

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного

На правах рукопису

ТИТОВА Людмила Вячеславівна

ФІЗІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *Azotobacter*
ПРИ ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З ДИСПЕРСНИМИ МАТЕРІАЛАМИ

03.00.07 - мікробіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії мікробіологічних процесів на твердих поверхнях та у відділі загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України.

Наукові керівники:

доктор біологічних наук, професор

А.Ф.Антипчук

доктор біологічних наук

І.К.Курдиш

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор

Р.І.Гвоздяк

кандидат біологічних наук

Є.К.Дубовенко

Провідна організація: Інститут фізіології рослин та генетики НАН України.

Захист дисертації відбудеться 1 червня 1994 р. о 10⁰⁰ на засіданні спеціалізованої ради Д 016.06.01 при Інституті мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України за адресою: 253143, Київ-143, вул.Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України.

Автореферат розісланий 1 травня 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук

Луринська —

Л.М.Пурин

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з актуальних проблем сьогодення є захист оточуючого середовища від забруднення хімічними сполуками, що наводять в нього у вигляді відходів промисловості, за-собів захисту рослин та мінеральних добрив. Впровадження біологічної системи землеробства дасть можливість обмежити викорис-тання продуктів хімії, зменшити таким чином їх побічну дію на людину та довкілля, а також зберегти і підвищити родючість ґрун-тів. Біологічна система землеробства передбачає застосування екологічно чистих бактеріальних добрив, у тому числі на основі азотфіксуючих мікроорганізмів.

Найбільш типовим вільноіснуючим діазотрофом є азотобак-тер. Представники цього роду не тільки покращують азотний баланс ґрунтів, а й збагачують їх амінокислотами, вітамінами, ростовими факторами та ін., що позитивно впливає на продуктивність вирощу-ваних культур та якість сільськогосподарської продукції /Рубен-чик, 1960; Зиновьева, 1962/.

Препарати на основі азотобактера почали застосовувати в СРСР з тридцятих років цього століття. Однак досі не існує ефективних технологій їх одержання. Удосконалення технологій ви-готовлення препаратів цих бактерій може базуватись на поглибле-ному вивченні фізіологічної активності азотобактера в присутності дисперсних матеріалів, які за літературними даними, часто здійсню-ють позитивний вплив на розвиток мікробних популяцій /Stotzky , 1966; Звягинцев, 1987/ та підвищують їх стійкість до дії неспри-ятливих факторів зовнішнього середовища /Fletcher , 1985; Heynen et al. , 1988/. Стосовно азотобактера такі дані в літературі поодинокі. Дослідження закономірностей взаємодії азотобактера з дисперсними матеріалами має загальноєкологічне та практичне зна-чення і може дати нові дані для більш глибокого розуміння мікро-біологічних процесів у ґрунтах та для розробки ефективних техно-логій одержання препаратів цих мікроорганізмів.

Мета роботи і завдання досліджень. Метою роботи було вив-чення фізіологічної активності бактерій роду *Azotobacter* при їх гетерофазному культивуванні з високодисперсними матеріалами.

В роботі вирішувались такі завдання:

- з'ясувати вплив дисперсних матеріалів на кінетичні та стехіометричні параметри росту азотобактера;

- вивчити вітаміноутворюючу та азотфіксуючу активність азотобактера в присутності дисперсних матеріалів;

- дослідити електроповерхневі властивості азотобактера та особливості його взаємодії з дисперсними частинками;

- визначити вплив дисперсних матеріалів на якість препаратів азотобактера.

Наукова новизна. На основі досліджень впливу високодисперсних матеріалів на фізіологічну активність азотобактера нами вперше встановлені кінетичні та стехіометричні параметри ростового процесу у цих мікроорганізмів при їх гетерофазному культивуванні. Показано, що ефект стимулювання фізіологічної активності досліджуваних бактерій високодисперсними матеріалами визначається поверхневими властивостями цих матеріалів та клітин мікроорганізмів, а також складом живильного середовища і пов'язаний з контактною взаємодією бактеріальних клітин з дисперсними частинками. Методами мікроелектрофорезу та електронної мікроскопії доведено, що взаємодія клітин азотобактера з аеросолями відбувається на всіх стадіях розвитку культури і здійснюється локально. З'ясовано, що дисперсні матеріали позитивно впливають на фізіолого-біохімічні властивості азотобактера та якість препаратів на його основі.

Практична цінність. Показана можливість значної інтенсифікації росту азотобактера при його культивуванні з високодисперсними матеріалами. В процесі дослідно-промислового випробування способу гетерофазного культивування азотобактера з аеросилом А-300 приріст клітин бактерій збільшувався у порівнянні з контролем в 1,5 рази. Встановлена стимулююча дія препаратів азотобактера, одержаних при гетерофазному культивуванні цих мікроорганізмів, на формування розсади овочевих культур. Показано, що при бактеризації насіння овочевих культур цими препаратами збільшується енергія проростання насіння огірків, приріст біомаси їх розсади та розсади капусти. Встановлено стабілізуючий вплив дисперсних матеріалів на якість сижких торфових препаратів. Результати досліджень можуть знайти застосування в біотехнології одержання біомаси азотобактера та бактеріальних добрив на його основі.

Апробація роботи. Основні результати роботи були представлені на Всесоюзному симпозиумі "Мікробіологія охорони біосфери в регіонах Урала і Северного Прикаспія" /Оренбург, 1991/; IV Все-союзній науковій конференції "Мікроорганізми в сільському господарстві" /Пушино, 1992/; I Установчому з'їзді УМТ /Одеса, 1993/.

