

АНАЛІЗ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ РОДУ *AZOSPIRILLUM*

Дузінський М.А.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, dyzinskiy2000m@gmail.com

Abstract

Azospirillum spp. are biofertilizers that enhance plant growth via nitrogen fixation and phytohormone production. This study evaluates optimized culture media for boosting biomass yield and suitability for inoculant formulation.

Keywords: *Azospirillum spp.*, culture medium, inoculant, OAB, TYG, BTB-1, BTB-2.

Вступ. *Azospirillum spp.* – це ґрунтові бактерії, здатні стимулювати ріст рослин за допомогою фіксації атмосферного азоту, синтезу фітогормонів та поліпшення доступності поживних речовин [1, 2]. Саме ці властивості обумовлюють їх широке використання в складі біодобрив у сучасному сільському господарстві. Ефективність біопрепаратів насамперед залежить від якості інокулянтів, що у свою чергу зумовлюється умовами культивування мікроорганізмів. Одним із критично важливих факторів у цьому процесі є правильно підібране поживне середовище, яке забезпечує не лише інтенсивний ріст клітин, але й акумуляцію біологічно активних речовин (фітогормони) [3]. Зокрема, встановлено, що рівень продукції ауксинів, цитокінінів і гіберелінів *Azospirillum brasilense* значно підвищується на стаціонарній фазі росту, в залежності від типу джерела вуглецю, який використовується в поживному середовищі [3–5]. У зв'язку з цим, дослідження оптимізованих варіантів середовищ, що містять альтернативні джерела вуглецю (глюконат натрію, гліцерин), є важливим етапом удосконалення технологій масового виробництва інокулянтів.

Метою даної роботи було проведення порівняльного аналізу поживних середовищ для культивування різних штамів *Azospirillum spp.* з метою підвищення ефективності росту та визначення найбільш продуктивних умов для подальшого використання в технологіях виробництва біоінокулянтів.

Матеріали та методи. Аналіз поживних середовищ для культивування *Azospirillum spp.* відбувся на підґрунті ряду наукових робіт та інших літературних джерел в сфері досліджень бактерій роду *Azospirillum*, які широко застосовуються у виробництві мікробних інокулянтів.

Результати та обговорення. Для лабораторного культивування штамів *Azospirillum spp.* дуже широко застосовується модифіковане середовище ОАВ (Окон-*Azospirillum* бульйон), створене на основі класичного NFb (безазотне напіврідке середовище). ОАВ було покращене за рахунок підвищення буферної здатності, додавання мікроелементів (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}), джерел азоту (NH_4Cl) та невеликої кількості дріжджового екстракту для стимуляції росту клітин. Як джерела вуглецю тут використовуються органічні кислоти – яблучна та бурштинова кислоти – які є компонентами корневих ексудатів і є природними субстратами для *Azospirillum* [1].

І не зважаючи на це, середовище ОАВ не є популярним в промислових виробництвах інокулянтів, що зумовлено порівняно низькою концентрацією біомаси ($\sim 10^8$ КУО/см³ після 18 год інкубації) та повільнішим темпом росту бактерій. Час генерації в середовищі ОАВ становить 1,54–1,65 години, що є помітно довшим порівняно з оптимізованими середовищами [1, 6–7].

Схожі обмеження спостерігаються і в TYG, основою якого є триптон, дріжджовий екстракт та глюкоза. Це середовище хоч і забезпечує дещо вищу щільність клітин, однак глюкоза є неефективним джерелом вуглецю для багатьох штамів *Azospirillum*, зокрема *A. brasilense*, що є одним із найпоширеніших у виробництві інокулянтів [1, 6]. Ці бактерії проявляють досить низьку афінність до глюкози, тоді як їхній ріст значно кращий на органічних кислотах, таких як малат і сукцинат, або ж на менш поширених джерелах вуглецю – таких, як глюконат натрію і гліцерин [1].

