

ВПЛИВ ВЕРМИКУЛІТУ НА РІСТ І ЗБЕРІГАННЯ *MESORHIZOBIUM CICERI* H-12 У ГЕТЕРОФАЗНОМУ ПРЕПАРАТІ

Каменєва І.О.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. К. Маркса, 107, смт. Гвардійське, Сімферопольський р-н,
АР Крим, 97513, Україна
E-mail: irina.kameneva.7@mail.ru

*Показано, що вермикуліт з розміром часток до 1 мм (2 % від об'єму середовища) є важливим технологічним компонентом для отримання гетерофазного препарату *Mesorhizobium ciceri* H-12 з високим титром бактерій і строком зберігання життєздатності та нодулюючої активності клітин до трьох місяців.*

*Ключові слова: *Mesorhizobium ciceri*, титр, життєздатність, нодулююча активність.*

У мікробіологічному виробництві актуальною проблемою є пошук нових та удосконалення існуючих препаративних форм на основі живих культур агрономічно цінних бактерій. Тому дослідження факторів, які впливають на тривалість зберігання життєздатності клітин, є одним із важливих завдань при розробці технології виготовлення біопрепаратів.

Бактеріальні суспензії, завдяки спрощеній технології виготовлення та застосування, були і залишаються найпоширенішою формою інокулюму для передпосівної обробки насіння сільськогосподарських культур, проте термін зберігання життєздатності клітин у них, як правило, не перевищує 14-25 діб [1, 2].

Мікроорганізми в природі, зокрема в ґрунті, знаходяться в адсорбованому на твердих частках стані [3], зберігаючи тривалий час життєздатність, тому в технології виготовлення бактеріальних препаратів використовують різні сорбенти-носії: торф, лігнін, вермикуліт та інші. При цьому титр бактерій зберігається до шести і більше місяців, але препарат виявляється дещо незручним при застосуванні. Обнадійливою в цьому плані є інформація про позитивний вплив високодисперсних речовин на життєздатність та підвищення фізіологічної активності мікроорганізмів [4, 5].

У завдання наших досліджень входило підібрати оптимальні за кількістю і якістю дисперсні речовини, вивчити їх вплив на життєздатність клітин ризобій нуту і розробити препаративну форму, яка б мала переваги як рідкого препарату при виготовленні й застосуванні, так і сипучого (умовна назва – гетерофазний препарат) – за терміном зберігання.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували попередньо селекціонований високоефективний і технологічний штам *Mesorhizobium ciceri* Н-12 [6].

Гетерофазний препарат отримували за умов періодичного культивування *M. ciceri* Н-12 у рідкому поживному середовищі з внесенням вермикуліту розміром часток не більше 1 мм. Швидкість обертів качалки складала 220 об./хв, температура культивування – 25-28 °С. Тривалість культивування – 72 години з моменту інокуляції середовища. Титр життєздатних клітин визначали при висіві розведень бактеріальної суспензії в агаризоване горохове середовище [7]. Динаміку росту вивчали за умов періодичного культивування *M. ciceri* Н-12 в робочому та гетерофазному середовищах і розраховували кінетичні показники [8].

Оптимальну концентрацію вермикуліту встановлювали експериментально [9]. При плануванні експерименту за основний рівень брали 2 % вермикуліту від об'єму рідини за аналогією виготовлення геліних препаратів [10]. Критерієм оптимальної кількості вермикуліту в середовищі був титр культури *M. ciceri* Н-12 та тривалість його зберігання. Нодулюючу активність культури вивчали у вегетаційних дослідах. Рослини нуту сорту Александрит вирощували в посудинах об'ємом 250 мл на вермикулітному субстраті в умовах теплиці. Статистичну обробку даних проводили загальноприйнятими методами [11].

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що внесення у виробниче поживне середовище 2 % вермикуліту розміром часток до 1 мм дозволяє підвищити титр клітин *M. ciceri* Н-12 на 12,9 % і зберігати їх життєздатність упродовж трьох місяців (рис. 1).

Підбір складових поживного середовища для збільшення кількості клітин у препараті і забезпечення тривалого збереження їх життєздатності залишається одним з важливих технологічних прийомів підвищення якості препаратів.

