

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І

ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

« ____ » _____ **2025 р.**

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**

« ____ » _____ **2025 р.**

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему ««Оптимізація технології отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum*»»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

д.с.-г.н., професор

(підпис)

Микола ЛІСОВИЙ

**Керівник магістерської
кваліфікаційної роботи**

д.с.-г.н., доцент

(підпис)

Віра БОРОДАЙ

Виконала

(підпис)

Олександра ДІХТЯРЕНКО

КИЇВ-2025

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
Олена КВАСКО
“ ____ ” _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ
РОБОТИ ЗДОБУВАЧУ
Діхтяренко Олександрі Миколаївні

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи: «Оптимізація технології отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum*»
Затверджена наказом від 15 жовтня 2024 р. № 585 «С».

Термін подання завершеної роботи на кафедру 14.11.2025 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: штами *Azotobacter chroococcum*, продуктивність, біомаса, умови культивування бактерій

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Опрацювати і дослідити літературні джерела;
2. Провести скринінг штамів *Azotobacter chroococcum* з метою виявлення найбільш продуктивних штамів; Вивчити їх культурально-морфологічні та біохімічні характеристики;
3. Вивчити вплив умов культивування з метою підвищення біологічної активності бактерій та дослідити рістстимулювальну активність бактерій.

Дата видачі завдання 10.09. 2024 року

Керівник магістерської
кваліфікаційної роботи

_____ (підпис)

Віра БОРОДАЙ

Завдання прийняла до виконання

_____ (підпис)

Олександра ДІХТЯРЕНКО

РЕФЕРАТ

Тема магістерської роботи - «Оптимізація технології отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum*».

Кваліфікаційна робота була виконана в навчально-науковій лабораторії біотехнології та клітинної інженерії на базі кафедри екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології НУБіП України протягом 2024-2025 років.

Робота виконана на 46 сторінках, складається з 3 розділів, містить 7 рисунків, 3 таблиці, 4 діаграми, 41 використане джерело.

Мета роботи: Основною метою дослідження є оптимізування технології отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum*, а саме умов культивування штамів, з метою отримання підвищення біологічної активності бактерій, отримання більшої кількості посівного матеріалу.

Об'єкт досліджень: оптимізація умов культивування штамів *Azotobacter chroococcum*.

Предмет досліджень: штами *Azotobacter chroococcum*, продуктивність, живильні середовища, умови культивування, рістстимуляція

Методи дослідження: емпіричні (експеримент, спостереження, опис), мікробіологічні та біохімічні (дослідження біологічних особливостей штамів), біотехнологічні (культивування бактерій на живильних середовищах), статистичні.

Результати досліджень: проведено скринінг штамів *Azotobacter chroococcum*, оптимізовано склад модифікованого живильного середовища для вирощування бактерій, вивчено вплив рН та терміну інкубування на біомасу клітин.

Ключові слова: *Azotobacter chroococcum*, живильні середовища, умови культивування, рістстимуляція

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Біологічна роль у ґрунтових екосистемах та характеристика <i>Azotobacter chroococcum</i>	10
1.2. Механізм біологічної фіксації атмосферного азоту	14
1.3. Біопрепарати на основі <i>Azotobacter</i> : класифікація, склад і сфери застосування	15
1.4. Ефективність застосування азотфіксувальних бактерій	19
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
2.1. Штами мікроорганізмів <i>Azotobacter chroococcum</i> , використані у експериментах	24
2.2. Вплив модифікованого середовища та умов культивування на ріст штамів <i>Azotobacter chroococcum</i>	25
2.3. Визначення продуктивності штамів (за сухою біомасою клітин) на модифікованих живильних середовищах за різних умов культивування	26
2.4. Визначення рістстимулювальної активності бактерій на насінні редису	26
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	28
3.1. Морфологічна та біохімічна характеристика штамів <i>Azotobacter chroococcum</i>	28
3.2. Вплив модифікованого середовища та умов культивування на ріст штамів <i>Azotobacter chroococcum</i>	31
3.3. Вплив культуральних рідин штамів <i>A. chroococcum</i> на стимуляцію росту рослин	37

ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	42

ВСТУП

Одне із провідних місць в економіці країни та житті людства, займає сільське господарство. Тому сучасне сільське господарство має бути екологічно безпечним, ефективним під час підвищення родючості ґрунтів та продуктивності рослин, щоб зберегти врожайність сільськогосподарських рослин. Виробництво сільськогосподарських культур для харчових продуктів, палива та інших промислових цілей є важливим для виживання людства.

Однак якість ґрунту є життєво важливим фактором у виробництві сільськогосподарських культур. Родючість ґрунту – це складний процес, який залежить від кількох факторів, включаючи наявність органічної речовини, корисних мікроорганізмів та поживних речовин. Використання хімічних добрив є дорогим і серйозно шкодить навколишньому середовищу та корисним ґрунтовим мікроорганізмам, які там живуть, крім того, воно становить ризик для здоров'я людини та може створювати ситуації, що сприяють швидкій появі хімічно стійких патогенів.

Застосування органічних добрив є поширеною практикою для покращення родючості ґрунту та збільшення врожайності сільськогосподарських культур. Деградація ґрунтів, зниження біорізноманіття та забруднення довкілля викликає надмірне використання пестицидів, гербіцидів та мінеральних добрив. Щоб знизити ризики деградації ґрунтів, великої перспективи та особливого значення набуває використання мікробних біопрепаратів, що забезпечують рослини доступними формами поживних речовин та стимулюють ріст природним шляхом. Для збільшення росту рослин рекомендується застосовувати біоагенти з високим ступенем безпеки та мінімальним впливом на навколишнє середовище.

Бактерії роду *Azotobacter*, є азотфіксуючими бактеріями, також є вільноживучими, що може відігравати велику роль у кругообгу азоту в

природі, який є доступний для рослин. Зокрема бактерії *Azotobacter chroococcum* мають продукуючу дію біологічно активних речовин, таких як цитокініни, ауксини, амінокислот, що забезпечують ріст рослин. Маючи такі властивості бактерії *Azotobacter chroococcum* має широке використання для створення біопрепаратів на їх основі, що дає змогу підвищити урожайність сільськогосподарських культур.

Ефективність біопрепаратів, що виготовлені на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum* залежить від технології їх отримання. Технологія має включати склад живильного середовища, умови культивування та методи зберігання мікроорганізмів. Вирощування рослин з біодобривами може призвести до підвищення стійкості рослин до хвороб та вироблення фітогормонів та водорозчинних вітамінів. Крім того, мікроорганізми можуть вплинути на ріст рослин. Одним з поширених несимбіотичних бактерій, які мають великий потенціал для використання у виробництві біодобрив, є *Azotobacter chroococcum*, на ріст яких впливає температура, яка повинна бути в діапазоні від 28 до 32°C, тоді як рН слід підтримувати між 7,0 та 7,5. Концентрація розчиненого кисню та склад середовища (особливо концентрація солі) також мають значний вплив на ріст бактерій. Культивування *A. chroococcum* характеризується відносно низькою концентрацією сухої біомаси, і тому необхідно вивчити різні методи культивування (періодний, періодичний з підживленням), щоб отримати вищий вихід клітин. Найчастіше використовуються періодичні та періодичні з підживленням методи. Недотримання цих параметрів, може знизити життєдіяльності клітин, можлива втрата азотфіксувальної активності, що зменшить ефективність препарату під час застосування.

Актуальність роботи: Актуальність пов'язана з важливістю створення ефективних і екологічно безпечних рішень для сільського господарства. У сучасних умовах виснаження ґрунтів і значне використання хімічних добрив,

пошук альтернатив, які забезпечують збереження природного балансу екосистем, є нагальною проблемою.

Завдяки оптимізації технології їх культивування з урахуванням ключових параметрів – це склад поживного середовища, штам, температура, що дозволить підвищити продуктивність біопрепаратів і забезпечить максимальне використання в аграрному секторі.

Мета роботи: Основною метою дослідження є оптимізування технології отримання біопрепаратів на основі бактерій роду *Azotobacter chroococcum*, а саме умов культивування штамів, з метою отримання підвищення біологічної активності бактерій, отримання більшої кількості посівного матеріалу.

Об'єкт досліджень: оптимізація умов культивування штамів *Azotobacter chroococcum*.

Предмет досліджень: штами *Azotobacter chroococcum*, продуктивність, живильні середовища, умови культивування, рістстимуляція

Методи дослідження: емпіричні (експеримент, спостереження, опис), мікробіологічні та біохімічні (дослідження біологічних особливостей штамів), біотехнологічні (культивування бактерій на живильних середовищах), статистичні.

Результати досліджень: проведено скринінг штамів *Azotobacter chroococcum*, оптимізовано склад модифікованого живильного середовища для вирощування бактерій, вивчено вплив рН та терміну інкубування на біомасу клітин.

