**ОСОБЛИВОСТІ ЦИСТОУТВОРЕННЯ
У *AZOTOBACTER VINELANDII* І
AZOTOBACTER CHROOCOCCUM ЗА ВПЛИВУ
ТЕМПЕРАТУРИ І ВОЛОГОСТІ**

**Нестеренко В.М., Козар С.Ф., Жеребор Т.А.,
Усманова Т.О.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027
E-mail: isgm@ukrpost.ua

*Представлено результати досліджень впливу температури та вологості на індукування цистоутворення бактеріями *Azotobacter vinelandii* M-X, *A. chroococcum* M-70 та консорціумом *A. vinelandii* і *A. chroococcum*. Встановлено, що для утворення цист азотобактером на агаризованому живильному середовищі оптимальною є температура 44 °С. Для інцистування в порошкоподібному субстраті оптимальним є його висушування протягом п'яти діб за температури 44 °С.*

*Ключові слова: цисти, бактерії, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, живильне середовище, порошкоподібний субстрат, цистоутворення.*

Сьогодні в сільськогосподарському виробництві широко використовуються препарати на основі корисних мікроорганізмів, зокрема діазотрофів [6]. Проте актуальним залишається вдосконалення технології виробництва біопрепаратів для подовження строків їх зберігання та покращення ефективності інокуляції насіння рослин. Одним із шляхів вирішення цього завдання може бути підбір поживних середовищ і умов культивування бактерій, які б забезпечили їх максимальний вихід у стан спокою, оскільки він є способом виживання за несприятливих умов [6]. Особливо важливим є вивчення цього явища для застосування результатів при виробництві мікробних препаратів із подовженим терміном зберігання, адже в стані цист мікроорганізми можуть тривалий час зберігати свою життєдіяльність [4] і за настання сприятливих умов відновлювати активність [17].

Як відомо з літературних джерел, бактерії роду *Azotobacter* утворюють цисти [7, 18]. У цьому стані мікроорганізми стійкіші

до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища, ніж вегетативні клітини [15]. Так, вони в два рази більш стійкі до дії ультрафіолетового випромінювання, висушування, гамма-випромінювання, сонячної радіації, дії ультразвуку, проте не витримують високих температур [11, 12]. Формування цист (інцистування) індукується зміною концентрації поживних речовин у живильному середовищі [14] і додаванням до нього деяких органічних речовин (наприклад, етанолу, *n*-бутанолу і β -гідроксибутірату, тощо) [13, 21]

Метою наших досліджень було вивчити вплив температури і вологості на процес цистоутворення у бактерій *A. vinelandii* M-X, *A. chroococcum* M-70 та консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* на агаризованному живильному середовищі та у порошкоподібному субстраті.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були *A. vinelandii* M-X [1], *A. chroococcum* M-70 [2] та консорціум *A. chroococcum* і *A. vinelandii* [3], які отримано з Національної колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН.

Для одержання бактеріальної суспензії досліджувані штами вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній коливалці при 220 об./хвилину за температури 28 ± 2 °C в рідкому живильному середовищі Ешбі. Вихідний титр становив 3 млрд клітин/см³ суспензії [8, 9].

Для вивчення впливу температури на утворення цист азотобактером бактеріальну суспензію висівали поверхнево на агаризоване середовище Ешбі, після чого чашки Петрі поміщали в термостат при температурі 28 °C. Через 7 діб контрольний варіант залишали в термостаті з такою ж температурою, а інші поміщали в термостат з температурою 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C, 45 °C, 46 °C та 47 °C [22, 23].

Відсоток утворених цист підраховували кожної доби за допомогою методу фарбування фіксованого мазку з подальшим мікроскопіюванням. Фарбування цист здійснювали за методикою, запропонованою О. Вісом [23].

Кількість життєздатних клітин азотобактера визначали методом послідовних розведень з наступним висіванням на агаризоване середовище Ешбі [6].

