

БІОСИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ *AZOTOBACTER CHROOCCUM* 2.1 — ІНОКУЛЯНТА *CUCUMIS SATIVUS* L.

С. Ф. Козар, О. М. Білоконська, Н. О. Кравченко

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14030, Україна; e-mail: obilokonska@ukr.net

Мета. Дослідити властивості (продукування речовин фітогормональної природи та вірулентність) нового високоефективного штаму асоціативних бактерій роду *Azotobacter*. **Методи.** Фітогормональну активність визначали методом біотестів. Використано мікробіологічні методи (отримання суспензії *Azotobacter chroococcum* 2.1, визначення титру шляхом висіву на живильне середовище; мікроскопія фарбованих мазків — відбитків внутрішніх органів досліджуваних тварин — та висів зразків тканин на живильне середовище); патологоанатомічні (визначення можливої інвазивності та дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин). Дослідження проводили на моделі безпородних білих мишей після введення перорально суспензії живих клітин бактерій у дозах від $0,5 \times 10^9$ до 5×10^9 КУО у $0,5 \text{ см}^3$ стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду на одну мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО/ $0,5 \text{ см}^3$. Статистичні розрахунки здійснювали за використання методів дисперсійного аналізу. **Результати.** Новий штам *A. chroococcum* 2.1 синтезує ауксиноподібні речовини інтенсивніше, ніж гібереліноподібні та цитокініноподібні. Найефективнішим є розведення культуральної рідини 1:100. Отримані результати проведених досліджень можливої патогенності бактерій свідчать, що після введення перорально суспензії живих клітин азотобактера не виявлено відхилень у поведінці мишей. За результатами мікробіологічних досліджень внутрішніх органів піддослідних тварин після початку досліджень та через 15 діб встановлено, що штам азотобактера не інфективний, не розмножується і не дисемінує в організмі теплокровних тварин. Внутрішньочеревне та пероральне введення суспензії культури живих клітин *A. chroococcum* 2.1 не спричиняло інвазії бактерій у внутрішні органи білих мишей. Ретрокультур не виявлено. **Висновки.** *A. chroococcum* 2.1 продукує ауксини, гібереліни й цитокініни. Виявлено параболічний характер впливу розведень культуральної рідини досліджуваного штаму *A. chroococcum* 2.1 на тест-культури (колеоптилі пшениці, мезокотилі кукурудзи та сім'ядолі огірка), що є наслідком продукування речовин фітогормональної природи. Найінтенсивніше новий штам продукує ауксиноподібні речовини. Отримані дані свідчать про авірулентність штаму для теплокровних тварин ($LD_{50 \text{ в/ч}} > 5$ млрд клітин/мишу, $LD_{50 \text{ пер ос}} > 5$ млрд клітин/мишу). Згідно з даними щодо відсутності вірулентності, без урахування рівнів токсикогенності, токсичності, алергенності та дисбіотичної дії, штам *A. chroococcum* 2.1 може вважатися непатогенним.

Ключові слова: речовини фітогормональної природи, *Azotobacter chroococcum*, інфективність (інвазивність), вірулентність, патогенність.

Вступ. Огірок (*Cucumis sativus* L.) — одна з важливих овочевих культур. Рослина огірка типова напівтропічна, добре росте за стабільних теплих і вологих умов з високим рівнем освітленості. Це вимагає постійного

надходження води та поживних речовин. Якість огірків та їхня харчова цінність залежить від багатьох факторів і найперше від технології вирощування культури, особливо від удобрення [1]. Важливим є використання

високоєфективних асоціативних азотфіксаторів у технологіях вирощування культури для покращення живлення, підвищення продуктивності та відтворення родючості ґрунтів [2]. На основі бактерій роду *Azotobacter* розроблено низку дієвих препаратів землеудобрявальної дії [3].

Штам *A. chroococcum* 2.1 характеризується підвищеною азотфіксувальною активністю та позитивно впливає на рослини огірка [4]. Важливим є розкриття механізму дії цього діазотрофа на рослину огірка з урахуванням продукування рістстимуляторних речовин, а також дослідження можливих патогенних властивостей зазначеного штаму для теплових тварин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На думку багатьох дослідників, роль сигнальних молекул, що регулюють взаємодію мікро- та макроорганізмів, зокрема у процесах асоціації та патогенезу, відіграють ауксини та цитокініни [5; 6]. Мікроорганізми, що перебувають в асоціаціях із рослинами, здатні до синтезу фітогормонів, використовують їх як посередників у взаємодії з рослиною, сприяють росту й розвитку сільськогосподарських культур [7; 8].

Агрономічно корисні бактерії проникають у кореневі тканини внаслідок розвитку складних механізмів взаємодії, зокрема й синтезу індолілоцтової кислоти з її попередника триптофану, який є продуктом екзосмосу кореневої системи [6].

На думку науковців, існує також прямий зв'язок між вмістом цитокінінів, зокрема зетинрибозиду, в культуральній рідині бактерій та їхньою симбіотичною азотфіксувальною активністю [10; 11].

Фітогормони є особливим класом фізіологічно активних речовин, що впливають на процеси росту й розвитку рослин [9]. Вони визначають темпи росту, активують або гальмують його, лежать в основі багатьох тропізмів рослин, впливають на процеси квітування та плодоношення, а також викликають багато інших реакцій рослини [12–14]. Основними речовинами з фітогормональною природою є ауксини, гібереліни та цитокініни, їхня загальна особливість полягає в тому, що вони не є речовинами білкової природи й належать до різних класів органічних речовин [6; 7].

Численні токсиколого-гігієнічні дослід-

ження показали, що мікробні препарати на основі асоціативних бактерій не токсичні для людини й навколишнього середовища [3]. Водночас природа діючого чинника є причиною обережного ставлення до них з погляду безпеки [15; 16]. Тому обов'язково треба проводити дослідження патогенних властивостей штамів бактерій як основи майбутніх мікробних препаратів.

Мета роботи. Дослідження властивостей (продукування речовин фітогормональної природи та вірулентності) штаму *A. chroococcum* 2.1, перспективної для інокуляції огірка бактерії.

Матеріали і методи. В дослідженнях використовували штам *A. chroococcum* 2.1 та позитивний контроль — консорціум штамів *A. chroococcum* і *A. vinelandii* М-70/2 [17].

Для дослідів бактерії вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній коливальці за 220 об./хвилину та температури 28 ± 2 °C в рідкому середовищі Ешбі [18].