Ключові слова: *Azotobacter chroococcum*, живильні середовища, умови культивування, рістстимуляція

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна роль у ґрунтових екосистемах та характеристика *Azotobacter chroococcum*

Оскільки рослини не здатні фіксувати азот, в цьому їм допомагає *Azotobacter*. *Azotobacter chroococcum* здатна фіксувати молекулярний азот із повітря та перетворювати його у сполуки, доступні для рослин - зокрема у формі амонію. Біологічна фіксація азоту – це ефективний і екологічно стійкий підхід у сільському господарстві, який сприяє росту і розвитку рослин та дозволяє зменшити використання хімічних добрив [1].

Azotobacter сприяє прискоренню росту сільськогосподарських культур. Їхня активність тісно пов'язана з фізико-хімічними властивостями ґрунту, а також позитивно впливає на здатність рослин засвоювати поживні речовини [2].

Біологічні добрива, як невід'ємна складова органічного землеробства, відіграють важливу роль у збереженні довготривалої родючості та стійкості ґрунтів. Їхній вплив проявляється у здатності фіксувати атмосферний азот, мобілізувати зв'язані макро- та мікроелементів, а також перетворювати нерозчинні сполуки фосфору у форми, доступні для рослин. Завдяки цьому підвищується ефективність засвоєння поживних речовин і покращується загальний стан та якість ґрунтового середовища [3,4].

Азот широко застосовується у вигляді азотних добрив для підвищення врожайності основних сільськогосподарських культур. Проте перспективною альтернативою, що дозволяє зменшити або повністю відмовитись від використання таких добрив, є застосування бактерій, які стимулюють ріст рослин. Ці мікроорганізми здатні покращити розвиток і врожайність різноманітних видів рослин, зокрема тих, що мають важливе значення для

аграрного виробництва та екології. Бактерії роду *Azotobacter* належать до несимбіотичних гетеротрофних організмів, які можуть фіксувати всередньому близько 20 кг азоту на гектар на рік. Їхнє використання сприяє покращенню росту рослин і збагаченню ґрунту азотом завдяки процесу фіксації атмосферного азоту, що відбувається з використанням вуглецю у їхньому метаболізмі [4].

Бактерії використовують атмосферний азот для синтезу клітинного білка. Після відмирання клітин *Azotobacter* цей білок розкладається в ґрунті, забезпечуючи культури рослини доступними сполуками [4].

У таких умовах застосування біодобрих вважається одним із найбільш перспективних способів підвищення родючості ґрунту. Завдяки економічній ефективності та екологічній безпечності, вони можуть бути інтегровані в сільському господарстві для поліпшення врожайності. Крім того, мікробні продукти відзначаються безпекою, здатні до самовідтворення та цільовою дією, що робить їх важливим елементом комплексного управління поживними речовинами та підтримки стійкості ґрунту [5].

Азотобактерії вважаються корисними мікроорганізмами як для застосування у вигляді біоінокулянтів, так і для вивчення процесів фіксації азоту. Їхній швидкий ріст та висока здатність до поглинання значних обсягів азоту роблять їх об'єктом великого наукового та практичного інтересу. *Azotobacter* здатні перетворювати атмосферний азот на аміак, який надалі може бути засвоєний і використаний рослинами [6,7].

Azotobacter chroococcum – ризобактерія мікроаерофільна, що може стилювати ріст рослин, має форму, що нагадує паличку та є грамнегативною. Бактерія є мезофільною, найкраще розвивається в ґрунтах при помірних температурах та при нейтральному рН середовища. Має змогу фіксувати азот при аеробних умовах. Щоб відбулася фіксація азоту, ґрунт має бути бідним на фосфор [8].

В ґрунті мають міститись такі елементи – як калій, сірка, магній, кальці для фіксації азоту. Також для здійснення фіксації азоту бактерія *Azotobacter chroococcum* утворює три ферменти – це пероксидаза, супероксиддисмутаза та каталаза, що «знешкоджують» дію активної форми кисню [8].

Для захищення нітрогеназної системи від дії кисню, бактерія *A. Chroococcum* продукує меланін, темно-коричневого кольору та є водорозчинний. Леванове кільце утворюється при наявності цукрів, таких як сахароза та рафіноза, на агаровому середовищі навколо колоній *Azotobacter chroococcum*[8].

Біологічна класифікація:

Домен: Бактерії (Bacteria)

Тип: Протеобактерії

Клас: Гамма-протеобактерії

Ряд: Pseudomonadales

Родина: Pseudomonadaceae

Підродина: група *Azotobacter*

Рід: *Azotobacter*

Вид: *Azotobacter chroococcum*

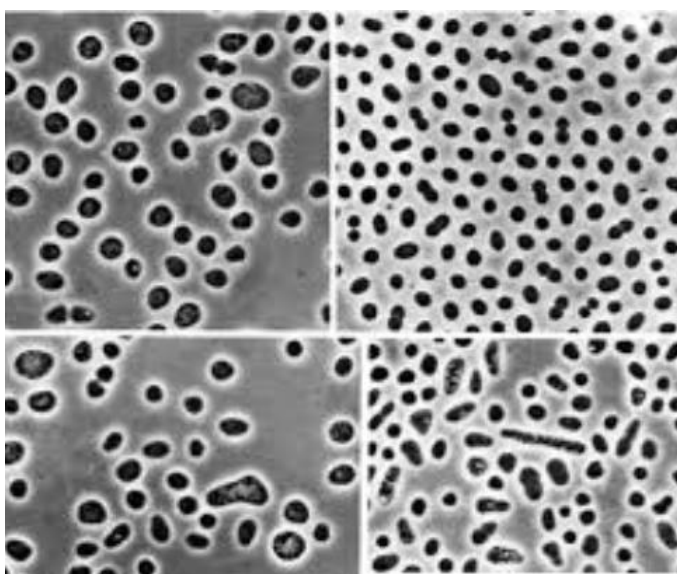


Рис. 1.1. *Azotobacter chroococcum*

Морфологічні властивості:

Клітини мають форму великих, кулястих або овальних паличок, можуть сягати розмірів від 2-10 мкм. Вони є грам негативні, але в деяких випадках можуть проявляти грам позитивне забарвлення, що пов'язане з товщиною слизової капсули [9].

Рух клітин здійснюється завдяки перитрихіальних джгутиків. Мають дуже розвинену слизову капсулу, яка утворюється при рості на середовищах з вуглеводами. Бактерії не утворюють справжній ендоспор, але формують цисти які є стійкими до висихання форми, що забезпечує виживання [9].

На живильних середовищах колонії – слизові, блискучі, безбарвні або жовтуваті, але з часом можуть змінити колір, потемніти через утворення пігменту – меланіноподібних [9,10].

Фізико-біохімічні властивості:

Мають тип метаболізму облігатних аеробів, тобто потребують кисень для росту та фіксації азоту. За джерелом енергії є хемоорганогетеротрофи, що використовують органічні сполуки, такі як сахароза, глюкоза, етанол, маніт та інші. Здатні фіксувати молекулярний азот з атмосфери за допомогою ферменту нітрогенази та перетворювати його на амоній [11].

Ростуть за оптимальних умов: температура має складати 25-30°C; нейтральне рН середовища 6,5-7,5; ґрунт має бути помірної вологості; *Azotobacter chroococcum* чутливі до кисневого стресу, оскільки нітрогеназа інактивується при надлишку кисню, тому клітини мають спеціальні механізми захисту – дихальні ферменти високої активності [11].

Деякі штами утворюють темні меланінові пігменти, що захищають їх від ультрафіолетового освітлення та окисного стресу.

Також можуть синтезувати біологічно активні речовини – це є вітаміни групи В, особливо вітамін В₁₂, фото гормоні такі як ауксини та гібереліни [11,12].

Екологічна та біотехнологічна роль:

Бактерії роду *Azotobacter chroococcum* переважно мешкають в орному шарі ґрунту, особливо у ризосфері рослин, та можуть покращувати азотне живлення та стимулювати ріст рослин. Стимулюють ріст рослини за вдяки фіксації атмосферного азоту, синтезу фітогормонів, підвищенню засвоєння фосфатів [12].

Завдяки цим властивостям бактерії використовуються для сільського господарства як онова біопрепаратів для покращення ґрунтів, одним із біопрепаратів є «Азотобактерин».

1.2. Механізм біологічної фіксації атмосферного азоту

Біологічна фіксація азоту (БФА) – це мікробно-опосередкований процес, заснований на ферментативному перетворенні атмосферного азоту (N_2) на амоній, який легко засвоюється корінням, за допомогою нітрогенази. Мікроорганізми, що фіксують N_2 , які разом називаються «діазотрофами», здатні біологічно фіксувати N_2 разом з корінням рослин. Зокрема, симбіотичні ризобактерії індукують структурні та фізіологічні модифікації бактеріальних клітин і коренів рослин у спеціалізовані структури, а саме бульбочками.