Вплив зазначених факторів на індукування цистоутворення

азотобактером вивчали також і в порошкоподібному субстраті, який використовують у виробництві мікробного препарату АБТ [5]. З цієї метою виготовляли порошкоподібний субстрат з вологістю 25 % і 35 % та вводили в нього культури бактерій *A. vinelandii* М-Х та консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* з розрахунку 2500 млн бактеріальних клітин на 1 г субстрату. Після інкубації в термостаті розфасовували в стерильні паперові пакети і піддавали дії температури 44 °С протягом шести діб. Вологість, титр, наявність сторонньої мікрофлори, колір та зовнішній вигляд субстрату визначали кожної доби.

Результати та обговорення. Згідно досліджень О. Віса та М. Соколовського, бактерії роду *Azotobacter* утворюють цисти за висушування при температурі 40–45 °С [22, 23]. За даними польських авторів [16], цей процес активно відбувається також при додаванні в агаризоване середовище 0,3 % *n*-бутанолу при 33 °С за 5–7 діб.

У результаті вивчення впливу температур на цистоутворення у бактерій *A. vinelandii* М-Х, *A. chroococcum* М-70 та консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* нами було встановлено, що на агаризованому середовищі Ешбі цисти починають утворюватися на другу добу висушування при температурі 40 °С і вище.

Рис. 1. Вегетативні клітини *A. vinelandii* М-Х (світлова мікроскопія, $\times 640$)

На рисунку 1 показано вегетативні клітини *A. vinelandii* М-Х, які зафарбовувалися у світло-зелений колір. За дії високих температур досліджувані бактерії утворили цисти, про що свідчить рисунок 2. Циста азотобактера має сферичну форму і складається з центрального тіла (зменшеної копії вегетативної клітини з великою кількістю вакуолей) і двошарової оболонки. Внутрішня її частина назива-

ється інтима і має волокнисту будову, а зовнішня – екзина і представлена структурою, що оточує цисту та має гексагональну кристалічну будову. Центральна зона цисти *A. vinelandii* М-Х зафарбувалася в темно-зелений колір, екзина – в червоно-коричневий, а між ними – прозора зона (інтима).

Рис. 2. Цисти *A. vinelandii* М-Х (світлова мікроскопія, $\times 640$)

1 – екзина (зовнішня оболонка); 2 – інтіма (внутрішня оболонка); 3 – центральне тіло (центральна зона)

Результати проведених досліджень свідчать про те, що кількість цист істотно зростає на шосту добу при висушуванні (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив температури на інтенсивність утворення цист азотобактером (шоста доба дії температури)

Штами бактерій	Температура, °C						
	28	42	43	44	45	46	47
	кількість цист, %						
<i>A. vinelandii</i> М-Х	0	46,2 $\pm$ 0,9	48,5 $\pm$ 0,8	50,2 $\pm$ 0,5	50,3 $\pm$ 0,2	50,2 $\pm$ 1,0	50,4 $\pm$ 1,2
<i>A. chroococcum</i> М-70	0	49,3 $\pm$ 1,5	51,2 $\pm$ 1,0	52,3 $\pm$ 0,5	52,3 $\pm$ 2,0	52,4 $\pm$ 1,4	52,3 $\pm$ 1,5
Консорціум <i>A. chroococcum</i> і <i>A. vinelandii</i>	0	48,8 $\pm$ 0,8	49,5 $\pm$ 0,8	51,0 $\pm$ 0,8	51,2 $\pm$ 0,7	51,1 $\pm$ 1,1	51,0 $\pm$ 1,0

Найбільше цист утворювалося за дії 44 °C і вище. Так, за впливу цієї температури у *A. vinelandii* М-Х у стан спокою перейшло 50 % клітин, у *A. chroococcum* М-70 – 52 %, у консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* – 51 %. При подальшому збільшенні температури відсоток цист практично не змінювався.