Публікація результатів досліджень. За матеріалами роботи надруковано 7 публікацій, серед них 3 статті та авторське свідоцтво на винахід.

Структура і обсяг роботи. Робота складається із вступу, 7 розділів, заключної частини, висновків, списку літератури і додатку. Матеріал викладено на 140 сторінках машинописного тексту, містить 18 таблиць, 12 рисунків та бібліографічний покажчик з 212 джерел літератури /118 на іноземній мові/.

ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовується актуальність теми. У літературному огляді подається інформація про фізіологічні особливості бактерій роду *Azotobacter*, їх розповсюдження в природі і вплив на сільськогосподарські рослини та ґрунти. Особливу увагу приділено розгляду природи сил взаємодії мікроорганізмів з твердими поверхнями, впливу твердих матеріалів на фізіологічну активність мікроорганізмів та можливих механізмів їх взаємодії.

Розділ 3. Матеріали і методи.

Об'єктами досліджень були два види азотобактера - *Azotobacter chroococcum* 20 і *Azotobacter vinelandii* 56, які селекціоновані у відділі загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, захищені авторськими свідоцтвами та використовуються для випуску дослідних партій препарату. В експериментах використовували природний глинистий мінерал палигорськіт Черкаського родовища бентонітових глин України та синтетичний високодисперсний матеріал на основі діоксиду кремнію - аеросил А-300 /ГОСТ 1422-77/ і його модифіковані форми, які випускаються дослідним виробництвом Інституту хімії поверхні НАН України.

Культивування мікроорганізмів в залежності від мети дос-

ліджен проводили в періодичному режимі в колбах Ерленмейера, на АНКУМ-2 та в герметичних культиваторах на середовищі Ешбі з сахарозою та на середовищі з мелісою /Курдиш и др., 1993/.

Газовий баланс у процесі росту азотобактера вивчали на газовому хроматографі ЛХМ-80, використовуючи детектор по теплопровідності. Для цього культивування азотобактера здійснювали в герметичних колбах. Зміну компонентного складу газових сумішей за час експерименту знаходили, визначаючи об'єми, що займали ці суміші на початку і в кінці досліджу, а також виходячи з процентного складу в них індивідуальних газів до і після культивування мікроорганізмів. Долю кожного компонента обчислювали за методом виважених площ /Айвазов, 1977/.

Електроповерхневі властивості мікроорганізмів вивчали методом мікроелектрофорезу /Аболіна, 1980/ на спеціальній установці /Глоба, Гордиенко, 1980/. Визначали швидкість електрофорезу 50-100 клітин бактерій або частинок дисперсних матеріалів та за відомими формулами розраховували їх дзета- потенціал /Марков, 1965/.

Наявність сорбційної взаємодії між частинками діоксиду кремнію та клітинами бактерій встановлювали методом електронної мікроскопії / Уиклі, 1975/ та методом мікроелектрофорезу /Marshall, 1969/.

Вміст вітамінів групи В в культурах азотобактера оцінювали за методом О.М.Одинцоваї з використанням індикаторної культури *Debaryomyces dispersus* /Одинцова, 1959/.

Вміст загального азоту в клітинних суспензіях знаходили шляхом спалювання за Кельдалем з подальшою перегонкою за Конвеєм /Аринюшкіна, 1961/.

Кількісне визначення вуглеводів в досліджуваних зразках здійснювали, використовуючи реакцію з фенолом та сірчаною кислотою /Dubois et al., 1956/.

Концентрацію P_2O_5 оцінювали методом Фіске і Суббарова /Кучеренко, 1976/. Вміст Ca^{2+} , Na^+ , K^+ аналізували на полумієновому абсорбційному спектрофотометрі /ПАЗ-2/.

Перевірку ефективності азотобактерину, одержаного при гетерофазному культивуванні, проводили в мікрорегетаційних дослідках.

Результати експериментів оброблялись статистично /Урбах, 1964/. Розрахунки виконувались на МК-5І за стандартними програмами. Апроксимацію лінійних ділянок залежностей проводили за методом найменших квадратів /Себер, 1980/.

Розділ 4. Закономірності росту бактерій роду *Azotobacter* в умовах гетерофазного культивування з дисперсними матеріалами

Показано, що високодисперсний діоксид кремнію аеросил А-300 і його модифікована форма алюмоаеросил в різній мірі впливали на ріст окремих видів азотобактера в живильному середовищі Елбі з сахарозою. Найбільш суттєвий вплив на чисельність клітин *A. chgoosocum* 20 мав алюмоаеросил, тоді як ростова активність *A. vinelandii* 56 досягала максимальних значень в середовищі з аеросилом А-300 /табл. І/.

Таблиця І

Вплив різних аеросилів на ріст азотобактера на середовищі Елбі з сахарозою

| Тип аеросилу | <i>A. chgoosocum</i> 20 | | <i>A. vinelandii</i> 56 | |
|----------------------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| | чисельність бактерій | | | |
| | кл. · 10 ⁸ /мл | в % | кл. · 10 ⁸ /мл | в % |
| Контроль / без аеросилу / | 0,24±0,05 | 100,0 | 0,45±0,07 | 100,0 |
| Аеросил А-300, 0,05% | 0,48±0,06 | 200,0 | 0,65±0,10 | 142,9 |
| Аміноетоксинаеросил, 0,05% | 0,55±0,06 | 229,2 | 0,58±0,08 | 128,1 |
| Алюмоаеросил, 0,05% | 0,97±0,17 | 404,2 | 0,53±0,11 | 117,0 |

При культивуванні обох видів азотобактера на середовищі з мелясом максимальний приріст клітин було отримано в присутності аеросилу А-300 /табл. 2/.