Інші бактерії, що фіксують N_2 , – це вільноживучі фіксатори, які є дуже різноманітними та поширеними в усьому світі на сільськогосподарських угіддях. Вони є ключовим природним джерелом азоту (N) у природних та сільськогосподарських екосистемах, де відсутня симбіотична фіксація азоту (СФА). Біодобрива на основі азотобактера мають унікальні характеристики, такі як утворення цист, що надає стійкості до стресових факторів навколишнього середовища.

Перетворення азоту до амоніаку називається біологічною фіксацією азоту, яка відбувається при дії ферментного комплексу нітрогенази. Під час

цього процесу одна молекула азоту витрачає 16 молекул АТФ та необхідні електрони та протони для відновлення азоту до амоніаку [14].

Ферментний комплекс нітрогенази – це двохкомлектний ферментний комплекс, який складається з дінітогенредуктази та молібден-залізного білку [15,16].

Основні етапи:

1. Передача електронів, електрони які надходять від відновлених сполук;
2. Витратна енергія АТФ, дінітогенредуктази переносить електрони до молібден-залізного білку;
3. На активному центрі молібден-залізного білка нітроген поступово відновлюється до амоніаку.
4. На останньому етапі амоніак переходить у розчину форму, яку легко засвоювати рослинам.

Даний процес є ключовим в кругообігу азоту. Завдяки йому кожного року в екосистему утворюється близько 200-300 млн тонн зв'язаного азоту. Амоній отриманий завдяки цьому процесу використовується не лише бактеріями, а також надходить в ґрунт, сполуки азоту використовують рослини для росту [17,18].

1.3. Біопрепарати на основі *Azotobacter*: класифікація, склад і сфери застосування

Біопрепарати на основі бактерій роду *Azotobacter* належать до азотфіксувальних мікробних добрив, які застосовують для поліпшення азотного живлення рослин і підвищення родючості ґрунтів. Вони містять живі клітини вільноживучих азотфіксувальних бактерій, що здатні засвоювати атмосферний азот і переводити його в доступну для рослин форму.

В атмосфері зосереджена велика кількість молекулярного азоту, близько 78%, але він не доступний для вищих рослин, але азот фіксуючі бактерії можуть використовувати атмосферний азот та перетворювати його у форму органічних з'єднань – білковий азот [19].

Мікробіологічний препарат Azoter – має густу форму, сірого кольору, що виготовлена на основі патоки, що є живильним середовищем для бактерій до моменту внесення в ґрунт. Містить бактерії, що здатні фіксувати атмосферний азот [19].



Рис.1.2. Мікробіологічний препарат Azoter

Даний препарат містить близько 4×10^9 КОЕ/мл агрономічно цінних мікроорганізмів, до них входять *Azotobacter chroococcum* не менше $1,5 \times 10^{10}$ КУО/см³; *Azospirillum brasilense* не менше $2,08 \times 10^9$ КУО/см³; *Bacillus megatherium* не менше $1,58 \times 10^9$ КУО/см³. рН має 7,0 [19].

Препарат краще використовувати на ґрунтах, що містить понад 1% гумусу, та кислотності в межах рН 5,4-8,5. Також проявляє високу ефективність на ґрунтах з високим вмістом кальцію. Використовують на ґрунтах середньо суглинистих. Використання препарату поступово підвищують рівень рН в ґрунті, частка складає 0,05-0,1 одиниць щороку, що позитивно впливає на ґрунт [19].

Вносити препарат рекомендують до посіву або одночасно з посівом культури, та при температури повітря близько 5°C, для внесення в ґрунт використовують спеціальні аплікатори, щоб препарат попав зразу в ґрунт, оскільки мікроорганізми на яких виготовлений Azoter має чутливість до ультрафіолетового випромінювання [19].

Azoter F – удосконалена форма препарату, оскільки бактерії після потрапляння в ґрунт, виробляють достатню кількість азоту, фосфору та фітогормонів росту, що перешкоджає виникненню захворювань рослин, наприклад від фузаріозної гнилі [19].

Препарат містить мікроорганізми: *Azotobacter chroococcum* не менше 4×10^9 КУО/мл; *Azospirillum brasilense* не менше 4×10^9 КУО/мл; *Bacillus megatherium* не менше $1,5 \times 10^8$ КУО/мл та *Trichoderma sp.* Не менше 2×10^8 КОУ/мл. рН має 7,0 [19].

Застосовується до всіх видів сільськогосподарських культур. Препарат вносять перед посівом і відразу ж відпрацьовують ґрунт, щоб мікроорганізми не піддавалися впливу сильного сонячного світла протягом тривалого часу [19].

Azorhiz – препарат рекомендують вносити під бобові культуру, оскільки в складі містить симбіотичні мікроорганізми. Має подвійний ефект, забезпечує як асоціативну, так і симбіотичну функцію азоту. Застосування препарату забезпечує рослини фітогормонами, а також достатньою кількістю азоту, фосфору і частково калію [19].



Рис.1.3. Препарат Azorhiz

Препарат містить додаткові живильні речовини. Загальна кількість агрономічно цінних мікроорганізмів не менше 4×10^9 КОЕ/мл. Містить мікроорганізми такі як *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megatherium*, *Rhizobium* sp [19].

Азотофіт (Азотохелп) - концентрат суспензії від кремового до коричневого кольору зі слабким, специфічним запахом. Фасування: 1 л, 5 л, 10 л. Склад: живі клітини природної азотфіксуючої бактерії *Azotobacter chroococcum* та біологічно активні продукти її життєдіяльності: амінокислоти, вітаміни, фітогормони, фунгіцидні речовини. Загальне число життєздатних мікроорганізмів продуцента не менше, ніж $1,0 \times 10^9$ КУО/см³.

Призначення:

- ✓ передпосівна обробка насіння
- ✓ обробка бульб картоплі
- ✓ кореневе підживлення, фертигація
- ✓ позакореневе підживлення (обприскування) рослин у період вегетації.

Біологічна дія біопрепарату:

- ✓ активно фіксує молекулярний атмосферний азот і збагачує ним ґрунт
- ✓ синтезує речовини, що стимулюють ріст рослин
- ✓ покращує схожість насіння
- ✓ стимулює розвиток кореневої системи і рослини
- ✓ підвищує експресію генів, що забезпечують стресостійкість рослин
- ✓ покращує засвоєння поживних речовин
- ✓ зміцнює імунну систему рослин
- ✓ підвищує врожайність сільськогосподарських культур.



Рис.1.4. Біопрепарат Азотофіт (Азотохелл)

Обробку насіння проводять у день посіву підготовленим робочим розчином біопрепарату. Оброблене насіння висівають одразу або просушують у затінку і висівають не пізніше, ніж через 8 годин після обробки.

Кореневе підживлення рослин, фертигація (в залежності від виду рослин, 1-3 обробки): перше підживлення – після садіння або після появи сходів; кожне наступне підживлення – через 10-15 днів після попереднього.

Позакореневе підживлення (обприскування) рослин: у період вегетації проводять дощувальною установкою або обприскувачем.

1.4. Ефективність застосування азотфіксувальних бактерій

Інтенсивне сільське господарство залежить від важливого застосування азотних добрив, а також інших необхідних поживних речовин для максимізації продуктивності сільськогосподарських культур. Загалом, за оцінками, застосування синтетичних азотних добрив забезпечує виробництво приблизно половини світових запасів продовольства, і прогнозується, що

рівень споживання азотних добрив зростатиме з 80 до 180 млн тонн до 2050 року [20].

Існує потреба в постійному використанні азотних добрив для вирішення проблем сталого розвитку сільського господарства, що полягають у кращому харчуванні сільськогосподарських культур та покращенні продуктивності, необхідних для постійно зростаючого населення світу.

Задоволення такого нагального та швидкозростаючого попиту на продукти харчування, особливо в країнах, що розвиваються, неможливо без належного постачання мінеральних добрив та найкращих практик, особливо там, де сільськогосподарські культури та ресурси майже не сприяють ефективному виробництву сільськогосподарських культур [21, 22].

Комерційна історія мікробних біодобрив почалася з біоінокулянту на основі *Rhizobium* під назвою «Nitrogin», який став піонером серед усіх ризобіальних інокулянтів [23]. Дослідження обґрунтованості мікроорганізмів, що фіксують N_2 (включаючи несимбіотичні бактерії, такі як *Azotobacter*), стимулюють ріст рослин призвело до розробки біопокращувачів на основі *Azotobacter*, а саме «азотобактерію», в країнах Східної Європи, де в середині 19 століття мікробними препаратами було оброблено приблизно 10 градусів землі [24]. Дослідницькі статті, пов'язані з азотобактером, становлять понад 4000 публікацій за останні два десятиліття, що демонструє експоненціальне зростання загальної кількості публікацій, особливо з 1990 по 2020 рік, досягнувши майже 4066 документів у 2020 році, знайдених в Інтернеті [22]. Щодо дослідницької області, у великій кількості публікацій, доступних про види азотобактер, були розподілені між більш ніж 20 дослідницькими напрямками, причому загального дослідження зосереджені на біохімії, генетиці, молекулярній біології, сільському господарстві та загальних біологічних науках про азотобактер. Загалом, публікації, пов'язані з азотобактером, - це переважно дослідницькі статті (88,7%) з понад 3600

публікаціями, тоді як огляди, доповіді на конференціях та розділи книг складають майже 11,3% [22]. Щодо країни, просторовий розподіл документів, пов'язаних з азотобактером, показав, що Індія та Сполучені Штати є провідними країнами з понад 800 опублікованими матеріалами роками [22].