В умовах періодичного культивування вивчено вплив

різної кількості вермикуліту на життєздатність *M. ciceri* Н-12 в гетерофазному середовищі (табл. 1). Результати експерименту свідчать, що за вмісту 2 та 5% вермикуліту у виробничому середовищі через два місяці зберігання титр клітин складає близько 5 млрд/мл, а через три місяці різко зменшується (майже в 5 і 7 разів, відповідно), але залишається на достатньо високому для інокуляції насіння нуту рівні.

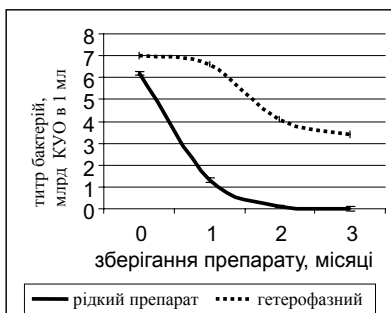


Рис. 1. Вплив вермикуліту на термін зберігання життєздатності клітин *Mesorhizobium ciceri* Н-12 в рідкому середовищі

Таблиця 1. Зберігання життєздатності клітин *Mesorhizobium ciceri* Н-12 у гетерофазному середовищі в залежності від вмісту вермикуліту

| Вміст вермикуліту, % | Титр клітин, млрд/мл | | | |
|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | вихідний | 1 місяць зберігання | 2 місяці зберігання | 3 місяці зберігання |
| 0,5 | 8,8±0,10 | 0,7±0,15 | 1,0±0,06 | 0,06±0,00 |
| 2,0 | 8,0±0,07 | 6,6±0,18 | 4,8±0,15 | 1,0±0,00 |
| 5,0 | 8,9±0,09 | 7,6 ±0,03 | 5,4±0,15 | 0,8±0,01 |

При періодичному культивуванні бактерій цикл розвитку культур умовно поділяється на ряд певних фаз [8]. При цьому в практичній площині найбільш важливим є період максимальної швидкості розмноження клітин (експоненційна фаза росту), яка у *M. ciceri* Н-12 починається через 16-20 годин культивування в залежності від типу середовища (рис. 2).

Максимальний титр бактерій у рідкому і гетерофазному середовищах складає відповідно 6,5 і 10,0 млрд/мл через 52 і 48 годин культивування і через 72 години чисельність клітин

зменшується до 5,9 і 6,9 млрд/мл, відповідно.

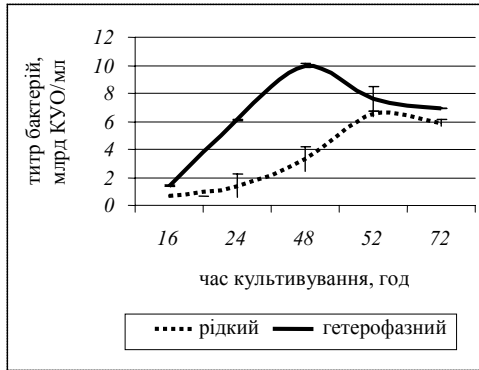


Рис. 2. Динаміка росту *M. ciceri* H-12 у рідкому і гетерофазному середовищах

За кінетичними показниками встановлено, що тривалість генерації (3,8 год.) у гетерофазному середовищі в 2 рази менша, ніж у рідкому (7,7 год.), а кількість поколінь за добу збільшується у 2 рази (табл. 2).

Однією із важливих характеристик препаратів на основі бульбочкових бактерій є зберігання їх нодулюючої активності. При обробці насіння нуту гетерофазним препаратом після трьох місяців зберігання відмічено утворення бульбочок на коренях 100 % рослин, тоді як у варіанті з рідким препаратом з таким же терміном зберігання бульбочки не утворювались. При застосуванні свіжовиготовлених препаратів усі рослини мали бульбочки на коренях.

