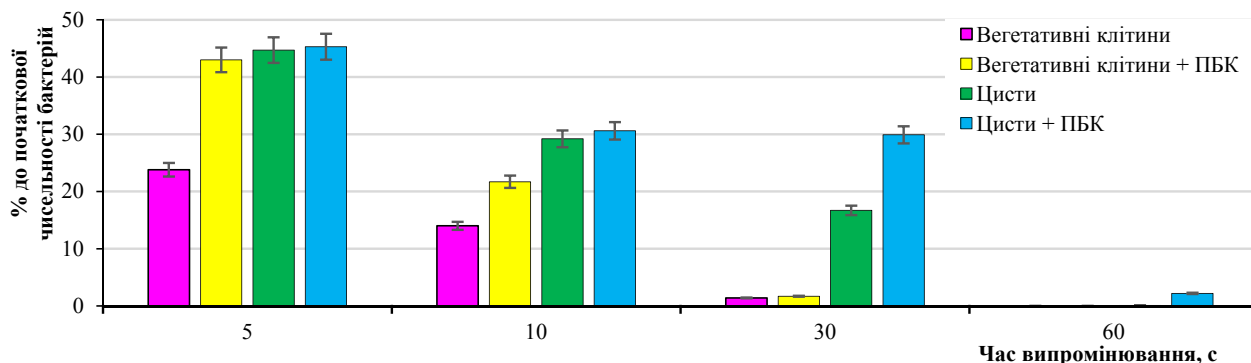


Рис. 1. Вплив УФ-випромінювання на життєздатність бактерій *A. chroococcum* 2.1 на агаризованому середовищі Ешбі

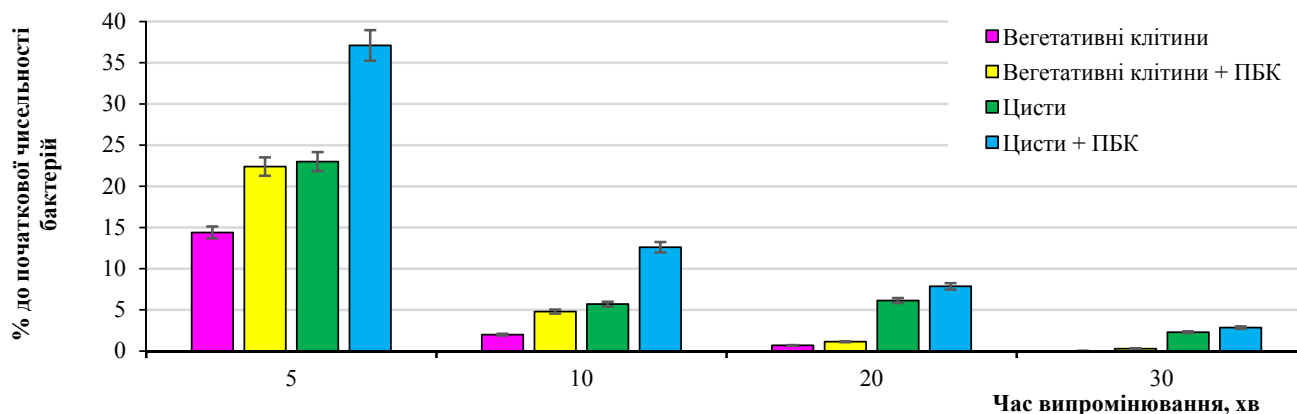


Рис. 2. Вплив УФ-випромінювання на життєздатність бактерій *A. chroococcum* 2.1 на насінні огірка

негативно впливає на виживаність *A. chroococcum* 2.1 як на живильному середовищі, так і на насінні огірка. Чисельність вегетативних бактеріальних клітин на насінні за опромінення суттєво зменшується порівняно з кількістю цист. Для підвищення виживаності *A. chroococcum* 2.1 доцільно використовувати полісахаридно-білковий комплекс. ПБК позитивно впливає на збереженість клітин азотобактера як у формі цист, так і вегетативних клітин. Отримані дані є підставою для подальших досліджень щодо можливостей збереженості життєздатних клітин бактерій роду *Azotobacter* на насінні за впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Zelle, M. R., Hollander, A. Effects of radiation on bacteria. Hollander (Ed.). *Radiation biology*. Vol. II. New York : McGraw-Hill Book Co, 1955. P. 365–430.
2. Hockberger, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*. 2002. Vol. 76. P. 561–579.
3. Nicholson W. L., Schuerger A. C., Setlow P. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat Res*. 2005. Vol. 571. P. 249–264. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012>
4. Loperfido B., Sadoff H. L. Germination of *Azotobacter vinelandii* Cysts: Sequence of Macromolecular Synthesis and Nitrogen Fixation. *J. Bacteriol*. 1973. T. 113, № 2. P. 841–846.
5. Funa N., Ozawa H., Hirata A., Horinouchi S. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter*

*vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103, № 16. P. 6356–6361. <http://doi.org/10.1073/pnas.0511227103>

6. Білоконська О. М., Козар С. Ф., Євтушенко Т. А., Усманова Т. О. Збереженість бактерій роду *Azotobacter* на насінні *Cucumis sativus* L. за дії різних температур. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2018. Вип. 27. С. 11–17.

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

8. Wyss O. Neumann M. G., Socolofsky M. D. Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1961. № 10. P. 555–565. <http://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555>

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

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

11. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / пер. с венг. под ред. Г. С. Муромцева. М. : Колос, 1983. 296 с.

12. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. М. : Дрофа, 2005. 256 с.