У ґрунтовій екосистемі популяції *Azotobacter* sp. залежать від фізико-хімічних параметрів ґрунту, таких як органічна речовина, рН, температура, глибина ґрунту, вологість ґрунту та засоленість ґрунту [22]. Концентрації NaCl впливали на PGPR-активність *Azotobacter*, головним чином BNF у ґрунті. Однак відомо, що деякі види *Azotobacter* переносять концентрацію солі до 10% NaCl. Наприклад, було показано, що *Azotobacter salinestris* переносить концентрацію NaCl 8%, але загальні значення КУО/мл були знижені порівняно з нижчими концентраціями NaCl. У реакції на температуру *Azotobacter* є типовим мезофільним організмом, який розвивається при оптимальних температурах 25–30°C для росту та фізіологічних властивостей [22].

Присутність популяцій азотобактерів у ґрунтових екосистемах контролюється рН. Як правило, нижчий рН (<6,0) зменшує популяцію азотобактерів, а в деяких випадках повністю пригнічує їхній ріст. Кислі ґрунти мають несприятливі властивості бідності фізіологічно активними поживними речовинами та незадовільного водно-повітряного режиму, тому присутність азотобактерів у цих ґрунтах була дуже низькою або навіть відсутньою [22]. Оптимальний рН 7–7,5 є сприятливим для фізіологічних функцій азотобактерів.

Цисти азотобактера надають унікальні риси толерантності та здатність до виживання. Утворення цист відбувається природним чином за несприятливих та екстремальних умов, таких як високі або низькі температури, замерзання, засоленість та посуха. Утворення цист також індукується у відповідь на зміни концентрації поживних речовин у середовищі або додавання деяких органічних речовин, таких як етанол, н-бутан-1-ол або

β -гідроксибутират. Цей процес може становити великий інтерес для біоформулювання *Azotobacter*. Було показано, що утворення цист у великих масштабах під час розробки біодобрив з використанням *Sinorhizobium meliloti*, *Azospirillum brasilense* та *Azospirillum lipoferum* продовжує термін придатності продукту, зберігаючи його ефективність [25].

Використання суміші *Azotobacter*, *Azospirillum* та *Klebsiella* значно знижує ріст міцелію деяких патогенних грибів, таких як *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* та *Fusarium solani*. Також було виявлено, що ізоляти *A. vinelandii* мають здатність продукувати полісахариди, такі як альгінат, зі швидкістю від 4,88 до 5,26 г/л. Утворення ціаністого водню (HCN) та сидерофорів також було охарактеризовано для видів *Azotobacter* [26].

Солюбілізація калію (K) та цинку (Zn) є частиною важливих можливостей того, як *Azotobacter* може сприяти росту рослин. У цьому процесі задіяні різні механізми, включаючи підкислення, *Azotobacter* виробляють органічні кислоти в ґрунті, які зв'язують катіони Zn та знижують рН ґрунту поблизу. Інші механізми, які можуть бути задіяні в солюбілізації Zn, включають продукування *A. chroococcum* нового сімейства сидерофорів, наприклад, вібріоферину, амфібактинів та крохелінів, які можуть зв'язувати залізо гексадентатно, використовуючи нову залізо-хелатуючу γ -амінокислоту. Такі сидерофори допомагають бактеріям отримувати доступ до ресурсів заліза, але також сприяють контролю рослинних патогенів у ґрунті [22, 26].

Фермент 1-аміноциклопропан1-карбоксилат (АСС) дезаміназа, що продукується *Azotobacter* також є важливим [27]. Організми, що продукують АСС дезаміназу, знижують рівень етилену в рослинах, який у високих концентраціях, може призвести до пригнічення росту рослин або навіть до їх загибелі.

Багато штамів *Azotobacter* виробляють пігменти. Наприклад, *A. chroococcum* утворює темно-коричневий водорозчинний пігмент меланін, який

відбувається на високих рівнях метаболізму під час BNF. Вважається, що цей процес захищає нітрогеназну систему від кисню.

Окрім BNF, корисний вплив *Azotobacter* на ріст рослин також пояснюється покращенням розвитку коренів, збільшенням швидкості поглинання мінералів корінням, а також їх антагонізмом проти грибів та фітопатогенних бактерій. *Azotobacter* синтезує та виділяє значну кількість біологічно активних речовин, таких як вітаміни групи B, нікотинова кислота, пантотенова кислота, біотин, гетероксини та гіберелін, які посилюють ріст коренів рослин [22, 25]. Солюбілізація неорганічного та органічного фосфору штамми *Azotobacter* є ще однією ознакою, що стимулює ріст, яка характеризується ефективним скринінгом вільноживучих N₂- фіксуєючих бактерій [22].

Ще однією властивістю, що сприяє росту рослин, яку демонструють види *Azotobacter*, є продукування ауксину (IAA). Цей фітогормон сприяє утворенню довших коренів і збільшує кількість кореневих волосків і бічних коренів, які беруть участь у засвоєнні поживних речовин [22]. Він відіграє центральну роль у поділі клітин, видовженні, розвитку плодів та старінні.

Таким чином, біодобрива можуть бути альтернативою хімічним добривам. Одним з найбільш перспективних біодобрив, що підвищують продуктивність сільськогосподарських культур, є добрива на основі *Azotobacter chroococcum*, дослідження оптимізації технології виготовлення яких є актуальним питанням.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Штами мікроорганізмів *Azotobacter chroococcum*, використані у експериментах

Бактеріальні штами, що належать до *Azotobacter* spp., були виділені з різних зразків ґрунту методом серійних розведень. Для цього 1,0 грам зразка ґрунту суспендували у 100 мл стерилізованої води в колбі Ерленмейера об'ємом 250 мл та струшували. З маточного розчину готували серійні розведення, і 0,5 мл кожного розведення розподіляли по живильному середовищу.

Для одержання азотфіксуючих бактерій використовують селективне безазотне середовище Ешбі наступного складу, г/л:

- ✓ K_2HPO_4 – 0,2
- ✓ $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2
- ✓ NaCl – 0,2
- ✓ K_2SO_4 – 0,1
- ✓ глюкоза (або манніт) – 20,0
- ✓ крейда – 5,0
- ✓ агар-агар – 20,0.

Середовище стерилізували при 121 °С протягом 20 хвилин [28].

Для досліджень використовували штами *Azotobacter chroococcum* АС 25, АС 28, АС 31 (колекція культур лабораторії промислової біотехнології кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України).

2.2. Культурально-морфологічні та біохімічні методи ідентифікації ізолятів

Для ідентифікації ізолятів було проведено різні морфологічні та біохімічні тести, такі як забарвлення за Грамом; забарвлення капсул, тест на рухливість, ендоспоровий тест, протеазний тест та каталазний тест.

Для фарбування за Грамом на знежирене предметне скло наносили у краплі води та приготували тонкі мазки бактерій.

Мазки висушили і зафіксували у полум'ї спиртівки.

Мазки зафарбували протягом однієї хвилини генціанвіолентом. На препарат нанесли розчин Люголя (не промиваючи водою) і витримали 60 секунд, до повного почорніння мазка.

Не промиваючи водою, препарат обробили 96% спиртом протягом 15-20 с.

Препарат промили водою і нанесли фуксин Пфейфера.

Препарат промили водою та висушили фільтрувальним папером.

На препарат наносять кедрову олію та розглянули з іммерсійним об'єктивом [28].

Для фарбування капсул приготували мазок, нанесли негрозин, мазок висушили на повітрі. Потім нанесли кристалічний фіолетовий. Клітини стали забарвлені, фон був темним, а капсули залишились прозорими у вигляді ореолу навколо клітини [28].

Тест на рухливість проводили методом уколу в напіврідке середовище, для забарвлення ендоспор використовували малахітовий зелений з наступним прогріванням та сафранін. Для визначення протезної активності штами тестували на казеїновому агарі (знежирене молоко), де спостерігали відсутність прозорих зон. Тест на каталазну активність проводили за використання 3% перекису водню [28].

2.3. Визначення продуктивності штамів (за сухою біомасою клітин) на модифікованих живильних середовищах за різних умов культивування

Для приготування бактеріального інокуляту в стерильних умовах бактерії *A. chroococcum* переносили в колбу Ерленмейера об'ємом 250 мл, що містила 50 мл стерилізованого безазотного модифікованого середовища Ешбі(г):

- ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,10;
- ✓ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,03;
- ✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,45;
- ✓ K_2HPO_4 – 0,60; 0,80; та 1,0;
- ✓ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05;
- ✓ Сахароза – 10, 20, 30;
- ✓ та агар – 20.

pH доводили до 7,0. Розчини солей та глюкози стерилізували окремо, а потім змішували перед інокуляцією. Колби інкубували при 25-28 °C на роторному шейкері (180 об/хв).