Таблиця 2. Кінетика росту ризобій нуту в рідкому та гетерофазному препаратах

| Показники | Препарати | |
|---|-----------|--------------|
| | рідкий | гетерофазний |
| Максимальний титр бактерій, млрд в 1 мл* | 6,5 | 10,0 |
| Абсолютна швидкість росту, млрд в 1мл/год | 0,2 | 0,6 |
| Питома швидкість росту, год ⁻¹ | 0,1 | 0,2 |
| Час генерацій, годин | 7,7 | 3,8 |
| Кількість поколінь за добу | 3,1 | 6,3 |

Примітка: * – максимальний титр для культури

Таким чином, показано, що внесення вермикуліту з розміром часток до 1 мм позитивно впливає на ріст *M. ciceri* Н-12 і забезпечує титр культури в фазу експоненційного росту до 10 млрд/мл. Встановлено, що вермикуліт (2 % від об'єму середовища) є важливим технологічним компонентом для отримання гетерофазного препарату *M. ciceri* Н-12 з титром 6,9 – 8,0 млрд/мл і строком зберігання життєздатності та нодулюючої активності клітин до трьох місяців.

1. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе /А.В. Хотянович. – Л, 1991. – 60 с.

2. Биопрепараты азотфиксирующих бактерий: проблемы и перспективы применения /Е.В. Шерстобоева, И.А. Дудинова, С.Н. Крамаренко, Н.К. Шерстобоев //Мікробіол. журн. – 1997. – Т. 59, № 4 – С. 109-116.

3. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза /В.И. Яковлев. – Л.: Химия, 1987. – 272 с.

4. Влияние высокодисперсного кремнезема и его модификаций на ростовую активность клубеньковых бактерий люцерны /А.Ф. Антипчук, В.И. Богомаз, Н.П. Свеста [и др.] //Мікробіол. журн. – 1995. – Т. 57, № 1. – С. 54-59.

5. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика /И.К. Курдиш. – К.: Квіц, 2001. – 142 с.

6. Пат. 17664 Україна, МПК (2006) С 12 N 1/00 С 12 P 1/04. Штамм бульбочкових бактерій *Mesorhizobium ciceri* Н-12, ативний симбіотичний азотфіксатор, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує врожайність нуту /М. З. Толкачев, С.В. Дідович, І.О. Каменева. – заявл. 13.03.2006; опубл. 16.10.2006, Бюл. № 10.

7. Большой практикум по микробиологии /под ред. Г.Л. Селибера. – М.: Высшая школа, 1962. – 492 с.

8. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія /Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2004. – С. 124-125.

9. Максимов В.Н. Математическое планирование биологических экспериментов /Максимов В.Н., Федоров В.Д. //Математические методы в биологии (Итоги науки ВИНТИ АН СССР, 1968). – М., 1969. – С. 88-115.

10. Пат. 56032 Україна, МПК (2002) С 12 N 1/00 С 12 P 1/04. Спосіб виготовлення препарату на основі азотфіксуючих бактерій-продуцентів екзополісахаридів /В.П. Патица, Т.М. Мельничук, М.К. Шерстобоев та ін. – заявл. 12.09.2002; опубл. 17.01.2005, Бюл. № 1.

11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /А.Б. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

ВЛИЯНИЕ ВЕРМИКУЛИТА НА РОСТ И ХРАНЕНИЕ *MESORHIZOBIUM CICERI* H-12 В ГЕТЕРОФАЗНОМ ПРЕПАРАТЕ

Каменева И.А.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной
микробиологии УААН, Гвардейское

*Показано, что вермикулит размером частиц до 1 мм (2 % от объема среды) является важным технологичным компонентом для производства гетерофазного препарата *M. ciceri* с высоким титром бактерий и сроком сохранения жизнеспособности клеток и нодулирующей активности до трех месяцев.*

Ключевые слова: *Mesorhizobium ciceri*, титр, жизнеспособность, нодулирующая активность.

VERMICULITE INFLUENCE ON GROWTH AND STORAGE OF *MESORHIZOBIUM CICERI* H-12 IN HETEROPHASE PREPARATION

Kameneva I.A.

The South Experimental Station of Institute of Agricultural
Microbiology, UAAS, Gvardeyskoye

*It was established that vermiculite with particle size up to 1 mm (2% of the volume of the medium) is an important technology component for the production of heterophase preparation of *M. ciceri* H-12 with bacterial titer of 6,9 – 8,0 billion/ml, retention of cell viability duration and nodular activity to up to three months.*

Keywords: *Mesorhizobium ciceri*, titer, vitality, nodular activity.