Для досліджень вірулентності мікроорганізмів використовували суспензію клітин *A. chroococcum* 2.1. Гомогенізовану суспензію готували на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності шляхом титрування з подальшим висівом на живильне агаризоване середовище.

Здатність бактерії продукувати біологічно активні речовини визначали методом біотестів згідно з методичними рекомендаціями та методами визначення фітогормональної активності [18; 19].

Досліджували такі розведення культуральної рідини (КР) *A. chroococcum* 2.1 у дисцильованій воді: 1:10; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000.

Здатність *A. chroococcum* 2.1 до синтезу ауксинів перевіряли на колеоптилях пшениці згідно з методиками [18; 19]. Синтез цитокініноподібних речовин визначали на сім'ядолях огірка сорту Джерело. Здатність мікроорганізму до синтезу гібереліноподібних речовин досліджували на проростках кукурудзи [18; 19].

Інфективність (інвазивність) штаму визначали шляхом встановлення можливості дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин після зараження з урахуван-

ням можливості природного шляху (*per os*) проникнення у макроорганізм. Задля цього білим мишам одноразово вводили активну культуру бактерій у максимальних дозах із подальшим спостереженням за загальним станом, поведінкою та масою тіла тварин. За 15 діб після зараження проводили вимушений забій лабораторних тварин, здійснювали мікроскопічні дослідження фарбованих мазків-відбитків їхніх внутрішніх органів та висіви зразків тканин на живильне середовище. Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з лабораторними тваринами здійснювали згідно з положеннями «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2003 р.) [20–22]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти та США [23–29].

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали із залученням пакету програм Microsoft Excel 2019. У представлених результатах досліджень наведено середньоарифметичні дані та їх стандартні похибки.

Результати та їх обговорення.

Дослідження фітогормональної активності *A. chroococcum* 2.1.

Біологічна ефективність асоціативних бактерій значною мірою може бути зумовлена продукуванням гормонів ауксинової, цитокінінової та гіберелінової природи. Речовини гормональної природи, синтезовані мікроорганізмами, є позаклітинними, перебувають у культуральній рідині.

У підсумку проведених досліджень встановлено: нативна КР пригнічувала ріст колеоптилів пшениці: показник був нижчим за абсолютний контроль на 34 % (рис. 1). Це може свідчити про високий вміст ауксинів у КР. За застосування інших розведень КР спостерігали стимулювальну дію. Так, за розведення КР у співвідношенні 1:10 отримано дані, вищі за показник контролю на 29,8 %. Менша стимулювальна дія виявлялася за розведення КР 1:500 і становила відповідно до контролю 1,5 %.

Найбільшу стимулювальну дію спостерігали за використання розведення 1:100 — збільшення довжини колеоптилів на 20,9 % щодо показників позитивного контролю та на 64,2 % щодо абсолютного контролю відповідно.

Отримані результати демонструють параболічний характер впливу розведень культуральної рідини досліджуваної бактерії на проріст колеоптилів пшениці, що характерно

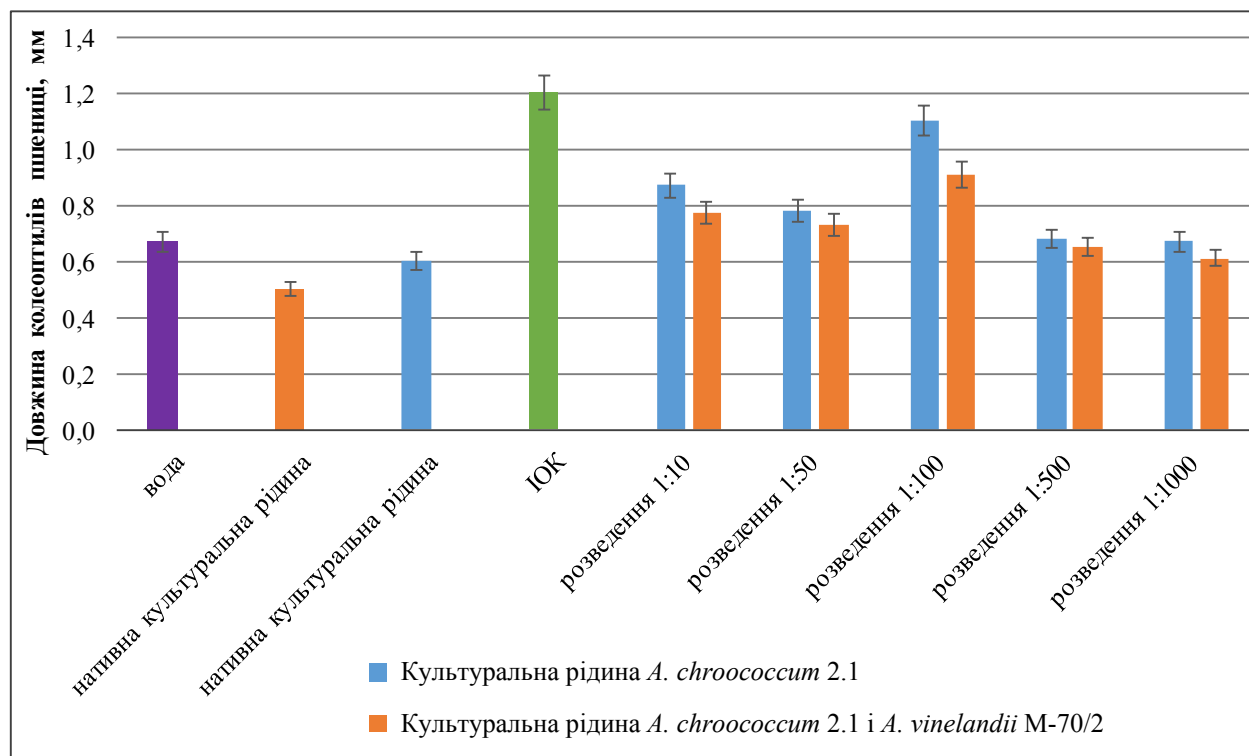


Рис. 1. Активність синтезу ауксиноподібних речовин *A. chroococcum* 2.1 (вплив на проріст колеоптилів пшениці).

для дії на цей показник різних концентрацій речовин ауксинової дії.

Тест на ризогенез показав, що за використання культуральної рідини, розведення якої становлять 1:10 і 1:50, показники у наведених результатах перебувають на рівні контролю (рис 2).

У варіанті з розведенням КР *A. chroococcum* 2.1 1:100 спостерігали збільшення маси коренів живців квасолі в 4 рази щодо абсолютного контролю. За такого ж розведення у позитивному контролі (консорціум *A. vinelandii* і *A. chroococcum* М-70/2) відзначено збільшення маси коренів у 3,5 рази (рис. 3).