Досліджували вплив концентрації K_2HPO_4 (0,6; 0,8 та 1 г), сахарози (20,30,40 г), вплив різних pH та тривалості інкубаційного періоду.

Середовище центрифугували при 6000 об/хв протягом 10. Супернатант видаляли, а осаджену масу висушували при 90°C протягом 12 годин. Після висушування центрифужні пробірки знову зважували, і вагу біомаси отримували шляхом віднімання попередньої ваги від отриманої ваги [28].

2.4. Визначення рістстимулювальної активності бактерій на насінні редису

Вплив бактерій на ріст рослин визначався за допомогою модельного експерименту, в якому насіння редису, інокульоване бактеріальними

штамами, витримували протягом 5-7 днів в чашках Петрі на стерильному фільтрувальному папері. Насіння у кількості 30 шт. знезаражували сумішшю етилового спирту 96% та перекису водню 3% (1:1) протягом 15 хв., відмивали 2 рази стерильним фізіологічним розчином. В чашках Петрі на стерильному фільтрувальному папері розміщали 30 шт. насіння та вносили розчини препаратів об'ємом 5 мл на чашку. Також був проведений контрольний експеримент, у якому насіння не інокулювали бактеріальними штаммами, використовували стерильну воду. Після чого фіксували довжину пагонів та коренів, а також відсоток проростання насіння [29].

Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням комп'ютерної програми Excel.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Морфологічна та біохімічна характеристика штамів *Azotobacter chroococcum*

Для визначення найбільш активних штамів було вивчено морфологічні та біохімічні характеристики штамів *Azotobacter chroococcum* АС 25, АС 28, АС 31 (колекція культур лабораторії промислової біотехнології кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України).

Після культивування штамів на селективному середовищі Ешбі, на якому здатен рости *Azotobacter*, проводили тести на визначення таких характеристик, як: наявність капсул, значне слизовиділення та пігментація, які дали можливість характеризувати штами як представника роду *Azotobacter*.

Було відзначено, що колонії були світло-коричневі, матово-прозорі, клітини мали поліморфізм, паличкоподібну форму, диплококи, а їх розмір становив близько 2-3 мкм у діаметрі. Ізоляти були грамнегативними, рухливими та утворювали цисти (табл.1).

Таблиця 3.1. Морфологічна та біохімічна характеристика штамів *Azotobacter chroococcum*

Критерії	Характеристика
Форма	Палички, диплококи (поліморфізм)
Розмір	Діаметр 2-3 мкм
Вигляд колонії на середовищі Ешбі	Округла, однорідна структура, середній розмір, краплеподібний край
Форма колонії	Піднята кругла
Колір колонії	Світло-коричневі, матово-прозорі

Утворення капсул	+
Реакція по Граму	Грам-негативні
Рухливість	+
Утворення ендоспор	–
Утворення цист	+
Утворення капсульного слизу	+
Активність протеази	–
Активність каталази	+

Утворення ендоспор та протеазної активності не виявлено, але ізоляти продемонстрували каталазну активність. Згідно з посібником Бергі (Kreig et al., 1984), ізоляти належали до роду *Azotobacter* (рис.1, 2).



Рис.3.1. Колонії бактерій роду *Azotobacter* на селективному середовищі Ешбі

Отримані ізоляти культивували на класичному рідкому середовищі Ешбі з метою вивчення їх продуктивності.

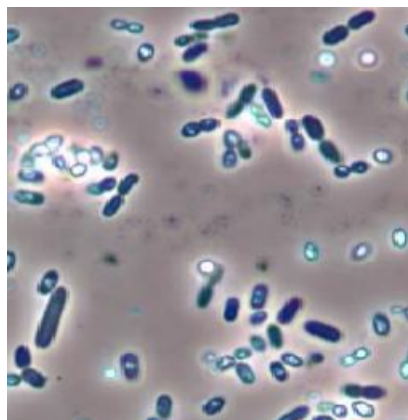


Рис.3.2. Клітини *Azotobacter chroococcum* під мікроскопом

Було проведено скринінг чотирьох ізолятів АС 25, АС 28, АС 31, АС 36, які культивували при 30°C у роторному шейкері протягом 48 годин при 200 об/хв для росту мікроорганізмів. Середовище з бактеріями в подальшому центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину видаляли, а осад висушували у сухожаровій шафі при 50°C протягом 12 годин.

Серед 4 штамів було обрано 3, які мали найбільшу вагу сухої біомаси клітин (штами АС 25, АС 28, АС 31), що становила 0,65 -0,78 мг/мл порівняно з штамом АС 36, який показав меншу кількість сухої клітинної біомаси, а саме 0,24 мг/мл.

Таблиця 3.2. Продуктивність досліджуваних ізолятів на рідкому середовищі Ешбі

№ п/п	Номер ізоляту	Вага сухої біомаси клітин (мг/мл)
1	АС 25	0,78
2	АС 28	0,71
3	АС 31	0,65
4	АС 36	0,24

Тому штами АС 25, АС 28, АС 31 були обрані для подальших досліджень.

3.2. Вплив модифікованого середовища та умов культивування на ріст штамів *Azotobacter chroococcum*

Оптимізація технології отримання біопрепаратів передбачає комплекс заходів, спрямованих на максимізацію росту біомаси та збереження життєздатності клітин при масштабуванні виробництва. Ключовим етапом є підбір оптимального живильного середовища. Для підвищення ефективності росту використовуються мікроелементи — залізо, фосфор, молібден, калій, необхідні для активності ферментів азотфіксації.

Оптимізацію проводили шляхом зміни складу середовищ, параметрів культивування (рН, інкубаційний період) та режиму перемішування у біореакторі.

Для культивування *Azotobacter chroococcum* використовували модифіковане середовище Ешбі та комплексні середовища, щоб визначити переваги цих середовищ. Усі середовища містили сахарозу як джерело вуглецю та неорганічні солі як джерело мікроелементів, важливих для росту *Azotobacter chroococcum*.

Наступним етапом було вивчення умов культивування на ріст штамів. Для вивчення умов культивування, в стерильних умовах бактерії *A. chroococcum* переносили в колбу Ерленмейєра об'ємом 250 мл, що містила 50 мл стерилізованого безазотного **модифікованого** середовища Ешбі(г) з різними концентраціями K_2HPO_4 та сахарози:

- ✓ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,10;
- ✓ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,03;
- ✓ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,45;

- ✓ K_2HPO_4 – 0,2; 0,4; та 0,6;
- ✓ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05;
- ✓ Сахароза – 10, 20, 30 г;
- ✓ та агар – 20.

Вплив концентрації K_2HPO_4

Найоптимальнішою виявилась концентрація K_2HPO_4 0,4 г/л, за якої вага сухої біомаси клітин штамів коливалась у межах 0,71-0,87 мг/мл порівняно з 0,63-0,77 мг/мл при концентрації 0,2 та 0,51-0,64 при концентрації 0,6 г/л (рис.3.3).

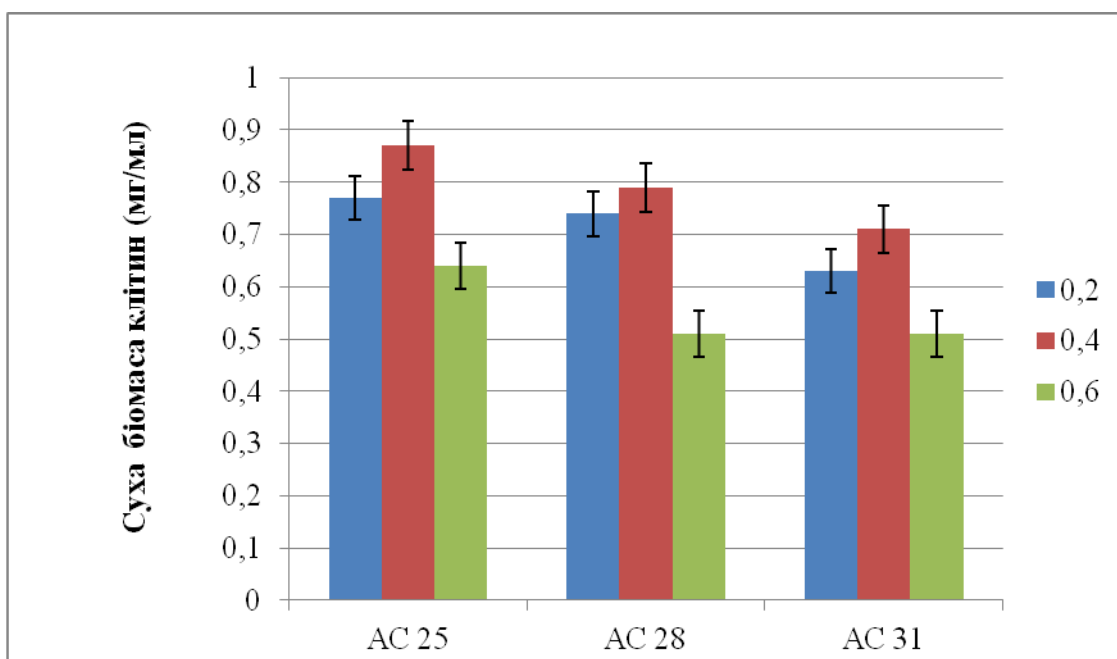


Рис.3.3. Вплив концентрації K_2HPO_4 на продуктивність штамів

Застосування методу планування експерименту (Response Surface Methodology, RSM) дозволяє підбирати концентрації компонентів середовища з урахуванням їх взаємодії та досягати збільшення біомаси до 30–40 % [30].