Ефективність впливу високодисперсних матеріалів на ріст мікроорганізмів залежить від концентрації цих матеріалів в культуральному середовищі. Так, крива /І/ залежності титру клітин *A. chgoosocum* 20 від вмісту алюмоаеросилу в середовищі Елбі /рис. І/ має двовершинний характер. Можливо, це свідчить про наявність двох механізмів стимулюючої дії високодисперсних матеріалів на ріст цих бактерій.

Таблиця 2

Вплив різних аеросилів на ріст азотобактера на середовищі з меласою

| Тип аеросилу | <i>A. chgoosocum</i> 20 | | <i>A. vinelandii</i> 56 | |
|---------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | чисельність бактерій | | | |
| | кл./10 ⁸ /мл | в % | кл./10 ⁸ /мл | в % |
| Контроль | 5,3±0,5 | 100,0 | 2,55±0,04 | 100,0 |
| Алюмоаеросил, 0,05% | 9,2±0,6 | 173,6 | 2,63±0,04 | 103,1 |
| Аміноетоксіяеросил, 0,05% | 9,3±1,3 | 175,5 | 2,65±0,10 | 103,9 |
| Аеросил А-300, 0,05% | 11,8±1,9 | 221,7 | 3,75±0,08 | 147,1 |

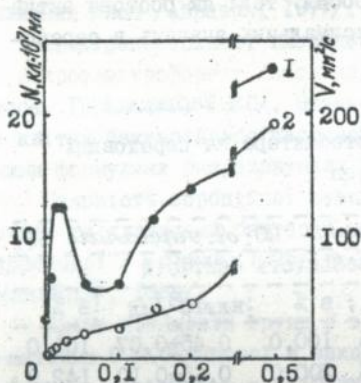


Рис. 1. Вплив різних концентрацій алюмоаеросилу /С, %- абсциса/ на ріст *A. chgoosocum* 20 /1/ та кінематичну в'язкість клітинної суспензії /2/.

Кінцева густина культури через 48 годин у варіантах з концентраціями алюмоаеросилу 0,02% і 0,5% була відповідно в 4 і 7 разів більшою від контрольної, а кінематична в'язкість клітинної суспензії була вищою відповідно в 4 та 80 разів.

Значне підвищення в'язкості суспензії азотобактера при його гетерофазному культивуванні має важливе значення з екологічної точки зору, оскільки полісахариди можуть сприяти утриманню бактерій на корінні рослин і частинках ґрунту, а також їх виживанню.

При дослідженні впливу різних концентрацій аеросилу А-300 на ріст *A. vinelandii* 56 на середовищі Ешбі найбільший вплив

На чисельність клітин спостерігався при його концентрації в середовищі 0,1 і 0,2%. Кількість клітин зростала відповідно в 2 і 6 разів.

На середовищі з мелясою стимулюючий ефект від внесення аеросилу А-300 для обох видів азотобактера був виражений слабкіше, ніж на середовищі Ешбі. Максимальні показники титру клітин для *A. chroococcum* 20 перевершували контрольні в 2 рази, а для *A. vinelandii* 56 - в 1,5 рази.

З літератури відомо, що на ростову активність мікроорганізмів значний вплив можуть здійснювати глинисті мінерали /Stotzky, 1966; Haider et al., 1970; Звягинцев, 1987/. Нами встановлено, що при внесенні палигорськіту у середовище Ешбі з сахарозою найбільша кількість клітин *A. chroococcum* 20 була одержана при концентрації цього мінералу 2 г/л, а *A. vinelandii* 56 - 20-40 г/л. Чисельність клітин у порівнянні з контролем зростала відповідно в 5 і 3 рази.

На середовищі з мелясою ростова активність бактерій *A. chroococcum* 20 зростала з підвищенням концентрації палигорськіту і при його кількості 20 г/л титр клітин збільшувався у порівнянні з контролем на 52%. В той же час при вищій концентрації цього мінералу /40 г/л/ позитивний ефект був відсутній, чисельність клітин в культурі практично дорівнювала показникам контролю. На ріст *A. vinelandii* 56 на цьому середовищі максимальний вплив мав палигорськіт в концентрації 40 г/л, титр клітин зростає на 53%.

Таким чином, вплив високодисперсних матеріалів/ЕДМ/ на ріст азотобактера в значній мірі визначається складом середовища культивування та природою поверхні твердих матеріалів. Особливо помітний стимулюючий вплив на ріст цих бактерій здійснюють аеросили і палигорськіт на середовищі Ешбі. На багатокомпонентному середовищі з мелясою ефект стимулювання росту азотобактера високодисперсними матеріалами був слабкішим. Очевидно, це пов'язано з більш складним комплексом механізмів взаємодії клітин з ЕДМ, що проявляється на даному середовищі.