Нами отримано аналогічні дані у підсумку вивчення впливу КР *A. chroococcum* 2.1 на кількість утворених коренів на живцях квасолі. За використання нативної КР і розведення 1:10 і 1:50 спостерігали інгібувальну дію. За використання КР у розведенні 1:100 кількість коренів збільшилася на 125 % щодо показників абсолютного контролю та на 83 % — позитивного контролю.

Отримані дані свідчать, що у варіанті з КР *A. chroococcum* 2.1 на живцях квасолі утворювалося більше коренів, коренева система була більш розгалуженою, якщо порівняти з позитивним контролем (консорціум

A. vinelandii і *A. chroococcum* М-70/2) (рис. 4).

Отже, в усіх варіантах, крім нативної КР і розведення 1:10, виявляється стимулювальна дія нового штаму *A. chroococcum* 2.1 на розвиток колеоптилів пшениці та ризогенез живців квасолі.

Синтез цитокініноподібних речовин перевіряли на сім'ядолях огірка сорту Джерело. За використання КР у розведенні 1:10 спостерігали збільшення маси сім'ядолей огірка на 12,5 % щодо показників контролю та на 8 % щодо позитивного контролю (консорціуму *A. vinelandii* і *A. chroococcum* М-70/2). За розведення 1:50 відзначали приріст маси сім'ядолей огірка на 33,3 % щодо абсолютного контролю та 14,3 % щодо позитивного контролю (рис. 5).

За використання розведень 1:100 та 1:1000 показники приросту сім'ядолей огірка були меншими за інші варіанти, але результати з новим штамом були вищими проти контролю.

Здатність бактерії до синтезу гібереліноподібних речовин перевіряли на проростках кукурудзи [18]. У дослідженнях встановлено, що нативна КР, так само як і у випадку з цитокініноподібними та ауксиноподібними речовинами, пригнічувала ріст проростків

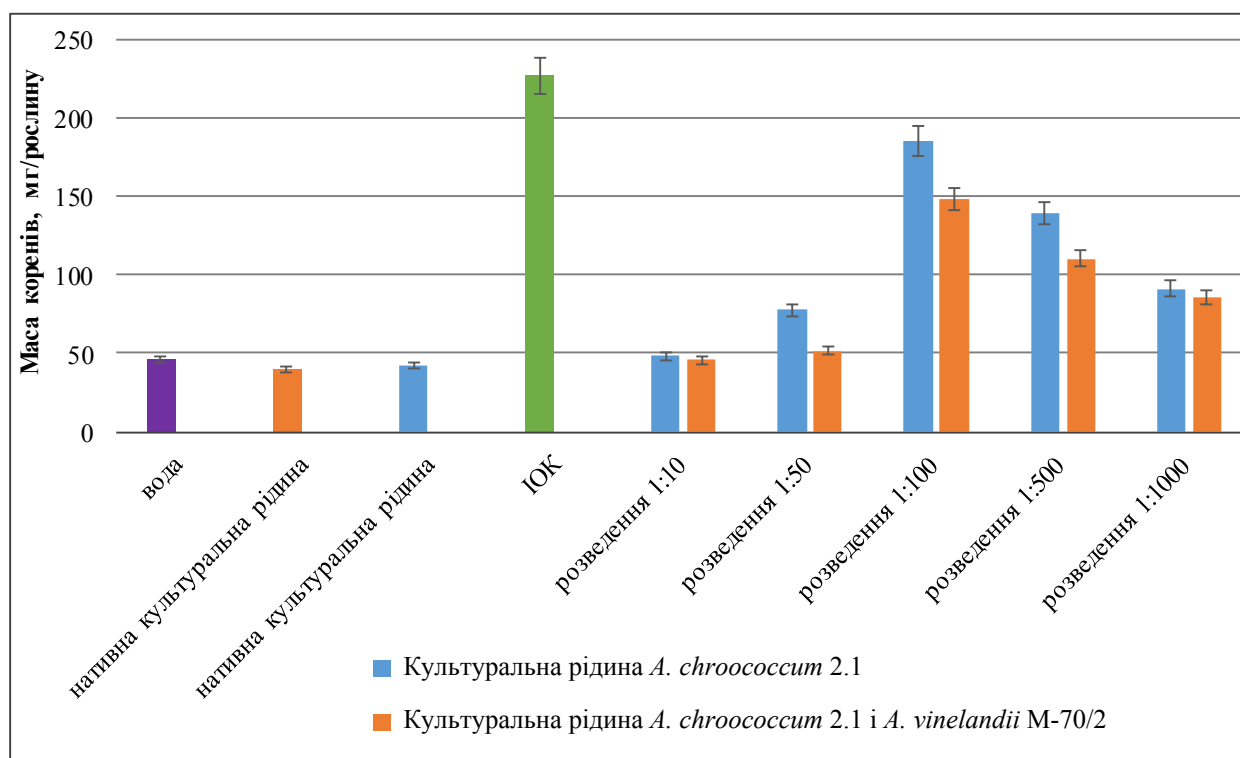


Рис. 2. Вплив ауксиноподібних речовин штаму *A. chroococcum* 2.1 на масу коренів живців квасолі, мг/рослину.