Порівняно з модифікованим середовищем Ешбі, яке показало $5,1 \cdot 10^6$ клітин/мл через 72 години, у середовищі з більшою кількістю дикалій гідрофосфату швидкість росту біомаси *Azotobacter chroococcum* досягла максимальної швидкості $11,0 \cdot 10^6$ клітин/мл через той самий період часу, що свідчить про значне прискорення процесу, що має тенденцію до збільшення швидкості росту виробництва біомаси, що може відігравати значну роль у виробництві якісного посівного матеріалу. Можна зробити висновок, що склад середовища має значний вплив на мікробний ріст *Azotobacter chroococcum*, проте все ще існує потреба дослідити вплив концентрації солі на здатність мікроорганізмів фіксувати атмосферний азот[31].

Вплив концентрації сахарози

Найвища концентрація біомаси була отримана з 30 г/л сахарози, як додаткового джерела вуглецю для культивування клітин, що збільшило концентрацію біомаси, решта концентрацій виявилась менш ефективною (рис.3.4).

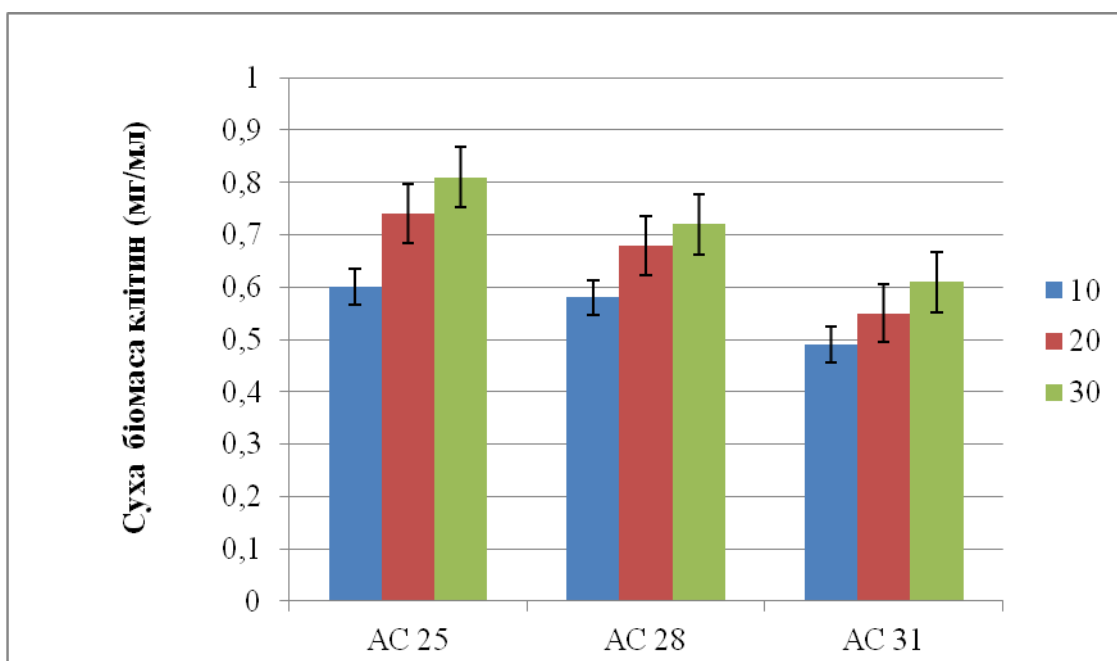


Рис.3.4. Вплив концентрації сахарози на продуктивність штамів

Найменшою виявилась продуктивність 0,55-0,74 г/л за концентрації 10 г/л, при 20 г/л вона становила 0,49-0,6 г/л.

За наявності високої концентрації вуглеводів у середовищі (> 30 г/л), *A. chroococcum* накопичує значну кількість внутрішньоклітинного резервуара для зберігання енергії (полі- β -гідроксибутират; РНВ). Синтез РНВ у *A. chroococcum* також стимулюється культивуванням в умовах обмеженого доступу кисню [31].

На класичних безазотних середовищах, таких як середовище Ешбі або Федорова, ріст *Azotobacter chroococcum* відбувався повільніше, оскільки бактерії повинні самостійно фіксувати атмосферний азот [6]. У ході експериментів встановлено, що модифіковані середовища з додаванням додаткових джерел вуглецю (зокрема меляси та сахарози у підвищених концентраціях), азоту (у випадках, коли метою було отримання максимальної біомаси, а не активної азотфіксації) та мікроелементів значно прискорювали ріст культури [32].

Аналогічні дані були отримані іншими авторами, у дослідженнях яких до складу середовища було введено фосфоромолібдат амонію як додаткове джерело нітрогену, а також підвищено вміст сахарози. Завдяки оптимізації складу живильного середовища та умов культивування вдалося суттєво збільшити кінцеву біомасу культури. Модифіковані середовища забезпечували досягнення вищої оптичної щільності суспензії за короткий проміжок часу порівняно з класичними, що свідчить про інтенсивніший ріст і більшу концентрацію клітин *Azotobacter* у середовищі [22].

A. chroococcum також культивували на складних середовищах з різною концентрацією меляси (від 20 до 80 г/л та від 9,5 до 38,1 г/л сахарози), щоб визначити склад, який можна використовувати для культивування у великих масштабах. Збільшення концентрації сахарози до 28,6 г/л (60 г/л меляси) призвело до незначного збільшення концентрації біомаси та споживання

субстрату (ΔS). Подальше збільшення концентрації сахарози до 38,1 г/л (80 г/л меляси) ще більше збільшило концентрацію біомаси, але не споживання субстрату (ΔS) [33].

Концентрації біомаси, отримані на комплексних середовищах, були дещо вищими, ніж ті, що отримані на визначених середовищах, і, ймовірно, були наслідком наявності азоту в цих середовищах, що, ймовірно, посилювало ріст бактерій. З цієї ж причини також спостерігалися дещо вищі коефіцієнти виходу біомаси (YX/S) (від 0,126 до 0,180 г/г) [33].

Другим важливим аспектом є контроль фізико-хімічних параметрів культивування. *A. chroococcum* добре росте при температурі 25–30 °С і рН 7,0–8,5, за умови інтенсивної аерації [22].

Вплив рН

Вплив рН на *Azotobacter* spp. вивчали шляхом зміни рН середовища від 7,0 до 8,0. Найоптимальнішим виявився рН для штамів АС 25 та 28 – 7,5, для штаму АС 31- 7,0.

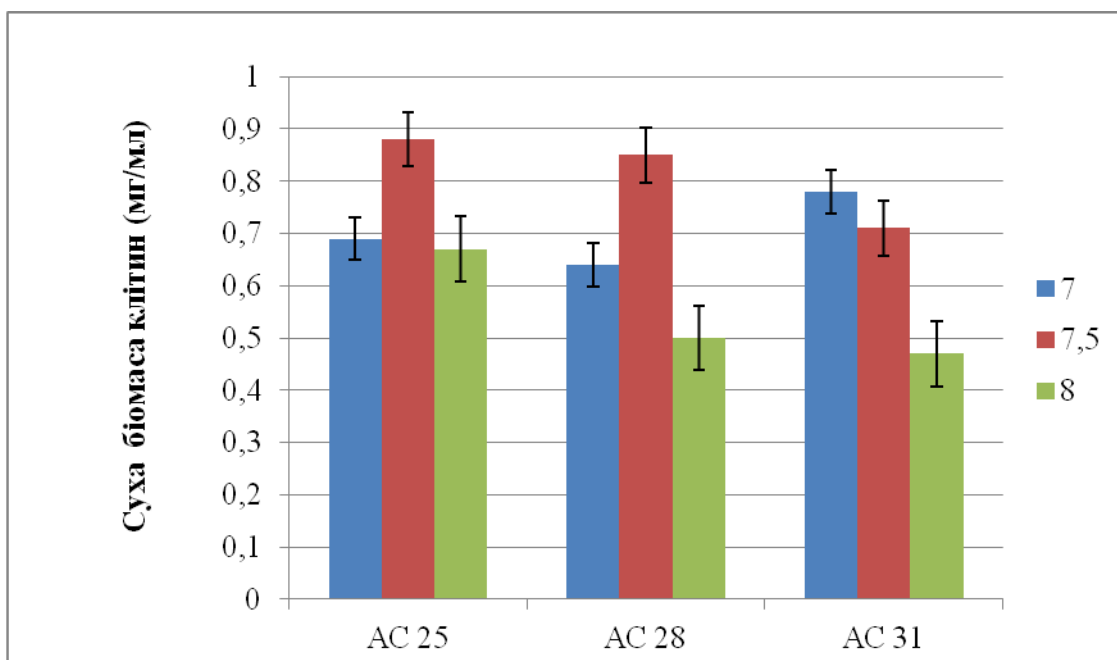


Рис.3.5. Вплив рН на продуктивність штамів

Оскільки процес фіксації азоту є енергозалежним, вміст розчиненого кисню у ферментері має підтримуватися на рівні не нижче 20 % насичення. Підвищення швидкості перемішування збільшує масообмін, але надмірна турбулентність може пошкоджувати клітини, тому для масштабування процесу застосовується корекція коефіцієнта перенесення кисню (kLa) відповідно до розміру біореактора [22].