В експериментах по вирощуванню *A. chroococcum* 20 в періодичних умовах на АНКУМ-2 вивчена динаміка росту цих мікроорганізмів на середовищі з мелясою. Встановлено/рис.2/

що при внесенні в живильне середовище аеросилу А-300 питома швидкість росту культури азотобактера збільшувалась, максимальні показники в дослідному варіанті були в 1,5 рази вищі, ніж в контролі. Титр бактерій зростає до $1,15 \cdot 10^9$ кл/мл /в контролі становив $8 \cdot 10^7$ кл/мл/.

Таким чином, гетерофазне культивування азотобактера в присутності високодисперсних матеріалів дозволяє значно збільшити вихід культури даних мікроорганізмів з одиниці об'єму культиватора.

Цей спосіб пройшов дослідно-промислово перевірку на Київському заводі медичних препаратів та захищений авторським свідоцтвом на винахід № 1659782.

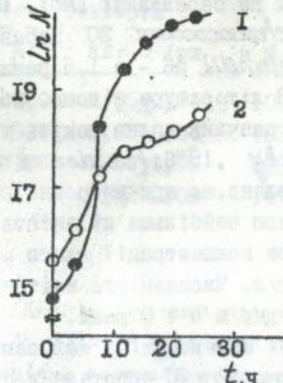


Рис.2. Динаміка росту *A. chgoosocum* 20 в умовах періодичного культивування в АНКУМ-2 з аеросилом А-300. 1 - концентрація клітин /кл/мл/ в культурі з аеросилом /1/ та без аеросилу /2/.

Для більш детального дослідження кінетичних і стехіометричних закономірностей росту азотобактера в присутності високодисперсних матеріалів нами обраний штам *A. vinelandii* 56, який культивували на середовищі Ешбі. В даних умовах ці бактерії синтезують значно менше полісахаридів, ніж *A. chgoosocum* 20. При вирощуванні в герметично закритих колбах вивчали процес накопичення клітин мікроорганізмів, використання ними вуглеводів, а також газовий баланс ростового процесу. Показано /табл. 3/, що в присутності високодисперсних матеріалів зменшувалось питома використання цукрів і кисню, а також виділення вуглекислого газу в розрахунку на 1 мільярд клітин. Виявлено, що в процесі гетерофазного культивування азотобактера зменшувався час генерації, тобто збільшувалась швидкість його розмноження. Економічний коефіцієнт використання субстрату для синтезу біомаси / $Y_{x/s}$ / збільшувався.

Таблиця 3

Вплив дисперсних матеріалів на основні параметри
ростового процесу *A. vinelandii* 56

| Варіанти дослідів | На середовищі з сахарозою | | | На середовищі з мелясою | | | |
|--|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------|------------------|-----|
| | кон-троль | з аеросилом А-300 | з палигорськітом | кон-троль | з аеросилом А-300 | з палигорськітом | |
| Параметри росту | | | | | | | |
| Приріст біомаси / $\frac{г}{л}$ / | 0,47 | 0,59 | 0,98 | 1,77 | 2,13 | 2,38 | |
| Питоме використання цукрів / $\frac{мг}{млрд.кл.}$ / | 48,3 | 25,5 | 26,7 | 7,8 | 5,8 | 7,3 | |
| $Y_{x/s}$ | 0,08 | 0,14 | 0,20 | 0,44 | 0,61 | 0,50 | |
| Час генерації / год. / | 7,0 | 6,4 | 5,3 | 5,5 | 5,1 | 4,9 | |
| Зміна об'ємів індивідуальних газів, мг/млрд.кл. | O ₂ | 18,1 | 13,7 | 15,2 | 4,6 | 4,1 | 4,0 |
| | N ₂ | 2,3 | 2,9 | 3,2 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |
| | CO ₂ | 23,0 | 19,4 | 19,6 | 5,4 | 4,7 | 4,8 |
| Дихальний коефіцієнт | 1,27 | 1,41 | 1,29 | 1,18 | 1,18 | 1,23 | |

На основі одержаних експериментальних даних ми розрахували інші стехіометричні показники досліджуваного процесу. З цієї метою склали матеріальний баланс по елементам синтезу біомаси *A. vinelandii* 56 на середовищі Ешбі з сахарозою.

Стехіометричні співвідношення утилізованих та синтезованих речовин вказують на те, що у варіантах з аеросилом та палигорськітом при утилізації 1 г сахарози азотобактером використовується більше кисню та атмосферного азоту, утворюється відповідно більше біомаси, ніж в контролі. В той же час зменшується вихід продуктів повного окислення сахарози - двоокису вуглецю та води /табл. 4/.

Таблиця 4

Стехіометричні співвідношення утилізованих та синтезованих речовин в процесі росту азотобактера

| Речовина | Використання в г в розрахунку на 1 г | | Речовина | Утворення в г в розрахунку на 1 г | |
|--------------------|---|---------|-----------------|--------------------------------------|---------|
| | сахарози | біомаси | | сахарози | біомаси |
| Контроль: | | | | | |
| Сахароза | 1,00 | 12,46 | біомаса | 0,08 | 1,00 |
| Кисень | 0,77 | 9,58 | CO ₂ | 1,40 | 17,43 |
| Азот | 0,007 | 0,092 | вода | 0,53 | 6,56 |
| З аеросилом А-300: | | | | | |
| Сахароза | 1,00 | 7,15 | біомаса | 0,14 | 1,00 |
| Кисень | 0,79 | 5,63 | CO ₂ | 1,29 | 9,23 |
| Азот | 0,013 | 0,094 | вода | 0,49 | 3,48 |
| З палигорськітом: | | | | | |
| Сахароза | 1,00 | 4,99 | біомаса | 0,20 | 1,00 |
| Кисень | 0,81 | 4,03 | CO ₂ | 1,18 | 5,90 |
| Азот | 0,019 | 0,094 | вода | 0,45 | 2,24 |

Проведені розрахунки показали, що при гетерофазному культивуванні азотобактера зростає енергетичний вихід росту і зменшуються непродуктивні затрати енергії субстрату, в тому числі зменшується тепловий ефект ферментації.