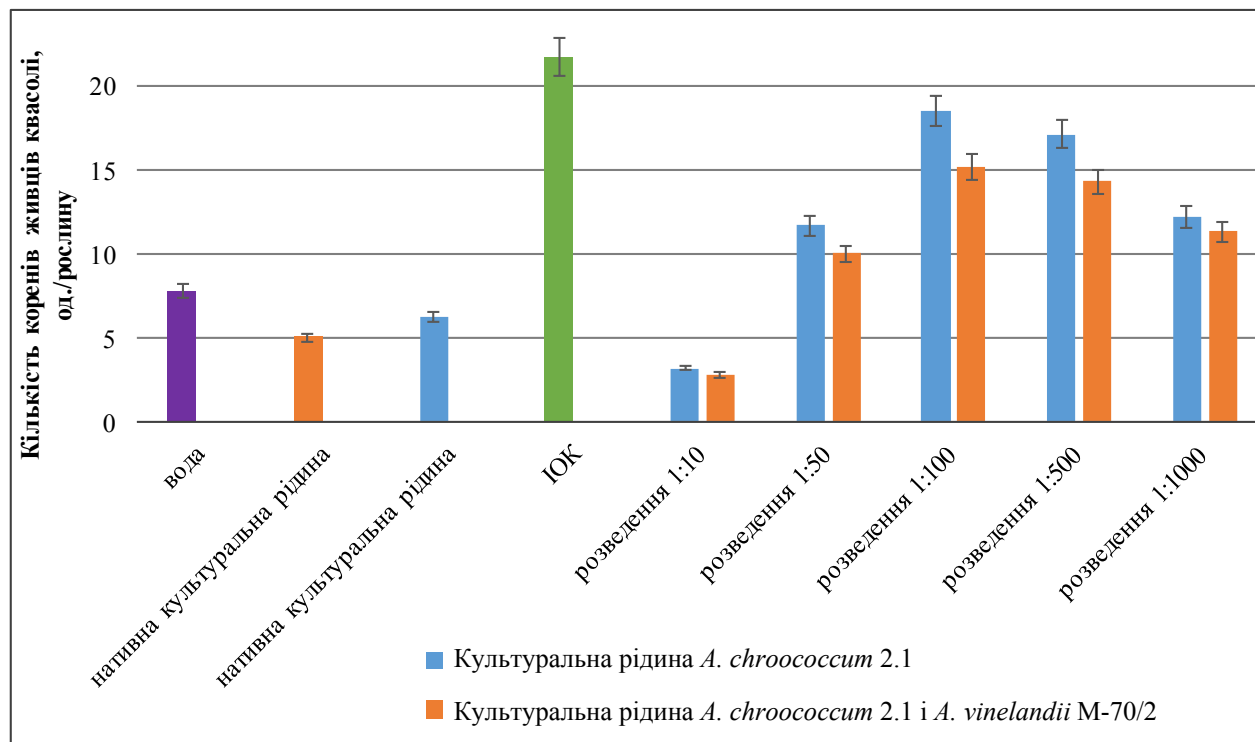


Рис. 3. Вплив ауксиноподібних речовин штаму *A. chroococcum* 2.1 на кількість коренів живців квасолі, од./рослину.

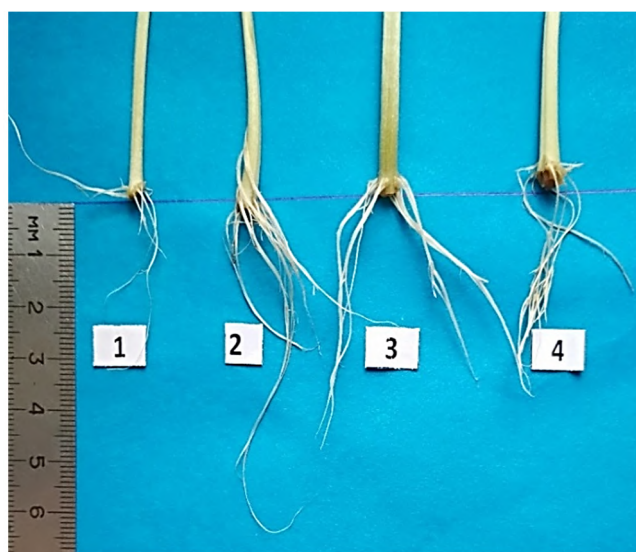


Рис. 4. Вплив культуральної рідини *A. chroococcum* 2.1 на ризогенез живців квасолі.

Примітка: 1) контроль (обробка водою); 2) ІОК 10^{-5} моль; 3) КР *A. chroococcum* 2.1 (розведення 1:100); 4) КР *A. chroococcum* і *A. vinelandii* M-70/2 (розведення 1:100).

кукурудзи. Показник варіанту з нативною КР був нижчим за абсолютний контроль на 56,4 % (рис. 6). За застосування інших розведень КР спостерігали стимулювальну дію. Так, за розведення КР у співвідношенні 1:10 отримано дані, вищі від показників контро-

лю на 18,9 % та від позитивного контролю — на 12 %. Найменша стимулювальна дія виявлялася за розведення КР 1:500 і становила щодо контролю 2,7 %.

Відомо, що ауксини сприяють розростанню тканин зав'язі, причому спочатку ІОК виділяється пилком, а в подальшому саме насіння стає продуцентом ІОК та інших фітогормонів [10]. Надходження ІОК у тканини під час формування плоду є обов'язковою умовою. Водночас синтез ауксинів у рослинному організмі може бути недостатнім для забезпечення гармонійного розвитку рослин та продукційного процесу сільськогосподарських культур. Саме тому екзогенне надходження цих сполук до рослин за інтродукції в агроценози мікроорганізмів — продуцентів ауксиноподібних сполук може сприяти оптимізації процесів органогенезу й підвищенню продуктивності культур.

Отримані результати свідчать, що новий штам *A. chroococcum* 2.1 синтезує ауксиноподібні речовини інтенсивніше, ніж гіберліноподібні та цитокиніноподібні.

Дослідження патогенності *A. chroococcum* 2.1. Досліджуваний рід мікроорганізмів не належить до небезпечних біологічних об'єктів, які можуть бути токсичними чи викликати алергію або інфікувати людей і