13. Parde S. R. Kausal R. T., Jayas D. S., White N. D. G. Mechanical damage to soybean seed during processing. *Journal of Stored Products Research*. 2002. Vol. 38, № 4. P. 385–394.

14. Коробейников А. В. Влияния микроорганизмов на качество семян. *Селекция и семеноводство полевых культур*. 1979. № 4. С. 14–17.

Отримано 14.05.2018

## INFLUENCE OF ULTRAVIOLET RADIATION ON THE VIABILITY OF VEGETATIVE CELLS AND CYSTS OF *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* 2.1

O. M. Bilokonska

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv  
e-mail: obilokonska@ukr.net

**Objective.** Study the influence of ultraviolet radiation (UV radiation) on the preservation of cysts and vegetative cells of *Azotobacter chroococcum* 2.1 in the digest medium and seeds of cucumber, including for the use of the polysaccharide-protein complex. **Methods.** Microbiological, microscopic, physical, statistical. **Results.** Significant negative effect of UV radiation on the viability of *A. chroococcum* 2.1 was shown. Cysts of *A. chroococcum* 2.1 are more resistant to UV radiation than vegetative cells. The influence of UV radiation on the viability of *azotobacter* depends on the time during which the bacterial cells were irradiated. In the digest medium, the number of cysts of *A. chroococcum* 2.1 was higher than the vegetative cells by 88 % at the minimum exposure time. Under the action of UV radiation for 60 seconds, all vegetative cells in the medium died, while a small number of cysts remained. On bacterized seeds, due to the folded surface of the shell, viable cysts of *azotobacter*, unlike vegetative cells, was observed even for irradiation within 30 minutes. To reduce the negative effects of UV radiation, the polysaccharide-protein complex (PPC) has been used, and it contributed in lengthening the viability of microorganism cells. The highest survival of bacterial cells was observed in the variant with *A. chroococcum* 2.1 in the form of cysts with the addition of PPC. Under such conditions, vegetative cells are detected only in the variant with the addition of PPC. **Conclusion.** UV radiation negatively affects the survival of *A. chroococcum* 2.1 both on the digest medium and on the seeds of the cucumber, while vegetative cells are more likely to die than cysts. To improve the survival of *A. chroococcum* 2.1 seeds in the form of cysts and vegetative cells, it is advisable to use the polysaccharide-protein complex. The obtained data are the basis for further research on the possibilities of preservation of viable cells of bacteria of the genus *Azotobacter* on the seed under the influence of unfavourable environmental factors.

Key words: *azotobacter*, cysts, UV radiation, polysaccharide-protein complex, viability of bacterial cells.

### REFERENCES

1. Zelle, M. R., & Hollaender, A. (1955). Effects of radiation on bacteria. In A. Hollaender (Ed.), *Radiation biology, II*. New York: McGraw-Hill Book Co.
2. Hockberger, P. E. (2002). A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 76(6), 561–579.
3. Nicholson, W. L., Schuerger, A. C., & Setlow, P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat Res*, 571, 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.012>
4. Loperfido, B. (1973). Germination of *Azotobacter vinelandii* Cysts: Sequence of Macromolecular Synthesis and Nitrogen Fixation. *J. Bacteriol*, 113(2), 841–846.
5. Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., & Horinouchi, S. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6356–6361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511227103>
6. Bilokonska, O. M., Kozar, S. F., Yevtushenko, T. A., & Usmanova, T. O. (2018). Zberezhenist bakteriy rodu *Azotobacter* na nasinni *Cucumis sativus* L. za dii riznikh temperature [Preservation of *Azotobacter* on *Cucumis sativus* L. seeds under different temperatures]. *Silskogospodarska mikrobiologia — Agricultural Microbiology*, 27, 11–17 [in Ukrainian].
7. Khotyanovich, A. V. (1991). *Metody kultivirovaniya azotfiksiruyushchikh bakteriy, sposoby polucheniya i primeneniya preparatov na ikh osnove* [Methods for cultivating nitrogen-fixing bacteria, methods for preparing and using preparations based on them]. Leningrad [in Russian].
8. Wyss, O., Neumann, M. G., & Socolofsky, M. D. (1961). Development and germination of

the Azotobacter cyst. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10, 555–565. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555>

9. Kozar, S. F., Evtushenko, T. A., & Nesterenko, V. M. (2017). Vpliv rehovin riznogo khimichnogo skladu na zhittezdavnist diazotrofiv na nasinni sikogospodarskikh kultur [Influence of substances of different chemical composition on viability of diazotrophs on seeds of agricultural crops]. *Silskogospodarska mikrobiologia — Agricultural Microbiology*, 25, 11–17 [in Ukrainian].

10. DSTU 4138-2002. Nasinnja sil'skogospodars'kyh kul'tur. Metody vyznachennja jakosti. Kyiv: Derzhspozhivstandart Ukraïni, 2004, 178 [in Ukrainian].

10. Segi, Y. (1983). *Metody pochvennoy mikrobiologii* [Methods of soil microbiology]. Moscow: Kolos, 296 [in Russian].

12. Tepper, E. Z., Shilnikova, V. K., & Pereverzeva, G. I. (2005). *Praktikum po mikrobiologii* [Microbiology Manual]. Moscow: Drofa [in Russian].

13. Parde, S. R., Kausal, R. T., Jayas, D. S., & White, N. D. G (2002). Mechanical damage to soybean seed during processing. *Journal of Stored Products Research*, 38(4), 385–394. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00040-6)

14. Korobeynikov, A. V. (1979). Vliyaniya mikroorganizmov na kachestvo semyan [Effects of microorganisms on seed quality]. *Selektsiya i semenovodstvo polevykh kultur*, 4, 14–17 [in Russian].

Received 14.05.2018