Таким чином, розраховані показники пояснюють тенденцію, виявлену при культивуванні азотобактера в присутності дисперсних матеріалів. Очевидно, в процесі гетерофазного культивування збільшується ефективність конструктивних процесів в бактеріальних клітинах.

З літератури відомо, що в деяких випадках підвищення фізіологічної активності мікроорганізмів при їх взаємодії з твердими матеріалами було пов'язано з сорбцією субстратів на поверхні даних матеріалів *Mazshman, 1981; Duff et al., 1985/*. Виходячи з цього, можна було б припустити, що підвищення інтенсивності

росту азотобактера обумовлене сорбцією компонентів середовища на твердих частинках.

Проведене нами кількісне визначення основних компонентів середовищ до і після їх взаємодії з дисперсними матеріалами показало, що введення в середовище синтетичних /в концентрації 0,05%/ та природних /в концентрації 2,0%/ дисперсних матеріалів практично не впливало на компонентний склад середовищ та їх живильну цінність, тобто істотної сорбції компонентів середовищ на поверхні частинок не відбувалось.

Таким чином, стимулювання ростової активності азотобактера не пов'язане з сорбцією компонентів середовищ на поверхні досліджуваних дисперсних матеріалів.

Вірогідно, ефект стимулювання росту азотобактера дисперсними матеріалами обумовлений контактною взаємодією клітин бактерій з частинками цих матеріалів.

Розділ 5. Електроповерхневі властивості і особливості взаємодії клітин азотобактера з високодисперсним діоксидом кремнію

Методами мікроелектрофорезу та електронної мікроскопії встановлено, що на всіх стадіях розвитку культури *A. azotofixans* 20 відбувалась контактна взаємодія бактеріальних клітин з дисперсними частинками діоксиду кремнію, причому прикріплення частинок здійснювалось у певних сайтах клітинної поверхні /Титова с соавт., 1994/.

З метою дослідження клітинної поверхні азотобактера ми вивчали рН-залежність дзета-потенціалу клітин цих мікроорганізмів, що характеризує особливості будови їх поверхні.

Проведені дослідження показали, що на електроповерхневій властивості *A. azotofixans* 20 суттєвий вплив має середовище культивування /рис.3/. Характер залежності дзета-потенціалу цих мікроорганізмів від рН оточуючого середовища /крива 2/ вказує на амфотерний тип поверхні у клітин, вирощених на середовищі з м'ясом, тобто їх заряд визначається як кислотними, так і основними іоногенними групами /аміногрупами/. Останні можуть належати поверхневим аміноцукрам або поліпептидам. Стосовно бактерій, вирощених на середовищі з м'ясом, не можна розрахувати рК іоногенних груп на

підставі отриманої кривої рН-залежності їх дзета-потенціалу. В той же час передбачається, що у клітин, які мають ізоелектричну точку / $\zeta=0$ / нижче, ніж при рН 3,0, від'ємний поверхневий заряд формується за рахунок іонізації фосфорнокислих груп /James, Brewer, 1968/.

Клітини *A. chrysococcum* 20, вирощені на середовищі Ешбі з сахарозою, не набувають позитивного заряду навіть при рН 2,0, що свідчить про відсутність аміногруп на їх поверхні в цих умовах культивування /рис.3, крива I/. Характер кривої вказує на те, що клітини покриті шаром однорідного за складом матеріалу кислотної природи. Одержані результати дозволяють розрахувати рК іоногенних груп поверхні бактерій Hartley, Roe, 1940; James, 1982/. Знайдене значення рК становить приблизно 2,5. Згідно з літературними даними /James, Brewer, 1968/, таке значення рК характерне для фосфорнокислих груп. Отже, вірогідно, в поверхневому шарі бактеріальної оболонки *A. chrysococcum* 20, вирощених на середовищі Ешбі, переважають фосфорнокислі групи.

Результати вивчення рН-залежності дзета-потенціалу клітин *A. vinelandii* 56 /рис.4/ показали, що електроповерхневі властивості цих мікроорганізмів в меншій мірі залежать від складу середовища культивування. Характер кривих вказує на те, що електроповерхневі властивості клітин *A. vinelandii* 56, вірогідніше всього, визначаються двома типами кислотних іоногенних груп. Різке збільшення від'ємного заряду в області рН 2,0-4,0 може бути пов'язане з дисоціацією фосфорнокислих груп /рК 2,3/, тоді як підвищення негативного заряду в області рН 4,0-8,0 /рК 4,85/, згідно з James /1982/, свідчить про наявність карбоксильних груп на поверхні цих бактерій.

Проведені дослідження продемонстрували відмінність у відповідній реакції бактеріальних клітин на наявність у середовищі культивування того чи іншого джерела живлення. Стосовно бактерій *A. vinelandii* 56 не спостерігається змін поверхневих властивостей клітин в залежності від умов культивування, в той час як у *A. chrysococcum* 20 відбуваються якісні зміни в поверхневому шарі.