Крім того, визначали кількість життєздатних клітин азотобактера після впливу на них високих температур (табл. 2). Встановлено, що цей показник був відносно сталим до шостої доби досліджень, а починаючи з сьомої – істотно зменшувався.

Таблиця 2. Вплив температури на кількість життєздатних клітин азотобактера (шоста доба дії температури)

Штами бактерій	Температура, °C						
	28	42	43	44	45	46	47
	кількість життєздатних бактеріальних клітин, млрд клітин/1 чашку						
<i>A. vinelandii</i> М-Х	8,3±1,1	8,0±0,9	7,8±0,5	7,6±0,5	7,3±0,8	7,0±1,2	6,3±0,8
<i>A. chroococcum</i> М-70	9,2±1,0	9,0±0,9	9,0±1,2	9,0±0,8	8,5±0,6	8,4±0,8	8,3±0,8
Консорціум <i>A. chroococcum</i> і <i>A. vinelandii</i>	10,0±0,8	9,8±1,1	9,5±0,8	9,4±0,8	8,3±0,7	8,2±0,4	8,2±0,2

Таким чином, максимальна кількість клітин азотобактера переходить у стан цист вже за температури 44 °C на шосту добу після початку висушування, а кількість життєздатних клітин у цей період є відносно сталою. Отримані дані свідчать про те, що температура 44 °C є оптимальною для утворення цист *A. vinelandii* М-Х, *A. chroococcum* М-70 та консорціумом *A. chroococcum* і *A. vinelandii*.

З врахуванням отриманих даних досліджували особливості інцистування бактерій роду *Azotobacter* у порошкоподібному субстраті. Оскільки штам *A. vinelandii* М-Х та консорціум *A. chroococcum* і *A. vinelandii* ефективніші при вирощуванні овочевих культур, ніж *A. chroococcum* М-70, то подальші дослідження проводили саме з ними. Для цього виготовляли партію субстратів з вологістю 25 % і 35 % і вводили в них культури мікроорганізмів *A. vinelandii* М-Х та консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* з розрахунку 2500 млн бактеріальних клітин на 1 г. Після інкубації в термостаті, субстрати розфасували в стерильні паперові пакети і піддавали дії температури 44 °C протягом шести діб.

Дані, наведені в табл. 3 і 4, свідчать про те, що в субстратах із вологістю до інокуляції 25 % та розрахунковим титром 2500 млн бактеріальних клітин на четверту добу висушування чисельність клітин консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* та *A. vinelandii* М-Х становила 2763 та 2168 млн/г субстрату, на п'яту добу – 1972 та 1635 млн/г, відповідно. Слід зазначити, що після чотирьох діб висушування вологість субстрату, інокульованого *A. vinelandii* М-Х,

становила 4,1 %, а у варіанті з консорціумом азотобактера – 3,2 %.

Таблиця 3. Чисельність клітин *A. chroococcum* і *A. vinelandii* за висушування в порошкоподібному субстраті

Досліджувані показники	Тривалість висушування, діб				
	1	2	3	4	5
Початкова вологість 35 %					
Вологість субстрату, %	35,3±0,3	26,5±0,3	18,4±0,3	15,5±0,2	15,5±0,2
Кількість життєздатних клітин в 1 г, млн	6127±87,6	5263±62,3	3602±82,3	2145±76,2	1104±48,5
Початкова вологість 25 %					
Вологість субстрату, %	26,1±0,4	18,1±0,2	9,2±0,4	3,2±0,3	2,8±0,1
Кількість життєздатних клітин в 1 г, млн	5236±92,3	4122±72,0	3628±80,5	2763±36,8	1972±76,2

Таблиця 4. Чисельність клітин *A. vinelandii* M-X за висушування в порошкоподібному субстраті

