

УДК: 579.64:631.461.51

## Вплив сполук фосфору на утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272

Г.І. Звір, Г.М. Різун, С.О. Гнатуш

У статті наведено результати дослідження впливу неорганічних сполук фосфору (калію гідроортофосфату, натрію гідроортофосфату) та фосфорних добрив (суперфосфату, фосфоритного борошна) на нагромадження біомаси та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272. Натрію гідроортофосфат, суперфосфат та фосфоритне борошно вносили у середовище культивування (середовище Ешбі) замість  $K_2HPO_4$  у концентраціях, еквімолярних концентрації фосфат-іонів у середовищі Ешбі, і вдвічі вищих. Встановлено, що  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , суперфосфат та фосфоритне борошно в еквімолярній концентрації стимулювали нагромадження біомаси *A. chroococcum* ВКМ В-1272, проте за підвищеної концентрації пригнічували ріст бактерій порівняно з контролем. Зростання концентрації  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  і  $K_2HPO_4$  у середовищі культивування пригнічувало не тільки ріст, але й утворення іонів амонію бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272. Фосфорні добрива за усіх концентрацій інгібували процес азотфіксації. Досліджено також ефективність використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 сполук фосфору у процесі росту. Встановлено, що розчинні неорганічні сполуки (калію гідроортофосфат, натрію гідроортофосфат) бактерії можуть з різною ефективністю використовувати як джерело фосфору. У середовищі з  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $K_2HPO_4$  та суперфосфатом спостерігали зниження концентрації фосфат-іонів, що свідчить про використання їх бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту. Зростання вмісту фосфат-іонів у середовищі з фосфоритним борошном свідчить про здатність бактерій до фосфатмобілізації. Отже, нагромадження біомаси та утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 залежало від природи та концентрації джерела фосфору у середовищі росту. Тому подальші дослідження впливу фосфорного живлення на фізіолого-біохімічні властивості азотофіксувальних бактерій дозволять оцінити чутливість *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до дії неорганічних забруднювачів та показати важливість раціонального використання у сільському господарстві фосфорних добрив.

**Ключові слова:** азотфіксація, азотофіксувальні бактерії, іони амонію, сполуки фосфору, фосфорні добрива, фосфатмобілізація.

**Про авторів:** Г.І. Звір – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, galynazvir@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

Г.М. Різун – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, rszun@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

С.О. Гнатуш – Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, gnatur88@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

### Вступ

Фосфор є одним із найважливіших макроелементів, необхідних для метаболізму рослин. Він сприяє розвитку кореневої системи, прискореному росту рослин на початкових стадіях їхнього розвитку, поліпшує водний режим рослин, впливаючи на врожайність та показники якості врожаю. За нестачі фосфору пригнічується ріст вегетативних органів, знижується стійкість рослин до посухи тощо. У ґрунтах фосфор міститься у мінеральній та органічній формах. Доступними для рослин є лише розчинні фосфати, концентрація яких у ґрунтах є нижчою порівняно із вмістом важкорозчинних мінеральних солей – фосфатів кальцію, алюмінію, феруму, магнію, солей метафосфатної, пірофосфатної та інших кислот, а також органічних сполук (складних білків, фосфатидів, фітину тощо) (Бербець та ін., 2006; Гуляев, Патыка, 2004). Рослини можуть засвоювати фосфор з малорозчинних і нерозчинних сполук після гідролізу їх у ґрунті і перетворення за допомогою фосфатаз до ортофосфатної кислоти та її солей.

Мікроорганізми є важливою частиною процесу ґрунтоутворення та ланкою, що забезпечує екологічний баланс будь-якої ґрунтової екосистеми. Завдяки активності мікроорганізмів у ґрунті накопичуються сполуки нітрогену, фосфору і калію, необхідні для росту рослин. ґрунтові мікроорганізми, яким притаманна фосфатазна активність, сприяють зростанню концентрації фосфатів у ґрунтовому розчині, покращують засвоюваність рослинами слабкорозчинних фосфатів ґрунту (Лаврентьєва та ін., 2015). Вивільнення нерозчинних і малорухомих форм фосфору здійснюють фосфатмобілізуювальні бактерії, що належать до родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*,

*Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Azospirillum*, *Flavobacterium* і *Erwinia* (Баб'єва і др., 2005; Пати́ка та ін., 2003; Nosrati et al., 2014). Вони здатні перетворювати у доступну для рослин форму трикальційфосфат, дикальційфосфат, гідроксиапатит, кам'яний фосфат завдяки секреції низькомолекулярних органічних кислот, переважно глюконових та кетоглюконових, та фосфатаз (Курдиш, 2012; Sashidhar, Podile, 2010).