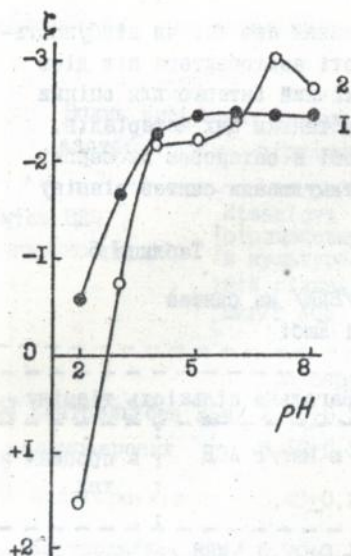


Рис.3. рН-залежність дзета-потенціалу клітин *A. chroococcum* 20, вирощених на середовищі Ешбі /1/ та на середовищі з м'ясом /2/.

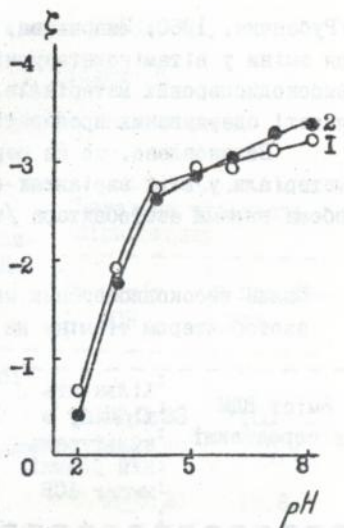


Рис.4. рН-залежність дзета-потенціалу клітин *A. vinelandii* 56, вирощених на середовищі Ешбі /1/ та на середовищі з м'ясом /2/.

Дані мікроелектрофорезу корелюють з результатами ростових експериментів, де було встановлено, що на ріст *A. vinelandii* 56 на обох середовищах максимальний вплив має один тип аеросилу /А-300/, а на ріст *A. chroococcum* 20, в залежності від складу живильного середовища, - різні марки аеросилів. Очевидно, ефективність стимулюючої дії високодисперсних матеріалів на ріст азотобактера залежить від електроповерхневих властивостей клітин, які в свою чергу обумовлені складом живильного середовища.

Розділ 6. Вплив дисперсних матеріалів на фізіолого-біохімічні властивості азотобактера.

Азотобактер належить до мікроорганізмів, що синтезують значні кількості біологічно активних речовин з групи вітамінів

/Губенчик, 1960; Зиновьева, 1962/. Питання про те, чи відбуваються зміни у вітамінсинтезуючій активності азотобактера під дією високодисперсних матеріалів, має практичний інтерес для оцінки якості одержуваних препаратів з використанням цих матеріалів.

Встановлено, що на середовищі Ешбі з сахарозою дисперсні матеріали у всіх варіантах дослідів стимулювали синтез тіаміну обома видами азотобактера /табл. 5/.

Таблиця 5

Вплив високодисперсних матеріалів /ВДМ/ на синтез азотобактером тіаміну на середовищі Ешбі

| Вміст ВДМ в середовищі | Кількість тіаміну в культураль- ній рідині, мкг/г АСБ | Сорбція тіаміну на ВДМ, % | Загальна кількість тіаміну | |
|---------------------------|---|------------------------------------|----------------------------|------------------|
| | | | в мкг/г АСБ | в процен- тах |
| <i>A. chroococcum</i> 20 | | | | |
| Контроль /без ВДМ/ | 2,71±0,86 | - | 2,71±0,86 | 100 |
| алюмоаеросил | 2,64±0,01 | 55 | 5,87±0,01 | 216,6 |
| палигорський | 2,64±0,53 | 55 | 5,87±1,17 | 216,6 |
| <i>A. vinelandii</i> 56 | | | | |
| Контроль /без ВДМ/ | 4,13±0,94 | - | 4,13±0,94 | 100 |
| аеросил А-300 | 2,66±0,63 | 55 | 5,91±1,41 | 143,1 |
| палигорський | 2,31±0,55 | 55 | 5,13±1,23 | 124,2 |

В присутності аеросилу продукція B_1 збільшувалась на 116% у *A. chroococcum* 20 і на 43% у *A. vinelandii* 56, а в присутності палигорської - відповідно на 116% і 24%. На середовищі з меласою суттєвого синтезу азотобактером тіаміну не спостерігалось.

Активність продукування азотобактером піридоксину визначалась не тільки умовами культивування, але й видовими особливостями досліджуваних мікроорганізмів. Для *A. chroococcum* 20 кра- щі показники були отримані на середовищі з меласою, для *A. vi-*

nelandii 56 - на середовищі Ешбі з сахарозою /табл. 6/.