Вплив інкубаційного періоду на *Azotobacter* spp. вивчали шляхом зміни інкубаційного періоду на 24-48-72 години. Найкращим був період 48 годин. *Azotobacter* AC 25 продемонстрував максимальний ріст, тобто 0,92 мг/мл, після інкубаційного періоду 48 годин.

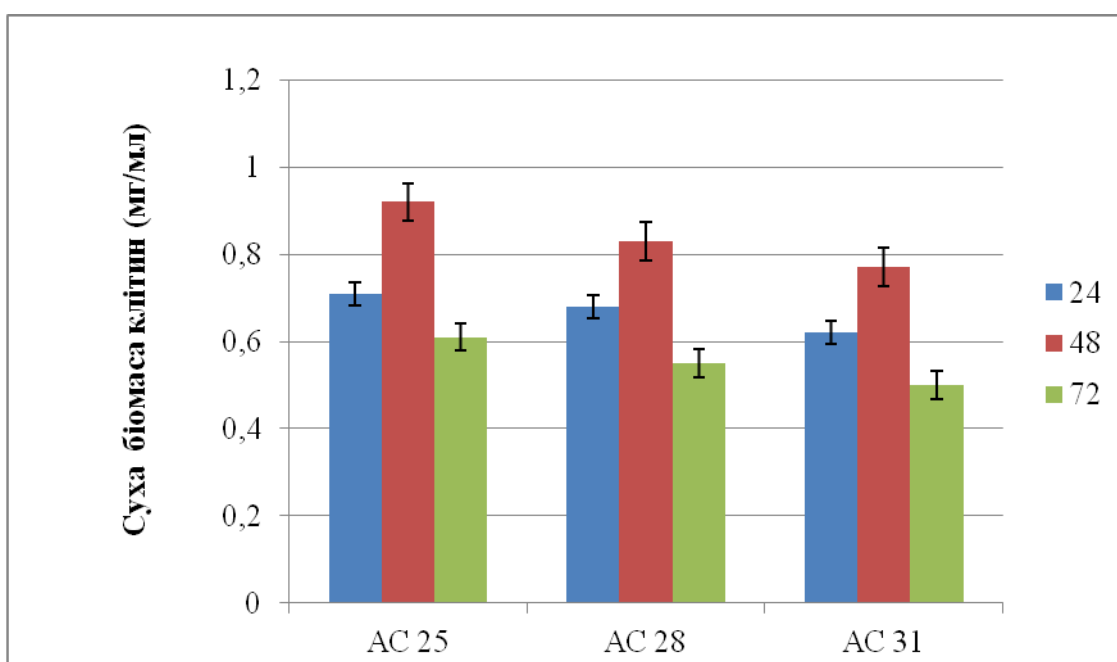


Рис.3.6. Вплив інкубаційного періоду на продуктивність штамів

У той час як *Azotobacter* AC 28 продемонстрував максимальний ріст 0,83 мг/мл. Інкубаційний період прямо пропорційний росту бактерій до певної міри, а після цього ріст бактерій починає знижуватися, що може бути

пов'язано зі зменшенням надходження поживних речовин до мікроорганізмів або накопиченням деяких токсичних сполук у середовищі.

Оптимальними умовами для росту азотобактера у дослідженні іноземних вчених визначено: температуру 29 ± 1 °С, рН 7,0, аерацію 1,5 л/хв. Використання маніту або сахарози як основного джерела вуглецю сприяло приросту біомаси до 1,8 г/л сухої речовини. Додавання мікроелементів (Fe^{2+} , Mo^{6+} , Mg^{2+}) активізувало фермент азотази на 20–25 % [33].

3.3. Вплив культуральних рідин штамів *A. chroococcum* на стимуляцію росту рослин

Вплив культуральних рідин штамів на стимуляцію росту вивчали на насінні редису. Порівняно з контрольним варіантом найкращим виявився штам АС 25, за дії якого довжина коренів та пагонів становила 5,3 та 4,2 см відповідно (у контролі 4,2 см), у решти штамів – 2,3-4,5 см та 1,4-3,8 см відповідно.



Рис.3.7. Вплив культуральних рідин штамів *A. chroococcum* на стимуляцію росту рослин редису

За дії АС 25 енергія проростання становила 97,1% і збільшилась порівняно з контролем на 7,1%, у решти штамів вона становила 94,2 та 93,5%.

S, Rajae & Alikhani, Hossein & Raiesi, Fayez. (2007) вивчили вплив різних нативних штамів *Azotobacter chroococcum* на ріст та врожайність пшениці в тепличних умовах. Насіння ярої пшениці (*Triticum aestivum* L. var. Pishtaz) було інокульовано деякими штамми *Azotobacter chroococcum*, здатними продукувати IAA, HCN, сидрофор та фіксувати молекулярний азот. Інокуляція пшениці цими штамми мала позитивний, значний вплив на біологічний врожай, відсоток білка насіння, масу тисячі насінин, площу листя, поглинання N, P, Fe та Zn, зокрема, пшеницею. Підвищений ріст пшениці, найімовірніше, був зумовлений продукцією IAA та посиленою фіксацією азоту інокульованими штамми. Деякі штами *Azotobacter chroococcum*, що походять з Чахармахал ва Бахтіарі, визнані PGPR. Результати також підтверджують ефективність *Azotobacter chroococcum* як важливого біодобрива в системах вирощування пшениці. Обрані штами мали значний вплив на ріст і врожайність пшениці, включаючи біологічний урожай та якість насіння в тепличних умовах. Цей корисний вплив *Azotobacter chroococcum* на пшеницю пояснюється головним чином продукцією IAA та, певною мірою, несимбіотичною фіксацією азоту в ризосфері [34].

Azotobacter chroococcum F8/2 було досліджено на наявність характеристик, що сприяють росту рослин, а ефекти біостимуляції оцінювалися за параметрами проростання та структурними змінами тканин кореня. *A. chroococcum* F8/2 було охарактеризовано як фактор, що сприяє доступності азоту, заліза та калію, а також як продуцент ауксину та 1-аміноциклопропан-1-карбоксихильної кислоти дезамінази. Застосований штам скоротив середній час проростання на 34,44% та збільшив енергію проростання I на 90,99% порівняно з контролем. Летка суміш складалася з 47,67% етанолу, 32,01% 2-метилпропанолу, 17,32% 3-метил-1-бутанолу та слідів 2,3-бутандіону. Мікроморфологічний аналіз коренів цукрового буряка

виявив значне збільшення площі первинної та вторинної ксилеми та розміру судин [35].

ВИСНОВКИ

Досліджено особливості культивування *Azotobacter chroococcum* з використанням різного співвідношення компонентів середовища та умов вирощування з метою оптимізації отримання біомаси для великомасштабного виробництва біодобрив.

Досліджувані колонії, виділені на селективному середовищі Ешбі були світло-коричневі, матово-прозорі. Клітини мали поліморфізм, паличкоподібну форму, диплококи, а їх розмір становив близько 2-3 мкм у діаметрі. Ізоляти були грамнегативними, рухливими та утворювали цисти. Утворення ендоспор та протеазної активності не виявлено, але ізоляти продемонстрували каталазну активність. Згідно з посібником Бергі (Kreig et al., 1984), ізоляти належали до роду *Azotobacter*.

Скринінг ізолятів щодо продуктивності при культивування на рідкому середовищі Ешбі показав, що серед 4 штамів 3 мали найбільшу вагу сухої біомаси клітин (штами АС 25, АС 28, АС 31), що становила 0,65 -0,78 мг/мл порівняно з штамом АС 36, який показав меншу кількість сухої клітинної біомаси, а саме 0,24 мг/мл.

Найоптимальнішою виявилась концентрація K_2HPO_4 0,4 г/л, за якої вага сухої біомаси клітин штамів коливалась у межах 0,71-0,87 мг/мл порівняно з 0,63-0,77 мг/мл при концентрації 0,2 та 0,51-0,64 при концентрації 0,6 г/л.