Бактерії роду *Azotobacter* – вільноживучі азотофіксувальні бактерії, які отримують енергію завдяки окисно-відновним реакціям, використовуючи як донор електронів органічні сполуки; молекулярний азот фіксують за відсутності у середовищі росту зв'язаних форм нітрогену. Процес відновлення атмосферного азоту до аміаку у клітинах цих бактерій відбувається у три етапи: азот → диімін → підразин → аміак. Аміак, який утворився, вони використовують для синтезу амінокислот (Nosrati et al., 2014).

Бактерії роду *Azotobacter* чутливі до вмісту у середовищі фосфору, калію, кальцію, бору, магнію та органічних речовин. Як джерело фосфору ці бактерії можуть використовувати мінеральні та органічні фосфоровмісні сполуки. Більшість штамів роду здатні до фосфатмобілізації важкорозчинних сполук фосфору у ґрунті завдяки продукуванню кислих продуктів обміну у середовище (Nosrati et al., 2014; Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015). Наявність у ґрунті азотофіксувальних бактерій може забезпечити рослинам достатню кількість сполук нітрогену та сприяти гідролізу широкого спектру фосфоровмісних сполук, що веде до підвищення врожайності. Однак мінеральні добрива можуть чинити вплив на метаболічні процеси, що протікають у клітинах бактерій роду *Azotobacter*, зокрема на процес діазотрофії.

Мета дослідження – дослідити вплив неорганічних сполук фосфору та фосфорних добрив на ріст та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272; оцінити можливість бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 використовувати фосфат-іони у процесі росту.

#### Об'єкти та методи дослідження

Об'єктом дослідження були азотофіксувальні бактерії *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272, що зберігаються в музейній колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 вирощували у пробірках об'ємом 20 мл у середовищі Ешбі упродовж 2–3 діб за температури 28°C та аеробних умов, а також у модифікованому середовищі Ешбі, вносячи замість  $K_2HPO_4$  інші джерела фосфору (натрію гідроортофосфат ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), суперфосфат ( $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O + H_3PO_4 + CaSO_4$ ), фосфоритне борошно ( $Ca_3(P_2O_7)_2$ ), концентрація яких була еквімолярною концентрації фосфат-іонів у середовищі Ешбі чи вдвічі вища. Контролем було середовище Ешбі, у яке вносили  $K_2HPO_4$  у концентрації 0,22 г/л.

Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин фотометруванням на фотоелектроколориметрі КФК-3 ( $\lambda = 390$  нм) у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою:

$$C \text{ (г/л)} = E_{390} \cdot n / K,$$

де  $E_{390}$  – екстинкція за довжини хвилі 390 нм;  $n$  – розведення, разів;  $K$  – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від сухої маси клітин ( $K = 0,77$ ). Концентрацію іонів амонію вимірювали фотоелектроколориметричним методом ( $\lambda = 640$  нм) (Гудзь та ін., 2014), фосфат-іонів – спектрофотометричним методом ( $\lambda = 380\text{--}410$  нм), який ґрунтується на реакції утворення жовтої фосфорномолібденової гетерополікислоти  $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$  (Зінчук, Левицька, 2000).

Усі досліди проводили у п'яти повторностях. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували  $t$ -критерій Стьюдента. Достовірною вважали різницю при рівні значимості  $p \leq 0,05$  (Лакин, 1990).

### Результати та обговорення

Для здійснення процесів живлення і розмноження бактеріям необхідні поживні речовини, з яких вони синтезують компоненти клітин і отримують внаслідок процесів окиснення чи відновлення енергію. Азотофіксувальні бактерії роду *Azotobacter* – облігатні аероби, здатні рости за низьких концентрацій кисню, використовуючи як джерело карбону різні вуглеводи, спирти й органічні кислоти, як джерело нітрогену – солі амонію, нітрити, нітрати, сечовину, амінокислоти. Тому на ріст бактерій роду *Azotobacter* і процес діазотрофії великий вплив має мінеральний склад ґрунту. Зокрема, фіксування нітрогену інгібується за наявності доступних джерел зв'язаного нітрогену, наприклад нітратних добрив, які містять іони амонію або нітрату; відсутність або нестача фосфору у середовищі росту сповільнює ріст культури і негативно впливає на засвоєння нітрогену (Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015; Saribay, 2003). Тому ми дослідили, як впливають неорганічні сполуки фосфору та фосфорні добрива на ріст та утворення іонів амонію клітинами азотофіксувальних бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272.