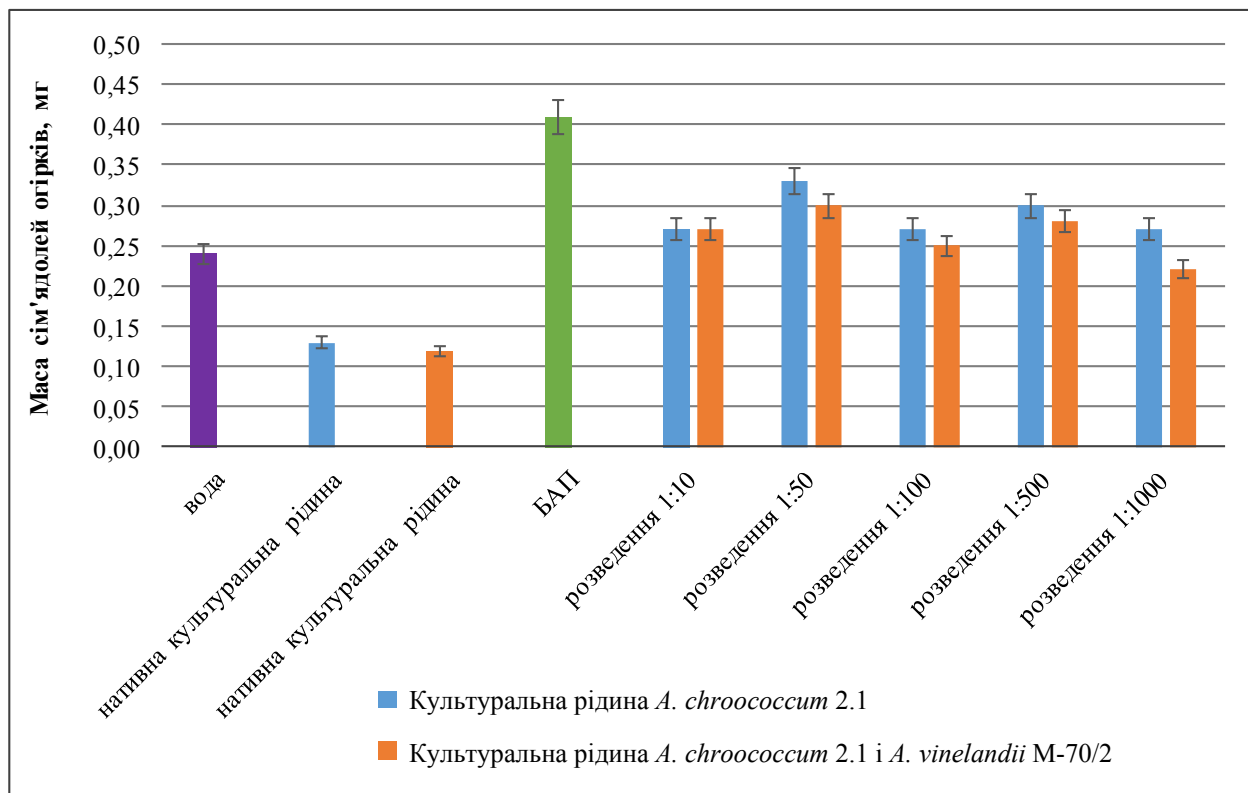


Рис. 5. Активність синтезу цитокініноподібних речовин *A. chroococcum* 2.1 (вплив на приріст маси сім'ядолей огірка).

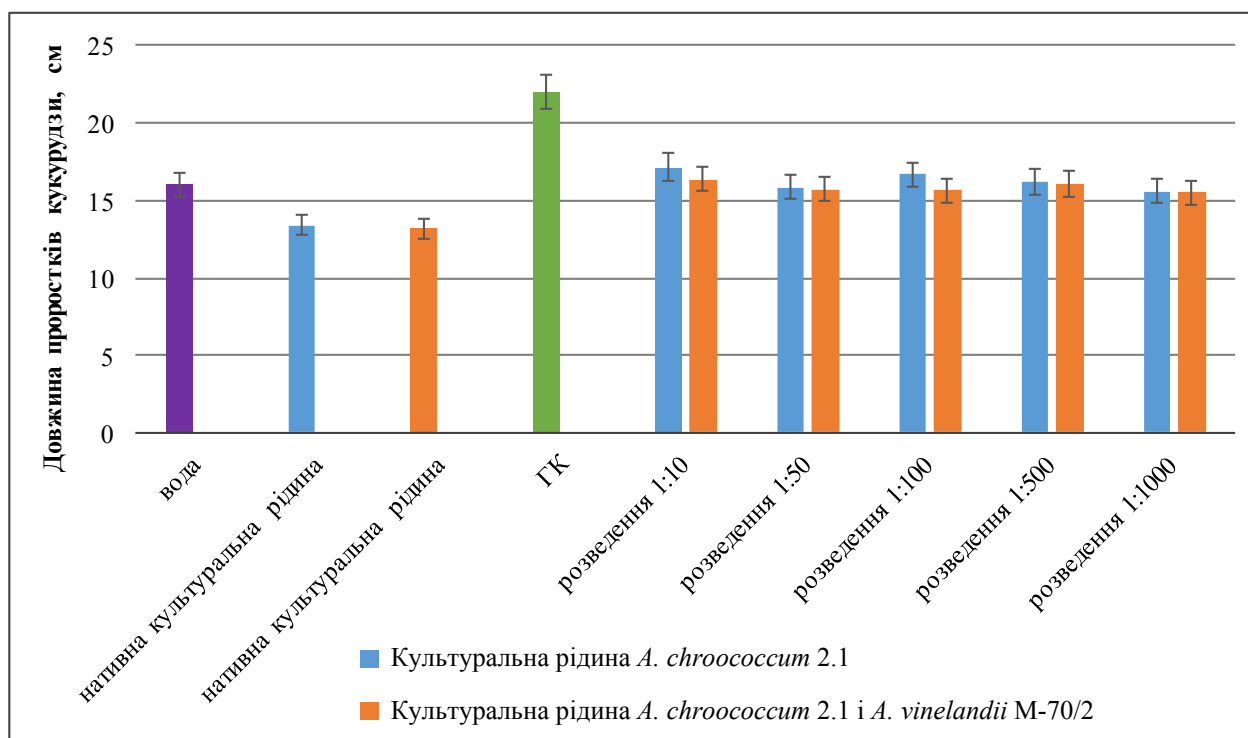


Рис. 6. Активність синтезу гібереліноподібних речовин *A. chroococcum* 2.1 (вплив на приріст проростків кукурудзи).

тварин [18]. Проте постійно селекціонуються нові активні штами бактерій роду *Azotobacter*, що зі свого боку потребує детального вивчення.

У дослідженнях встановлено, що після введення перорально суспензії живих клітин бактерій у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду у дозах від $0,5 \times 10^9$

до 5×10^9 КУО у $0,5 \text{ см}^3$ на одну мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО/ $0,5 \text{ см}^3$ на мишу за 15 діб спостереження у тварин не виявлено відхилень у поведінці, тварини мали жвавий вигляд, добре поїдали корм, змін хутряного покриву не відзначено. Температура та маса тіла піддослідних і контрольних тварин були у нормі, а також в загальному стані поведінки безпородних білих мишей змін не виявлено (табл. 1).

Критерієм авірулентності є відсутність загибелі лабораторних мишей упродовж 15 діб та характерна відсутність патологічної зміни внутрішніх органів у підсумку патологоанатомічного розтину.

Усіх мишей дослідних та контрольних груп наприкінці експерименту було виведено з досліду, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. У проведених дослідженнях не встановлено відхилень від норми

(табл. 2).

За результатами мікробіологічних досліджень внутрішніх органів піддослідних тварин після початку досліджень та за 15 діб встановлено, що штам *A. chroococcum* 2.1 не інфективний, не розмножується і не дисемінує в організмі теплокровних тварин. Внутрішньочеревне та пероральне введення суспензії культури живих клітин досліджуваної бактерії не спричинило інвазії у внутрішні органи білих мишей. Ретрокультур не виявлено.