Таблиця 6

Вплив вискодисперсних матеріалів /ВДМ/ на синтез азотобактером піридоксину

| Вміст ВДМ в середовищі | Кількість піридоксину в культураль- ній рідині, мкг/г АСБ | Сорбція піриокси- ну на ВДМ, % | Загальна кількість піридоксину | | |
|--------------------------------|---|---|-----------------------------------|------------------|-------|
| | | | в мкг/г АСБ | в процен- тах | |
| На середовищі Ешбі | | | | | |
| <i>A. chroococ- cum</i> 20 | Контроль/без ВДМ/ | 2,45±0,33 | - | 2,45±0,33 | 100 |
| | алюмоаеросил | 3,17±0,53 | не виявлена | 3,17±0,53 | 129,4 |
| | палігорськіт | 0,48±0,20 | "- | 0,48±0,20 | 19,6 |
| <i>A. vinelandii</i> 56 | Контроль/без ВДМ/ | 0,70±0,13 | - | 0,70±0,13 | 100 |
| | аеросил А-300 | 0,55±0,15 | не виявлена | 0,55±0,15 | 78,6 |
| | палігорськіт | 4,89±2,20 | "- | 4,89±2,20 | 698,6 |
| На середовищі з мелясою | | | | | |
| <i>A. chroococ- cum</i> 20 | Контроль/без ВДМ/ | 0,28±0,01 | - | 0,28±0,01 | 100 |
| | аеросил А-300 | 0,73±0,05 | 20 | 0,91±0,062 | 325 |
| | палігорськіт | 0,51±0,01 | 70 | 1,7±0,034 | 607 |
| <i>A. vinelandii</i> 56 | Контроль/без ВДМ/ | 0,30±0,09 | - | 0,3±0,09 | 100 |
| | аеросил А-300 | 0,17±0,046 | 20 | 0,21±0,06 | 70 |
| | палігорськіт | 0,12±0,013 | 70 | 0,4±0,04 | 133 |

Слід відзначити, що при культивуванні *A. vinelandii* 56 на середовищі Ешбі продукція цими мікроорганізмами вітаміну B₆ збільшувалась тільки в присутності палігорськіту /майже в 7 разів/, а його синтез бактеріями *A. chroococum* 20 - тільки в присутності алюмоаеросилу /в 1,3 рази/. На середовищі з мелясою в культурі *A. chroococum* 20 збільшувався вміст піридоксину в присутності аеросилу в 3 рази, а в присутності глинистого мінералу - в 6 разів. У *A. vinelandii* 56 на цьому середовищі ефект

стимулювання синтезу піридоксину проявлявся тільки при наявності палигорськіту /в 1,3 рази/.

Вивчення азотфіксуючої здатності азотобактера показало, що на середовищі Ялібі з палигорськітом вміст азоту у розрахунку на 1 г вискристаного цукру в культурі *A. chroococcum* 20 збільшувався на 30%, а в культурі *A. vinelandii* 56 - на 70%. При культивуванні з аеросилом цей показник для *A. chroococcum* 20 збільшувався також на 30%, а для *A. vinelandii* 56 - був на рівні контролю /табл. 7/.

Таблиця 7

Вплив високодисперсних матеріалів на вміст загального азоту в культурах азотобактера

| Вид азотобактера | Умови культивування | Вміст загального азоту | | |
|--------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------------|------------|
| | | в мг % | в мг на 1 г утилізованої сахарози | в мг/г АСБ |
| <i>A. chroococcum</i> 20 | Контроль /без ВДМ/ | 2,5±0,5 | 5,1±0,7 | 56,2±8,4 |
| | з аеросилом | 2,6±0,3 | 6,6±0,5 | 57,0±8,0 |
| | з палигорськітом | 12,5±0,5 | 6,3±0,2 | 57,9±2,9 |
| <i>A. vinelandii</i> 56 | Контроль /без ВДМ/ | 1,7±0,4 | 7,6±1,8 | 64,5±11,0 |
| | з аеросилом | 3,5±0,6 | 5,7±1,0 | 109,8±14,0 |
| | з палигорськітом | 19,0±0,2 | 12,6±0,1 | 108,9±1,0 |

Таким чином, введення дисперсних матеріалів у середовище культивування в більшості випадків істотно підвищує інтенсивність фізіологічних та біохімічних процесів, що здійснюються досліджуваними бактеріями.

Розділ 7. Вплив високодисперсних матеріалів на якість препаратів азотобактера

Ефективність рідких препаратів, отриманих при гетерофазному культивуванні азотобактера, ми перевірили в мікрорегетаційних

дослідах. Встановлено, що при бактеризації насіння огірків збільшується енергія його проростання. При обробці культурою *A. chroococcum* 20, вирощеною в присутності палигорськіту, маса розсади збільшувалась на 55%, а у випадку культивування цього штаму з аеросилом - на 58% /табл. 8/.

Таблиця 8

Вплив рідких препаратів, одержаних при гетерофазному культивуванні азотобактера, на приріст біомаси розсади овочевих культур

| Вид азотобактера | Умови культивування | Маса розсади, г сирої ваги | | |
|--------------------------|---------------------|----------------------------|-----------|-----------|
| | | огірків | капусти | томатів |
| <i>A. chroococcum</i> 20 | Без ВДМ | 1,19±0,18 | 0,76±0,13 | 0,64±0,10 |
| | з палигорськітом | 1,85±0,47 | 0,90±0,14 | 0,60±0,15 |
| | з А-300 | 1,83±0,26 | 1,10±0,35 | 0,78±0,13 |
| <i>A. vinelandii</i> 56 | Без ВДМ | 1,23±0,13 | 0,86±0,15 | 0,68±0,16 |
| | з палигорськітом | 1,41±0,23 | 0,88±0,14 | 0,48±0,14 |
| | з А-300 | 1,85±0,23 | 1,21±0,20 | 0,55±0,14 |

Бактеризація насіння цих рослин мікроорганізмами іншого виду - *A. vinelandii* 56, вирощеними з аеросилом А-300, також викликала значне стимулювання приросту розсади /табл.8/.