Для забезпечення росту у середовище культивування азотофіксувальних бактерій неорганічні фосфати вносять у вигляді кислих солей  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  чи  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Вони забезпечують певне значення рН середовища (буферність розчину). За умови росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі Ешбі (контроль), де джерелом фосфору був калій гідроортофосфат у концентрації 0,22 г/л, біомаса становила  $1,20 \pm 0,01$  г/л на 24 год культивування та  $1,600 \pm 0,012$  г/л на 48 год росту (рис. 1).

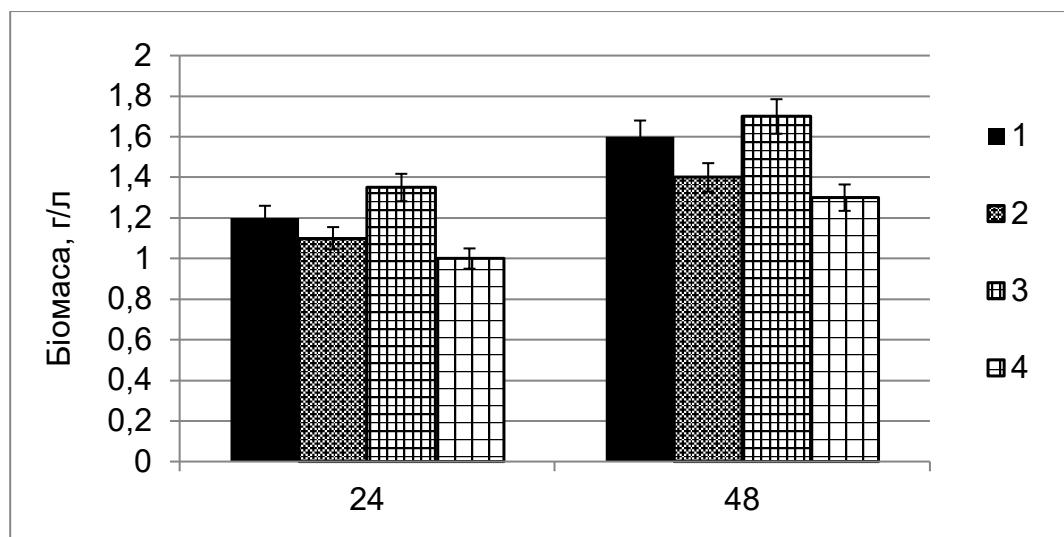


Рис. 1. Нагромадження біомаси азотофіксувальними бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2); у модифікованому середовищі Ешбі з  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (4)

Збільшення концентрації  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  вдвічі призвело до зниження нагромадження біомаси бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 порівняно з контролем на 8–12 %. Додавання у середовище Ешбі натрій гідроортофосфату замість  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  в еквімолярній концентрації сприяло зростанню нагромадження біомаси на 6–12 %. Проте за підвищеної концентрації  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  нагромадження біомаси бактеріями знизилася порівняно з контролем на 17–19 % упродовж культивування бактерій.

Негативно позначилося внесення у живильне середовище підвищених концентрацій натрію/калію гідроортофосфату і на фіксуванні атмосферного азоту дослідженими бактеріями. За умови підвищеного вмісту калій гідроортофосфату концентрація іонів амонію у культуральній рідині *A. chroococcum* ВКМ В-1272 знизилася порівняно з контролем приблизно на 27–35 % (рис. 2).

За умови внесення у середовище Ешбі натрію гідроортофосфату замість  $K_2HPO_4$  в еквімолярній концентрації утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 незначно сповільнилося порівняно з контролем (на 3–5 %), проте за умови збільшення концентрації  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  вдвічі вміст іонів амонію у середовищі культивування знизився на 50–54 %. Отже, зростання концентрації калію/натрію гідроортофосфату у середовищі культивування пригнічує не тільки ріст, але й утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272.