Висновки. Встановлено, що *A. chroococcum* 2.1 синтезує ауксиноподібні речовини інтенсивніше, ніж гібереліноподібні та цитокініноподібні. Виявлено параболічний характер впливу розведень культуральної рідини досліджуваного штаму на тест-культури, що є наслідком продукування речовин фітогормональної природи. Найефективнішим є роз-

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності *A. chroococcum* 2.1

Матеріал для введення	Кількість мишей, гол.	Доза		Спосіб введення	Кратність введення	Кількість мишей, гол.		
		см ³	млрд клітин			захворіло	загинуло	вижило
Суспензія активних клітин бактерії	7	0,5	1,0	в/ч*	1	0	0	7
	7	0,5	5,0	в/ч	1	0	0	7
	7	0,5	0,5	<i>per os</i> **	1	0	0	7
	7	0,5	1,0	<i>per os</i>	1	0	0	7
	7	0,5	5,0	<i>per os</i>	1	0	0	7
Контроль, ізотонічний розчин	7	0,5	0	в/ч	1	0	0	7
	7	0,5	0	<i>per os</i>	1	0	0	7

Примітка: *в/ч — внутрішньочеревне введення; ***per os* — введення через рот.

Таблиця 2. Результати патологоанатомічного розтину лабораторних тварин

Досліджувані органи	Результати патологоанатомічного дослідження
Серце	у межах анатомічної норми
Легені	в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спайок не виявлено
Шлунок, петлі тонкого й товстого кишечника	зовні без змін та ознак здуття, на розрізі малюнок слизової не змінений
Печінка	темно-червоного кольору, в об'ємі не збільшена, пружної консистенції, середнього кровонаповнення, поверхня гладенька
Нирки	не збільшені, бобоподібної форми, поверхні гладенькі, на розрізі чітко видно малюнок кіркової й мозкової зон, межа між зонами не згладжена
Селезінка	не збільшена, пружної консистенції, на розрізі пульпа помірно повнокровна, темного кольору

ведення культуральної рідини 1:100. Штам *A. chroococcum* 2.1 авірулентний, нездатний до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин. Згідно з отриманими даними щодо відсутності вірулентності, без урахування рівнів токсикогенності, токсичності, алергенності та дисбіотичної дії *A. chroococcum* 2.1 може вважатися непатогенним мікроорганізмом. Вищезазначені дані дають можливість використовувати цей штам у виготовленні біодобрива для бактеризації рослин асоціативними мікроорганізмами задля отримання високих і стабільних урожаїв овочів, зокрема огірка.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Гіль Л. С., Пашковський А. І., Суліма Л. Т. Сучасні технології овочівництва. Ч. 1. Вінниця : Нова книга, 2008. 362 с.
2. Пати́ка В. П., Шерстобоев М. К., Татарин Л. М., Мельничук Т. М. Активізація продуктивної системи мікроорганізм-рослина в овочівництві. *Сільськогосподарська мікробіологія: здобутки і перспективи: Зб. наук. праць*. 2011. С. 282–288.
3. Методологія і практика використання мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур / За наук. ред. В. В. Волкогона. Київ, 2011. 156 с.
4. Bilokonska O. M., Kozar S. F. Viability of *Azotobacter chroococcum* IMB B-7836 and their influence on cucumber productivity. *Analele Universitații din Oradea, Fascicula Biologie*. 2020. Vol. XXVII, № 2. P. 111–115.
5. Курдиш І. К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. К. : Наукова думка, 2010. 256 с.
6. Дімова С. Б. Фітогормони — продукти життєдіяльності мікроорганізмів. Методи визначення. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2014. Вип. 18. С. 159–185. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.18.159-185>
7. Vikhe P. S. *Azotobacter* species as a Natural Plant Hormone Synthesizer. *Research Journal of Recent Sciences*. 2014. Vol. 3. № IV. 2014. P. 59–63.
8. Frankenberger W. T., Arshad M. P. *Phytohormones in Soils: Microbial Production and Function* (1st ed.), 2020. 520 p. <https://doi.org/10.1201/9780367812256>
9. Холодный Н. Г. Фитогормоны. Очерки по физиологии гормональных явлений в растительном организме. К. : Изд-во АН УССР, 1939. 265 с.
10. Моргун В. В., Коць С. Я., Кириченко Е. В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение. *Физиол. и биохим. культурн. растений*. 2009. Т. 41, № 3. С. 187–207.
11. Коць С. Я. Сучасний стан досліджень біологічної фіксації азоту. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011. Т. 43, № 3. С. 212–225.
12. Леонова Н. О., Данкевич Л. А., Драгозов І. В., Пати́ка В. П., Іутинська Г. О. Синтез позаклітинних фітогормонів-стимуляторів бульбочковими та фітопатогенними бактеріями сої. *Доповіді Національної академії наук України*. 2013. № 3. С. 165–171.
13. Kuryata V. G., Poprotska I. V., Rogach T. I. The impact of growth stimulators and retardants on the utilization of reserve lipids by sunflower seedlings. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. № 8(3). P. 317–322. <https://doi.org/10.15421/021750>
14. Wu C. Y., Dickstein R. H., Cary A. J., Norris J. H. The auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl) phthalamic acid elicits pseudonodules on nonnodulating mutants of white sweetclover. *Plant Physiol*. 1996. № 110(2). С. 501–510. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.501>
15. Омелянець Т. Г., Головач, Т. М. Токсикологічна оцінка біопрепаратів на основі азотфіксуючих бактерій. *Мікробіологічний журнал*. 2009. №71 (6). С. 21–26.
16. Swinton M., Lupi F., Robertson P., Hamilton S. Ecosystem services and agriculture: cultivating agricultural ecosystems to obtain various benefits. *Ecological economy*. 2017. № 64. P. 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.09.020>
17. Консорциум штаммов бактерий *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii* для производства бактериальных удобрений под кормовую свеклу и капусту: А. с. 1476831 СССР, А1 С 05F 11/08, Ю. М. Мочалов, В. И. Канивец (СССР). № 4086625/30-13; заявл. 02.07.86; опубл. 03.01.89.
18. Волкогон В. В., Надкернична О. В., Токмакова Л. М., Мельничук Т. М., Чайковська Л. О. Експериментальна ґрунтова мікробіологія : монографія / за наук. ред. В. В. Волкогона. К. : Аграрна наука, 2010. 464 с.
19. Бойчук О. Б., Зайцева Л. М. Застосування тесту коротких відрізків пшеничних колеоптилів для визначення ауксинів. *Укр. Ботан. Журнал*. 1977. № 6. С. 632–636.
20. Animal and Plant Health Inspection Service, U. S. Department of Agriculture, “Annual Report Animal Usage by Fiscal Year: Total Number of Animals Research Facilities Used in Regulated Activities (Column B)” and “Annual Report Animal Usage by Fiscal Year: Total Number of Animals Research Facilities used in Regulated Activities (Column F)” 27 Apr. 2021. Available from: <https://www.peta.org/issues/animals-used-for-experimentation/animals-used-xperimentation-factsheets/animal-experiments-overview/>
21. Резников О. Г. Загальні етичні принципи

експериментів на тваринах. *Ендокринологія*. Київ. 2003. Т. 8. № 1. С. 142–145.

22. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. Офіц. вид. 2006. № 27. С. 990, ст. 230. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>

23. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах. Офіційний вісник України. Офіц. вид. 2012. № 24. 82 с. (Нормативний документ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України. Наказ від 01.03.2012 № 249). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>

24. Barratt M. D. Prediction of toxicity from chemical structure. *Cell Biol Toxicol*. 2000. № 16. P. 1–13. <https://doi.org/10.1023/a:1007676602908>

25. Boo J. F. Knight Alternatives to Animal Testing Increasing the Implementation of *Alter-*

natives to Laboratory Animal Use. 2008. Vol. 13(3). P. 109–117. <https://doi.org/10.11232/aatex.13.109>

26. Farnfield B., Petrie A., Dennison N. Use of animals in research. *Vet. Rec*. 2017. № 181(7). P. 178–179. <https://doi.org/10.1136/vr.j3828>

27. Close B., Banister K., Baumans V. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Laboratory animal*. 1997. № 31(1). С. 1–32. <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>

28. Festing S., Wilkinson R. The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep*. 2007. № 8(6). P. 526–30. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400993>

29. Daneshian M., Busquet F., Hartung T., Leist M. Animal use for science in Europe. *Alternatives to Animal Experimentation*. 2015. № 32(4). P. 261–274. <https://doi.org/10.14573/altex.1509081>

Отримано 18.02.2022

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.35.17-27>

UDC 632.937.14:612.064

BIOSYNTHESIS OF PHYTOHORMONES AND VIRULENCE OF *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* 2.1 — *CUCUMIS SATIVUS* L. INOCULANT

S. F. Kozar, O. M. Bilokonska, N. O. Kravchenko

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

Objective. To study the properties (production of phytohormonal substances and virulence) of a new highly effective strain of associative bacteria of the genus *Azotobacter*. **Methods.** Phytohormonal activity was established by bioassays. Microbiological (obtaining a suspension of *Azotobacter chroococcum* 2.1, determining the titre by sowing on a digest medium; microscopy of stained imprint smears of the internal organs of the studied animals and cultivation of tissue samples on a digest medium) and patho-anatomical (determination of possible invasiveness and dissemination of bacteria in the tissue of internal organs of animals) methods were applied. The study was conducted on a model of outbred white mice, after oral dosing of a suspension of live bacterial cells ranged from 0.5×10^9 to 5×10^9 CFU in 0.5 cm^3 of sterile isotonic sodium chloride solution per mouse and intraperitoneal dosing ranged from 1×10^9 to 5×10^9 CFU/ 0.5 cm^3 . Statistical calculations were carried out using analysis-of-variance method. **Results.** A new *A. chroococcum* 2.1 strain synthesizes auxin-like substances more intensively than gibberellin-like and cytokinin-like substances. A 1:100 dilution of the culture fluid is the most effective. The obtained results of the studies on the possible pathogenicity of bacteria indicate that no deviations in the behaviour of mice were detected after oral dosing of a suspension of living *Azotobacter* cells. Microbiological tests of the internal organs of the experimental animals after the beginning of the tests and after 15 days revealed that *Azotobacter* is not infective, does not reproduce and does not disseminate in the body of warm-blooded animals. Intraperitoneal and oral dosing of a live cell culture suspension of *A. chroococcum* 2.1 did not cause bacterial invasion into the internal organs of white mice. Retrocultures were not detected. **Conclusion.** *A. chroococcum* 2.1 produces auxins, gibberellins and cytokinins. The parabolic na-

ture of the influence of dilutions of the culture liquid of the studied strain *A. chroococcum* 2.1 on the test cultures (wheat coleoptiles, corn mesocotyles and cucumber cotyledons) was revealed, which is a consequence of the production of phytohormonal substances. The new strain produces auxin-like substances most intensely. The obtained data indicate the avirulence of the strain for warm-blooded animals (LD_{50} intraperitoneal > 5 billion cells/mouse, LD_{50} oral > 5 billion cells/mouse). According to the data on the lack of virulence, without taking into account the levels of toxigenicity, toxicity, allergenic capacity and dysbiotic action, *A. chroococcum* 2.1 can be considered non-pathogenic.

Key words: phytohormonal substances, *Azotobacter chroococcum*, infectivity (invasiveness), virulence, pathogenicity.