Досліджувані показники	Тривалість висушування, діб				
	1	2	3	4	5
Початкова вологість 35 %					
Вологість субстрату, %	35,5±0,5	19,9±0,2	15,0±0,3	12,5±0,6	7,3±0,2
Кількість життєздатних клітин в 1 г, млн	5236±11,6	4372±59,6	3220±64,1	2232±87,6	1386±39,8
Початкова вологість 25 %					
Вологість субстрату, %	23,3±0,2	19,4±0,4	10,3±0,4	4,1±0,4	3,7±0,7
Кількість життєздатних клітин в 1 г, млн	4642±87,6	3526±67,1	2968±48,3	2168±64,8	1635±46,4

Вміст життєздатних клітин азотобактера у субстраті з вологістю до інокуляції 35 % та вмістом 2500 млн бактеріальних клітин/1 г на п'яту добу дії підвищеної температури становив для консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* 1104 млн життєздатних

клітин в 1 г, та для *A. vinelandii* М-Х – 1386 млн життєздатних клітин в 1 г субстрату, що відповідно на 78 % та на 18 %, нижче, ніж у варіанті з початковою вологістю 25 %.

Отже, оптимальними умовами для утворення цист *A. vinelandii* М-Х та консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* в порошкоподібній субстраті є висушування протягом п'яти діб при температурі 44 °С з вихідною вологістю субстрату 25 %. Отримані дані з утворенням цист в у порошкоподібних субстратах можуть бути використані для вдосконалення препарату на основі консорціуму *A. chroococcum* і *A. vinelandii* та на основі *A. vinelandii* М-Х.

1. А.с. 1459183 СССР, МКИ⁴ С 05 F 11/08, С 12 N 1/20, С 12 R 1:065. Штамм бактерій *Azotobacter vinelandii* для производства бактериального удобрения под кормовую свеклу /Ю.М. Мочалов, В.И. Канивец. – № 4133167/31-13; заявл. 08.10.86.

2. А.с. 1459184 СССР С05F11/08, С12№1/20// (С12№1/20, С12R1:065) Штамм бактерій *Azotobacter chroococcum* для производства удобрения азотобактерина под кормовую свёклу и овощные культуры /Ю.М. Мочалов. – Опубл. 03.01.89.

3. А.с. 1476831 СССР, МКИ⁴ С 05 F11/08. Консорциум штаммов бактерій *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter vinelandii* для производства бактериальных удобрений под кормовую свеклу и капусту /Ю.М. Мочалов, В.И. Канивец. – Заявл. 02.07.86. – Опубл. 03.01.1989.

4. Біологічний азот /[В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін.]. – К.: Світ, 2003. – 422 с.

5. Дослідно-промисловий регламент на виробництво біопрепарату АБТ. – Чернігів, 2010. – 47 с.

6. Експериментальна ґрунтова мікробіологія /[В.В. Волкогон., О.В. Надкернична, Л.М. Токмакова та ін.]. – К.: Аграрна наука, 2010. – 463 с.

7. Определитель бактерий Берджи /под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.

8. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии /Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 296 с.

9. Теппер Е.З. Практикум по микробиологии /Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева; под ред. В.К. Шильниковой. – [6-е изд.]. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.

10. Flores-Mireles A.L. Molecular Characterization of Diazotrophic and Denitrifying Bacteria Associated with Mangrove Roots /Flores-Mireles A.L., Winans S.C., Holguin G. //Appl. and Environ. Microbiol. – 2007. – Т. 73,

№ 22. – P. 7308–7321.

11. Funa N. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii* /Funa N., Ozawa H., Hirata A., Horinouchi S. //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – T. 103, № 16. – P. 6356–6361.

12. Gama-Castro S. *Azotobacter vinelandii* Aldehyde Dehydrogenase Regulated by 54: Role in Alcohol Catabolism and Encystment /Gama-Castro S., Núñez C., Segura D. [et al.] //J. Bacteriol. – 2001. – T. 183, № 21. – P. 6169–6174.