Неорганічні фосфати (натрію гідроортофосфат, калію гідроортофосфат), використані у роботі як джерело фосфору, людина застосовує у різних сферах свого життя:  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  відомий як харчова добавка Е339, емульгатор і буфер для виробництва плавлених сирів, консервант;  $K_2HPO_4$  має значення не тільки як регулятор кислотності, він входить до складу комплексних добрив, його використовують у фармакологічному виробництві, як харчову добавку Е340, стабілізатор, розпушувач тощо (Ластухін, 2009). Тому забруднення довкілля неорганічними забруднювачами є не менш актуальним, ніж забруднення важкими металами, пестицидами, нафтопродуктами тощо. Безпечними для людини неорганічні фосфати є за умови застосування їх відповідно до належної виробничої практики, а їхній вміст у навколишньому середовищі повинен відповідати Державним санітарним нормам та правилам (ГОСТ 31725-2012; Markou et al., 2012). У літературі описано вплив неорганічних фосфатів на ріст, нагромадження біомаси та метаболічні процеси мікроорганізмів на прикладі ціанобактерій *Anabaena variabilis* та *Westiellopsis prolifica*, *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Yandigeri et al., 2010; Markou et al., 2012). Тому отримані нами результати дають цінну інформацію щодо культивування азотофіксувальних бактерій роду *Azotobacter*.

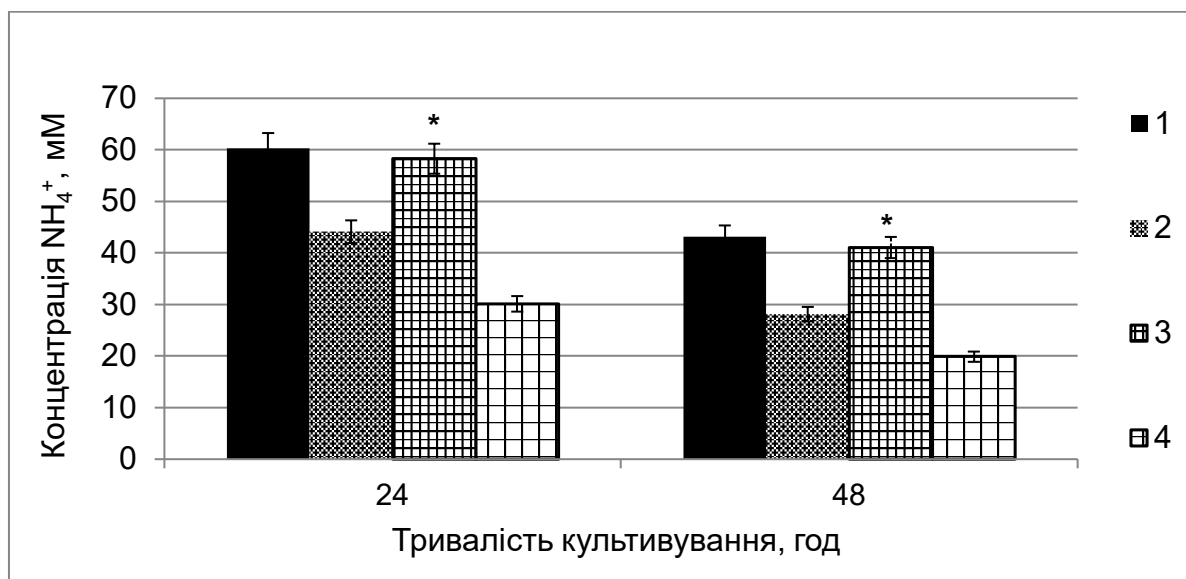


Рис. 2. Концентрація іонів амонію у культуральній рідині азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 за умови росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $K_2HPO_4$  (2); у модифікованому середовищі Ешбі з  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (4) (\* $p \leq 0,05$ )

Оскільки більшість сполук фосфору у ґрунті малорозчинна, застосування фосфорних добрив необхідне для підвищення врожаю сільськогосподарських культур. Хоча фосфорні добрива менш небезпечні для рослин навіть за дуже високих концентрацій порівняно з нітратними, оскільки не підвищують концентрації ґрунтового розчину, проте і для них потрібно дотримувати певних норм внесення залежно від типу ґрунту і видів добрив, оскільки вони можуть вплинути на автохтонну мікробіоту (Патика та ін., 2005). Зважаючи на здатність бактерій роду *Azotobacter* до фосфатмобілізації, актуальним було з'ясувати, які фосфорні добрива вони здатні використовувати (розчинні чи слабозрозчинні), та як ці сполуки впливають на нагромадження біомаси та утворення

іонів амонію дослідженими бактеріями. У роботі використано водорозчинне фосфорне добриво – суперфосфат – та слабозчинне – фосфоритне борошно. Результати досліджень наведено на рис. 3–4.