REFERENCES

1. Hil, L. S., Pashkovskyy, A. I., Sulima, L. T. (2008). *Suchasni tekhnolohiyi ovochivnytstva* [Modern technologies of vegetable growing]. Vinnytsia: Nova knyha [in Ukrainian].
2. Patyka, V. P., Sherstoboyev, M. K., Tataryn, L. M., & Melnychuk, T. M. (2011). Aktyvizatsiya produktyvnoyi systemy mikroorhanizmoslyna u ovochivnytstvi [Activation of the productive system microorganism-plant in vegetable growing]. *Silskohospodarska mikrobiolohiya: dosyahnennya ta perspektyvy: Zb. nauk. Prats, Chernihiv* [in Ukrainian].
3. Volkohon, V. V. (Ed.). (2011). *Metodolohiia i praktyka vykorystannia mikrobnykh preparativ u tekhnolohiiakh vyroshchuvannia silskohospodarskykh kultur* [Methodology and practice of using microbial preparations in technologies of growing crops]. Kyiv [in Ukrainian].
4. Bilokonska, O. M., Kozar, S. F. (2020). Viability of *Azotobacter chroococcum* IMB B-7836 and their influence on cucumber productivity. *Analele Universitații din Oradea, Fascicula Biologie, XXVII*, 2. 111–115.
5. Kurdysh, I. K. (2010). *Introduktsiya mikroorhanizmv u ahroekosystemy* [Introduction of microorganisms into agroecosystems]. Kyiv: Naukova dumka [in Ukrainian].
6. Dimova, S. B. (2014). Fitohormony — produkty zhyttyediyalnosti mikroorhanizmv. Metody vyznachennya [Phytohormones — products of the vital activity of microorganisms. Methods of determination]. *Silskohospodarska mikrobiolohiya — Agricultural microbiology*, 18, 159–185 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.18.159-185>
7. Vikhe, P. S. (2014). *Azotobacter species* as a Natural Plant Hormone Synthesizer. *Research Journal of Recent Sciences*, 3, IVC, 59–63.
8. Frankenberger, W. T., Arshad, M. P. (2020). *Phytohormones in Soils: Microbial Production and Function* (1st ed.). <https://doi.org/10.1201/9780367812256>
9. Kholodnyy, N. G. (1939). *Fitogormony. Ocherki po fiziologii gormonalnykh yavleniy v rastitelnom organizme* [Phytohormones. Essays on the physiology of hormonal phenomena in the plant organism]. Kiev: Izd-vo AN USSR [in Russian].
10. Morhun, V. V., Kots, S. Ya., & Kyrychenko, E. V. (2009). Roststymulyruyushchye ryzobakteryy y ykh praktycheskoe prymerenye [Growth-stimulating rhizobacteria and their practical application]. *Fyzyolohyya y byokhymyya kulturnykh rastenyy — Physiology and biochemistry of crop plants*, 41, 3, 187–207 [in Russian].
11. Kots, S. Ya. (2011). Suchasnyy stan doslidzhen biolohichnoyi fiksatsiyi azotu [Current state of research on biological nitrogen fixation]. *Fyzyolohyya y byokhymyya kulturnykh rastenyy — Physiology and biochemistry of crop plants*, 43, 3, 212–225 [in Ukrainian].
12. Leonova, N. O., Dankevych, L. A., Drahozov, I. V., Patyka, V. P., & Iutynska, H. O. (2013). Syntez pozaklitynnnykh fitohormoniv-stymulyatoriv bulbochkovykh ta fitopatohennymy bakteriyamy soyi [Synthesis of extracellular phytohormones-stimulators by nodular and phytopathogenic bacteria of soybean]. *Dopovidi Natsionalnoyi Akademiyi Nauk Ukrayiny — Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 165–171 [in Ukrainian].
13. Kuryata, V. G., Poprotska, I. V., & Rogach, T. I. (2017). The impact of growth stimulators and retardants on the utilization of reserve lipids by sunflower seedlings. *Regulatory mechanisms in biosystems*, 8(3), 317–322. <https://doi.org/10.15421/021750>
14. Wu, C., Dickstein, R., Cary, A. J., & Norris, J. H. (1996). The auxin transport inhibitor N-(1-naphthyl) phthalamic acid elicits pseudonodules on nonnodulating mutants of white sweetclover. *Plant Physiol*, 110(2), 501–510. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.501>
15. Omelyanets, T. H., Holovach, T. M. (2009). Toksykologichna otsinka biopreparativ na osnovi azotfiksyuyuchykh bakteriy [Toxicological assessment of biological preparations based on nitrogen-fixing bacteria]. *Mikrobiolohichnyy zhurnal — Microbiological Journal*, 71 (6), 21–26 [in Ukrainian].
16. Swinton, M., Lupi, F., Robertson, P., & Hamilton, S. (2017). Ecosystem services and agriculture: cultivating agricultural ecosystems to obtain various benefits. *Ecological economy*, 64, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.09.020>
17. A. s. 1476831 SSSR, A1 S 05F 11/08. Con-

sortium of strains of bacteria *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii* for the production of bacterial fertilizers for fodder beets and cabbage, Mochalov Yu. M., Kanivets V. Y., Publ. 03.01.89 [in Russian].

18. Volkogon, V. V. (Ed.). (2010). *Eksperymentalna gruntova mikrobiologiya: monografiia* [Experimental soil microbiology: Monograph]. Kyiv: Agrarna nauka [in Ukrainian].

19. Boychuk, O. B. Zaytseva, L. M. (1977). Zastosuvannya testu korotkykh vidrizkiv pshenychnykh koleoptyliv dlya vyznachennya auksyniv [Application of the test of short segments of wheat coleoptiles for the determination of auxins]. *Ukr. Botan. Zhurnal — Ukrainian Botanical Journal*, 6, 632–636 [in Ukrainian].

20. Animal and Plant Health Inspection Service, U. S. Department of Agriculture, “Annual Report Animal Usage by Fiscal Year: Total Number of Animals Research Facilities Used in Regulated Activities (Column B)” and “Annual Report Animal Usage by Fiscal Year: Total Number of Animals Research Facilities used in Regulated Activities (Column F)” 27 Apr. 2021.

21. Reznikov, O. H. (2003). Zahalni etychni pryntsypy eksperymentiv na tvarynakh. [General ethical principles of experiments on animals]. *Endokrynolohiya — Endocrinology*, 8, 1, 142–145 [in Ukrainian].

22. Zakon Ukrainy № 3447-IV “Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokoho povodzhennya” [On the Protection of Animals from Cruelty]. Vidomosti Verkhovnoyi Rady Ukrainy. Ofits. vyd. 2006. № 27 Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> [in Ukrainian].

23. Poryadok provedennya naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh. Ofitsiyny visnyk Ukrainy [The procedure for carrying out experiments and experiments on animals by scientific institutions]. Ofits. vyd. 2012. № 24. 82 p. (Normativnyy dokument Ministerstva osvity, nauky, molodi ta sportu Ukrainy. Nakaz vid 01.03.2012 № 249) Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text> [in Ukrainian].

24. Barratt, M. D. (2000). Prediction of toxicity from chemical structure. *Cell Biol Toxicol*, 16, 1–13. <https://doi.org/10.1023/a:1007676602908>

25. Boo, J., Knight, A. (2008). Alternatives to Animal Testing Increasing the Implementation of Alternatives to Laboratory Animal Use, 13(3), 109–117. <https://doi.org/10.11232/aatex.13.109>

26. Farnfield, B., Petrie, A., & Dennison, N. (2017). Use of animals in research. *Vet. Rec.*, 181(7), 178–179. <https://doi.org/10.1136/vr.j3828>

27. Close, B., Banister, K. & Baumans, V. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Laboratory animal*, 31(1), 1–32. <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>

28. Festing, S., Wilkinson, R. (2007). The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep.*, 8(6), 526–30. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400993>

29. Daneshian, M., Busquet, F., Hartung, T., & Leist, M. (2015). Animal use for science in Europe. *Alternatives to Animal Experimentation*, 32 (4), 261–274. <https://doi.org/10.14573/altex.1509081>

Received 18.02.2022