13. Gandora V. Abundance of *Azotobacter* in great soil groups of North-West Himalayas /Gandora V., Gupta R., Bhardwaj K. //J. of the Indian Society of Soil Sci. – 1998. – T. 46, № 3. – P. 379–383.

14. Lin L.P. Ultrastructural and physiological changes occurring upon germination and outgrowth of *Azotobacter vinelandii* cysts /Lin L.P., Pankratz S., Sadoff H.L. //J. Bacteriol. – 1978. – T. 135, № 2. – P. 641–646.

15. Loperfido B. Germination of *Azotobacter vinelandii* Cysts: Sequence of Macromolecular Synthesis and Nitrogen Fixation /Loperfido B., Sadoff H. //J. Bacteriol. – 1973. – T. 112, № 2. – P. 841–846.

16. Martyniuk S. Occurrence of *Azotobacter* spp. in Some Polish Soils /Martyniuk S., Martyniuk M. //Polish J. of Environ. Studies. – 2003. – T. 12, № 3. – P. 371–374.

17. Nicholson W. Bacterial endospores and their significance in stress resistance /Nicholson W., Fajardo-Cavazos P., Rebeil R. [et al.] //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – P. 27–32.

18. Nicholson W. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight /Nicholson W., Schuerger A., Setlow P. //Mutat Res. – 2005. – Vol. 571. – P. 249–264.

19. Pope L. Outer Layers of the *Azotobacter vinelandii* Cyst /Pope L., Wyss O. //J. Bacteriol. – 1970. – T. 102, № 1. – P. 234–239.

20. Sadoff H.L. Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii* /Sadoff H.L. //Microbiol. Rev. – 1975. – T. 39, № 4. – P. 516–539.

21. Tejera N. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere /Tejera N., Lluch C., Martínez-Toledo M.V., González-López J. //Plant and Soil. – 2005. – T. 270, № 1–2. – P. 223–232.

22. Vreeland R. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal /Vreeland R., Rosenzweig W., Powers D. //Nature. – 2000. – Vol. 407. – P. 116–136.

23. Wyss O. Development and germination of the *Azotobacter* cyst /Wyss O., Neumann M., Socolofsky M. //J. Biophysical and Biochemical Cytology. – 1961. – № 10. – P. 555–565.

ОСОБЕННОСТИ ЦИСТООБРАЗОВАНИЯ У *AZOTOBACTER VINELANDII* И *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ

**Нестеренко В.М., Козар С.Ф., Жеребор Т.А.,
Усманова Т.О.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН,
г. Чернигов

*Представлены результаты исследований влияния температуры и влажности на индуцирование цистообразования бактериями *A. vinelandii* M-X, *A. chroococcum* M-70 и консорциумом *A. vinelandii* и *A. chroococcum*. Определено, что для образования цист этими бактериями на агаризованой питательной среде оптимальной является температура 44 °С. Для инцистирования в порошкообразном субстрате оптимальным является его высушивание в течении пяти суток при температуре 44 °С.*

*Ключевые слова: цисты, бактерии, *Azotobacter vinelandii* и *Azotobacter chroococcum*, питательная среда, порошкообразный субстрат, цистообразование.*

FEATURES OF CYST FORMATION IN *AZOTOBACTER VINELANDII* AND *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* UNDER THE INFLUENCE OF TEMPERATURE AND HUMIDITY

Nesterenko V.M., Kozar S.F., Zherebor T.A., Usmanova T.O.

Institute of Agricultural Microbiology NAAS, Chernihiv

*The paper studies the influence of temperature and humidity on the induction of cyst formation by the bacteria *A. vinelandii* M-X, *A. chroococcum* M-70 and consortium of *A. vinelandii* and *A. chroococcum*. It was shown that temperature 44 °C was the optimal for cyst formation by *Azotobacter* in nutrient agar medium. Its drying for 5 days at this temperature (44 °C) is optimal for encystment in the powdered substrate.*

*Key words: cysts, bacteria, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, nutrient medium, powdered substrate, cyst formation.*