Відтак було розроблено два нові середовища на основі TYG – ВТВ-1 (глюкоза замінена на глюконат натрію 5 г/дм³) та ВТВ-2 (глюкоза замінена на гліцерин 8 см³/дм³), які показали значно кращі результати, ніж два попередніх середовища. Зокрема, вже після 18 годин інкубації концентрація клітин сягала $\sim 10^{11}$ КУО/см³. *A. lipoferum* JA4 мав найвищу швидкість росту у ВТВ-1 із часом генерації 1,36 год, тоді як для інших штамів він варіювалася в межах 1,41–1,44 години. ВТВ-2 забезпечувало лише незначно нижчу щільність, проте є більш економічним варіантом завдяки дешевизні гліцерину [1].

Таким чином, головна причина обмеженого використання глюкози, як джерела вуглецю, полягає в її неефективному засвоєнні бактеріями *Azospirillum*. В той час як альтернативні джерела, такі як глюконат натрію та гліцерин, не лише значно покращують продуктивність, а й скорочують час нарощування біомаси, що критично важливо для промислового виробництва інокулянтів [1, 6].

Порівняльна характеристика середовищ для культивування *Azospirillum* spp. наведена в таблиці 1.

Таблиця 1. Порівняльна характеристика середовищ для культивування *Azospirillum* spp.

Середовище	Джерело вуглецю	Максимальна щільність клітин після 18 год, КУО/см ³)	Час генерації (год)	Переваги/недоліки для промислового використання	Посилання
ОАВ	Малат, сукцинат	$\sim 10^8$	1,54–1,65	Недостатній вихід біомаси	[1, 4, 6]
TYG	Глюкоза	$\sim 10^9$	1,50–1,54	Глюкоза не ефективна для роду <i>Azospirillum</i>	[1–2]
ВТВ-1	Глюконат натрію	$\sim 10^{11}$	1,36–1,44	Висока ефективність	[1]
ВТВ-2	Гліцерин	$\sim 10^{11}$	1,41–1,47	Дешева сировина та ефективно	
Живильний бульйон	Суміш компонентів	$< 10^9$	$> 1,60$	Дорога сировина та відносно нижча ефективність	[1]

В результаті проведеного аналізу досліджень, було показано, що ці середовища дозволяють отримувати стабільні результати для трьох досліджуваних штамів (*Azospirillum brasilense* Cd (штам з США), *Azospirillum brasilense* Sp6 (штам з Італії) та *Azospirillum lipoferum* JA4 (штам з Бразилії)) і можуть бути рекомендовані для промислового культивування бактерій у біотехнологічних установках [1, 6].

В той же час, у більш актуальному дослідженні [8] встановлено, що крім органічних кислот, *Azospirillum lipoferum* ефективно засвоює глюкозу та гліцерин. Зокрема, найвищу концентрацію клітин ($\sim 1,18 \cdot 10^{12}$ КУО/см³) та вихід біомаси (5,25 г/дм³) було зафіксовано вже через 24 години при використанні середовища на основі глюкози з додаванням 0,1% дріжджового екстракту [8]. Комбінація малату з дріжджовим екстрактом забезпечила нижчі, але також високі результати – $9,25 \cdot 10^{11}$ КУО/см³ і 4,13 г/дм³ відповідно. В цьому досліді гліцерин показав найменшу ефективність, хоча й забезпечував зростання при додаванні стимулюючих компонентів [8].

Результати аналізу підтверджують, що здатність до засвоєння глюкози є штам-специфічною: наприклад, *A. lipoferum* Az204 добре росте на глюкозі, тоді як більшість штамів *A. brasilense* — ні. Це також узгоджується з результатами ще однієї роботи [9], де було показано, що штамми *A. brasilense* і *A. amazonense* здатні до фіксації азоту на різних джерелах вуглецю — включно з галактозою, манітолом, сахарозою та ксилозою. Результати цього дослідження наведені в таблиці 2. Як бачимо, найвищий показник фіксації азоту (до 658 мкг N/25 см³ культуральної рідини за 72 год) показав малат, однак штам *A. brasilense* N18 продемонстрував також високу активність на галактозі (~ 280 мкг N/25 см³) [9].