Достовірний приріст біомаси розсади одержано і при обробці насіння капусти *A. vinelandii* 56, вирощеним при наявності в середовищі аеросилу А-300. Приріст біомаси збільшувався на 40%. Слід відзначити збільшення довжини та розгалуженості кореневої системи рослин, бактеризованих препаратами на основі ВДМ, що сприяє покращенню живлення, а значить і прискоренню росту розсади.

Таким чином, рідкі препарати, одержані на основі азотобактера і ВДМ, збільшують швидкість росту проростків огірків і приріст біомаси розсади огірків та капусти.

Позитивний вплив на розсаду томатів здійснював лише препа-

рат на основі *A. chgoosocum* 20, вирощеного з аеросилом А-300.

Одним із важливих показників якості препаратів є термін їх зберігання. Вивчення впливу дисперсних матеріалів на виживання азотобактера в сильних торфових препаратах показало, що при їх зберіганні протягом 5 місяців найбільший титр клітин обох штамів цих бактерій був досягнутий у варіантах з палигорськітом. При зберіганні торфових препаратів на основі аеросилу А-300 останній не здійснював суттєвого позитивного впливу на чисельність життєздатних клітин досліджуваних культур азотобактера.

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що використання високодисперсних матеріалів у виробництві бактеріальних препаратів на основі азотобактера може бути одним із резервів гарантії їх якості при тривалому зберіганні.

В И С Н О В К И

1. Культивування азотобактера з дисперсними матеріалами призводить до підвищення ефективності ростового процесу: істотного збільшення титру клітин і швидкості росту, зменшення питомого використання вуглеводів і зростання економічного коефіцієнту споживання вуглецевого субстрату. Питоме використання кисню і виділення вуглекислоти знижується.

2. Фізіологічна реакція азотобактера на наявність в середовищі дисперсних матеріалів визначається не тільки його видовими особливостями і природою цих матеріалів, але й складом середовища.

3. Стимулювання фізіологічної активності азотобактера не пов'язане із сорбцією компонентів живильного середовища на поверхні дисперсних матеріалів.

4. Електроповерхневі властивості клітин *A. nclanai* 56 не залежать від складу середовища культивування, в той час як використання різних джерел живлення бактеріями *A. chgoosocum* 20 призводить до зміни характеру поверхні їх клітин.

5. Клітини азотобактера вступають в контактну взаємодію з високодисперсним діоксидом кремнію, яка відбувається на всіх стадіях розвитку культури і здійснюється локально.

6. Високодисперсні матеріали стимулюють синтез азотобактером тіаміну і піридоксину, а також накопичення загального азоту в культурах. В присутності палигорськіту вміст загального азоту в культурі *A. chroococcum* в розрахунку на г використаного цукру збільшувався на 23%, а в культурі *A. vinelandii* - на 64%. При культивуванні *A. chroococcum* з алумоаеросилом накопичення загального азоту зростало на 30 %.

7. Бактеризація насіння овочевих культур суспензією азотобактера, одержаною в умовах гетерофазного культивування, призводить до збільшення швидкості, розвитку проростків огірків, приросту маси їх розсади та розсади капусти. Застосування такої суспензії для виготовлення торфових препаратів значно підвищує в них вміст життєздатних клітин азотобактера.

Таким чином, використання високодисперсних матеріалів може бути перспективним у виробництві препаратів азотобактера.

Список научных работ, опубликованных по теме
диссертации

1. Курдиш И.К., Цимберг Е.А., Титова Л.В., Подгорский В.С., Чуйко А.А., Андреев Е.И., Антипчук А.Ф. Способ культивирования микроорганизмов.- Авт. свид. СССР № 1659482, 1991.
2. Цимберг Е.А., Титова Л.В., Курдиш И.К. Интенсификация производства азотфиксирующих микроорганизмов - основа для создания бактериальных удобрений. Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума "Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Северного Прикаспия", Оренбург, октябрь 1991 г., с.126-127.
3. Титова Л.В., Цимберг Е.А., Курдиш И.К., Антипчук А.Ф., Танцюренко Е.В. Использование высокодисперсных материалов в технологии культивирования азотобактера. Тезисы докладов IV Всесоюзной научной конференции "Микроорганизмы в сельском хозяйстве", Пушкино, 20-24 января 1992 г., с.195-196.
4. Курдиш И.К., Титова Л.В., Цимберг Е.А., Антипчук А.Ф., Танцюренко Е.В. Влияние аэросилов на рост *Azotobacter chroococcum* //Микробиол. журн.. - 1993.-55, № 1, с.38-42.
5. Титова Л.В., Цимберг Е.А. Закономерности роста микроорганизмов рода *Azotobacter* при культивировании с высокодисперсными материалами. Тезисы докладов I Учредительного съезда УМО, Одесса, август 1993 г.//Микробиол.журн., - 1994. - 56, № 2.-С.56.
6. Титова Л.В., Антипчук А.Ф., Курдиш И.К., Скочинская Н.Н., Танцюренко Е.В. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность бактерий рода *Azotobacter* //Микробиол.журн.- 1994. - 56, № 2.-С.21-31.
7. Титова Л.В., Гордиенко А.С., Курдиш И.К. Особенности взаимодействия *Azotobacter chroococcum* с высокодисперсным диоксидом кремния//Микробиол.журн., - 1994. - 56, № 4.-С.38-46.

Анн
В

Підписано до друку 29.04.94р формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк. л. I, O. Тираж 100примірник. Заказ №721
Надруковано ЦУОП ДНПІ "Плодвиконсерв" м. Київ , Саксаганського , 1

45202A

AB 30.041