Найвища концентрація біомаси була отримана з 30 г/л сахарози, як додаткового джерела вуглецю для культивування клітин, що збільшило концентрацію біомаси, решта концентрацій виявилась менш ефективною.

Вплив рН на *Azotobacter* spp. вивчали шляхом зміни рН середовища від 7,0 до 8,0. Найоптимальнішим виявився рН для штамів АС 25 та 28 – 7,5, для штаму АС 31- 7,0.

Вплив інкубаційного періоду на *Azotobacter* spp. вивчали шляхом зміни інкубаційного періоду на 24-48-72 години. Найкращим був період 48 годин. *Azotobacter* AC 25 продемонстрував максимальний ріст, тобто 0,92 мг/мл, після інкубаційного періоду 48 годин. У той час як *Azotobacter* AC 28 продемонстрував максимальний ріст 0,83 мг/мл.

Рістстимулюючу активність найкраще проявив штам AC 25. Порівняно з контрольним варіантом найкращим виявився штам AC 25, за дії якого енергія проростання насіння редису була найвищою – 97,1%, довжина коренів та пагонів становила 5,3 та 4,2 см відповідно (у контролі 4,2 см), у решти штамів – 2,3-4,5 см та 1,4-3,8 см відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Prusty S., Ranjan Kumar Sahoo, Ritu Sharaya, Narendra Tuteja, Sarvajeet Singh Gill Unraveling the potential of native *Azotobacter* and *Azospirillum* spp. formulations for sustainable crop production of rice (*Oryza sativa* L. var. Khandagiri): *South African Journal of Botany* 2023, P. 10-19.
2. Aasfar et al. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability *Front. Microbiol.*, 2021.
3. *Rhizophagus irregularis* and nitrogen fixing *azotobacter* enhances greater yam (*Dioscorea alata*) biochemical profile and upholds yield under reduced fertilization: *Saudi Journal of Biological Sciences / Anand Kumar and others.* 2022. P. 3694–3703.
4. Rather H. A., *Bio-fertilizers in Organic Agriculture: Journal of Phytology* 2010. P. 42–54.
5. Emam N. F., Fayez M., Makboul H. E. Wheat growth as affected by inoculation with *Azotobacter* isolated from different soils. *Zentralbl. Microbiol.*, 1986. P. 17-23.
6. Bharat Mani Upadhyay, Elwin G. Smith, M. Lucila. Favret an innovative approach for modeling crop yield response to fertilizer nutrients: CEA CAES annual meeting, Montreal, Quebec, 2006. P. 30.
7. *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management: *Saudi Journal of Biological Sciences / Aisha Sumbul etc.* 2020, P. 3634-3640.
8. Біологія мікроорганізмів: підручник / За ред. О.П. Миколаєнко. К.: Вища школа, 2018.
9. Кузнецова І.А., Гончар М.В. “Мікробіологія” К.: Либідь, 2017.
10. Madigan M.T., Bender K.S., Buckley D.H. et al. (2022). *Brock Biology of Microorganisms*, 16th ed. Pearson.

11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2: *The Proteobacteria*, Part B: *The Gammaproteobacteria* (2005)
12. Kizilkaya, R. (2009). "Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter spp.* strains isolated from soils in different ecosystems." *Journal of Environmental Biology*, 30(1): 73–82.
13. Biological Nitrogen Fixation (eds. G. Stacey, R. H. Burris, H. J. Evans). Springer 1992.
14. Catalysts for Nitrogen Fixation: Nitrogenases, Relevant Chemical Models and Commercial Processes (B. E. Smith, R. L. Richards, W. E. Newton). Springer 2004.
15. Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes. Springer 2022.
16. Aasfar A. et al., "Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability." *Frontiers in Microbiology* 12:628379, 2021
17. "Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA–NifL System for Nitrogen Fixation." *International Journal of Molecular Sciences* 24(2):907, 2023.
18. "Nitrogen Fixation: Methods and Protocols" (eds. M. W. Ribbe). Springer 2011.
19. https://hfagro.com.ua/storage/downloads/HF-Agro_AZOTER_ua.pdf
20. Bindraban, P. S., Dimkpa, C., Nagarajan, L., Roy, A., and Rabbinge, R. (2015). Revisiting fertilisers and fertilisation strategies for improved nutrient uptake by plants. *Biol. Fertil. Soils* 51, 897–911. doi: 10.1007/s00374-015-1039-7
21. Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., & Dhiba, D. (2018). Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Frontiers in microbiology*, 9, 1606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>

22. Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Bennis I, Zeroual Y and Meftah Kadmiri I (2021) Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Front. Microbiol.* 12:628379. doi: 10.3389/fmicb.2021.628379
23. Patil, S. V., Mohite, B. V., Patil, C. D., Koli, S. H., Borase, H. P., and Patil, V. S. (2020). "Azotobacter," in *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, ed. Academic Press (Berlin: Springer), 397–426.
24. Brown, M. E. (1974). Seed and root bacterization. *Annu. Rev. Phytopathol. Rev.* 12, 181–197.
25. Patil, H. J., and Solanki, M. K. (2016). "Microbial inoculant: modern era of fertilizers and pesticides," in *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives*, eds D. P. Singh, H. B. Singh, and R. Prabha (New Delhi: Springer), 319–343. doi: 10.1007/978-81-322-2647-5_19
26. Baars, O., Zhang, X., Morel, F. M., & Seyedsayamdost, M. R. (2015). The Siderophore Metabolome of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 27–39. <https://doi.org/10.1128/AEM.03160-15>
27. Omer, Amal & Emara, Hassan & Zaghloul, Rashed & Abdel-Monem, Mohamed. (2016). Potential of *Azotobacter Salinestr*is as Plant Growth Promoting Rhizobacteria under Saline Stress Conditions. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
28. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу "Промислова мікробіологія та санітарія" : для студентів спец. 226 "Фармація, промислова фармація" / уклад.: Т. О. Овсяннікова, Є. О. Посохов; Нац. техн. ун-т "Харків. політехн. ін-т". Харків : Планета Прінт, 2021. 72 с.
29. Поліщук Н.М. [та ін.]. Практикум з мікробіології, вірусології та імунології. Розділ 1 «Морфологія і фізіологія мікроорганізмів. Інфекція. Імунітет. Загальна і спеціальна вірусологія». Запоріжжя : ЗДМУ, 2021. 141 с.

30. Chen, J., Lan, X., Jia, R., Hu, L., & Wang, Y. (2022). Response Surface Methodology (RSM) Mediated Optimization of Medium Components for Mycelial Growth and Metabolites Production of *Streptomyces alfalfae* XN-04. *Microorganisms*, 10(9), 1854. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091854>
31. Pozo, Clementina & Martinez-Toledo, M. & Rodelas, Belén & Gonzalez-Lopez, Jesus. (2002). Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *Journal of biotechnology*. 97. 125-31. 10.1016/S0168-1656(02)00056-1.
32. Корнійчук М. С. Дослідження бактеріальної композиції із родів *Rhizobium* та *Azotobacter* як рістстимулювального біопрепарату для органічного землеробства / М. С. Корнійчук, Н. Л. Заярнюк, В. Г. Червцова, О. В. Федорова // *Chemistry, Technology and Application of Substances*. 2018. 1, № 1. С. 78-82.
33. Juárez, B.C., Martínez-Toledo, M.V., & González-López, J. (2005). Growth of *Azotobacter chroococcum* in chemically defined media containing *p*-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid. *Chemosphere*, 59 9, 1361-5.
34. S, Rajae & Alikhani, Hossein & Raiesi, Fayez. (2007). Effect of Plant Growth Promoting Potentials of *Azotobacter chroococcum* Native Strains on Growth, Yield and Uptake of Nutrients in Wheat. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*.
35. Kerečki, S., Pećinar, I., Karličić, V., Mirković, N., Kljujev, I., Raičević, V., & Jovičić-Petrović, J. (2022). *Azotobacter chroococcum* F8/2: a multitasking bacterial strain in sugar beet biopriming. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 719–730. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2091802>
36. Cappuccino JG, Sherman N. 1996. *Microbiology – a laboratory manual*. Menlo Park (CA): The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. Cardoso AII, Magro

FO, Oliveira JMX, Abrahão C, Tavares AEB, Fernandes DM. 2017. Accumulation of macronutrients in beetroot plant. *Hortic Bras.* 35(3):328–334.

37. Chhikara N, Kushwaha K, Sharma P, Gat Y, Panghal A. 2019. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: a critical review. *Food Chem.* 272:192–200.

38. Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd_Allah EF, Hashem A. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol.* 8:2104.

39. Gandhi A, Muralidharan G. 2016. Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. isolated from rice rhizosphere. *Euro J Soil Biol.* 76:1–8.

40. Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Chen Z, Duan J, McConkey B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Plant Sci.* 26(5–6):227–242.

41. Jiménez DJ, Montaña JS, Martínez MM. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Braz J Microbiol.* 42(3):846–858.