Таблиця 2. Вплив джерела вуглецю на азотфіксувальну активність штамів роду *Azospirillum* [9].

Джерело вуглецю	мкг N/25 см ³ культуральної рідини за 72 год для відповідного штаму (середнє значення для 5-ти повторностей)				
	<i>A. amazonense</i> N15	<i>A. amazonense</i> N5	<i>A. brasilense</i> N2	<i>A. brasilense</i> N18	<i>A. brasilense</i> N21
Малат	658 ± 7	588 ± 8,6	616 ± 7	434 ± 7	350 ± 4,9
Манітол	28 ± 4,9	224 ± 10,8	112 ± 8,6	0	0
Галактоза	0	7 ± 4,9	14 ± 4,9	280 ± 7	84 ± 7
Глюкоза	49 ± 4	0	0	0	0
Сахароза	28 ± 4,9	28 ± 4,9	0	0	0
Ксилоза	0	0	0	0	84 ± 4,9

Висновки. Проведений порівняльний аналіз поживних середовищ для культивування *Azospirillum* spp., продемонстрував, що оптимізовані середовища ВТВ-1 (з глюконатом натрію) та ВТВ-2 (з гліцерином) забезпечили значно вищу концентрацію біомаси та відносного скорочення часу генерації. Середовище ВТВ-1 виявилось найперспективнішим для швидкості росту культур, а ВТВ-2 — більш економічно вигідним.

В той же час, аналіз ще декількох досліджень показав, що штамоспецифічна здатність *Azospirillum* до засвоєння джерел вуглецю є вирішальним чинником при формуванні інокулянтів. Наприклад, *A. lipoferum* Az204 продемонструють найвищу концентрацію клітин та вихід біомаси вже через 24 години культивування на середовищі з глюкозою та 0,1% дріжджового екстракту, тоді як більшість штамів *A. brasilense* взагалі не засвоюють глюкозу як джерело вуглецю. Крім того, штам *A. brasilense* N18 та *A. amazonense* N5 продемонстрували високу активність при використанні галактози та манітолу.

Отже, середовища ВТВ-1 і ВТВ-2 можуть бути рекомендовані для промислового виробництва інокулянтів *Azospirillum* spp., з урахуванням специфіки штаму, доступності компонентів та технологічних потреб кінцевого застосування. Також перспективними є також середовища з глюкозою для штамів *A. lipoferum*.

Список використаної літератури:

1. Bashan Y., Trejo A., de-Bashan L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 2011. Vol. 47, no. 8. P. 963–969. URL: <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0555-3>.
2. Hartmann A., Bashan Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) – Special Issue. *European Journal of Soil Biology*. 2009. Vol. 45, no. 1. P. 1–2. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.11.004>.
3. Cassán F., Díaz-Zorita M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. Vol. 103. P. 117–130. URL: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.
4. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation / D. Perrig et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007. Vol. 75, no. 5. P. 1143–1150. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0909-9>.
5. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation / F. Cassán et al. *European Journal of Soil Biology*. 2009. Vol. 45, no. 1. P. 12–19. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.003>.
6. Bashan Y., de-Bashan L. E. Inoculant preparation and formulations for *Azospirillum* spp. *Handbook for Azospirillum*. Cham, 2015. P. 469–485. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_26.
7. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *Can J Microbiol*. 1976. Vol. 4, no. 4. P. 1464–1471. URL: <https://doi.org/10.12691/aees-4-4-1>.
8. Hari Priya S. K., Vijila K. Effect of different carbon sources and growth supplements on growth and biomass production of bioinoculant *Azospirillum lipoferum* Az204. *International Journal of Plant & Soil Science*. 2023. Vol. 35, no. 20. P. 467–473. URL: <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i203828>.
9. Akond M.A., Khan Z.U.M. Role of carbon sources and heavy metals on growth and nitrogen fixing potential of *Azospirillum*. *J. Environ. Sci. (Dhaka)*. 2005. Vol. 3. P. 1–8.