Унаслідок додавання у середовище Ешбі суперфосфату як джерела фосфору нагромадження біомаси бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 зросло порівняно з контролем на 13–16 %. Фосфоритне борошно за еквімолярної за фосфатом концентрації стимулювало ріст культури порівняно з контролем на 7–18 %. Підвищення концентрації фосфорних добрив удвічі спричинило зниження нагромадження біомаси дослідженими бактеріями порівняно з контролем та зразками, у які добрива вносили в еквімолярних за джерелом фосфору концентраціях (рис. 3).

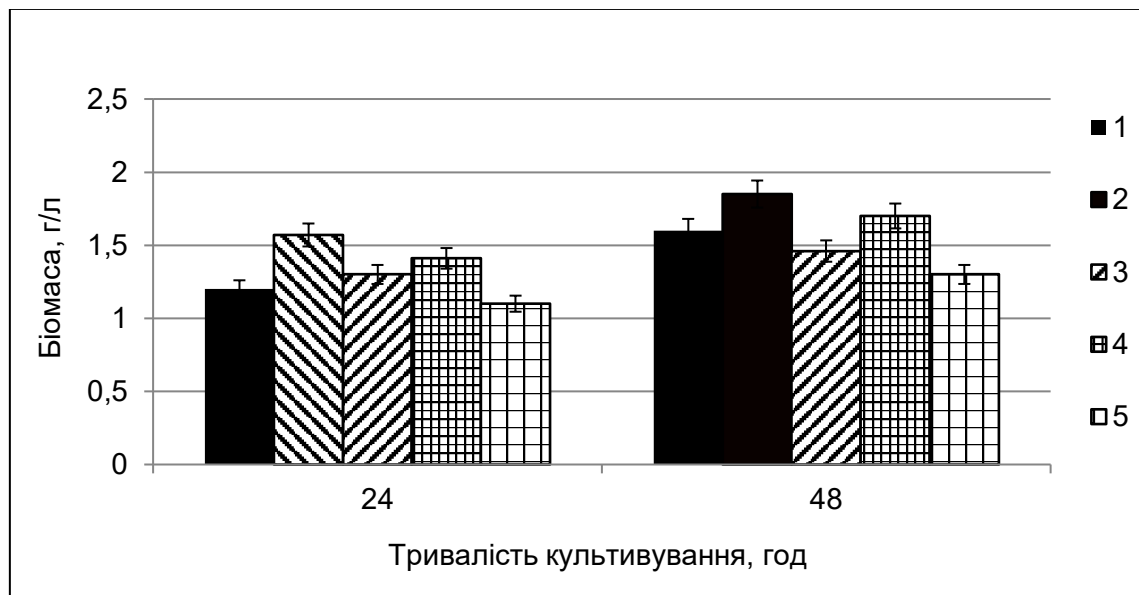


Рис. 3. Нагромадження біомаси азотофіксувальними бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5)

На відміну від нагромадження біомаси, утворення іонів амонію азотофіксувальними бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 пригнічувалося фосфорними добривами. Так, за умови внесення у середовище Ешбі суперфосфату як джерела фосфору концентрація іонів амонію у культуральній рідині *A. chroococcum* ВКМ В-1272 знизилася порівняно з контролем на 8–12 %; вдвічі вищий вміст суперфосфату спричинив зниження концентрації іонів амонію у середовищі росту бактерій на 35–37 % порівняно з контролем. За умови росту досліджених бактерій у середовищі з фосфоритним борошном процес фіксування атмосферного азоту інгібувався порівняно з контролем на 16–18 %. За умови збільшення концентрації фосфоритного борошна спостерігали зниження концентрації іонів амонію у середовищі культивування майже вдвічі порівняно з контролем (рис. 4). Отримані результати дозволяють припустити, що фосфорні добрива можуть пригнічувати процес фіксування атмосферного азоту бактеріями роду *Azotobacter*. На нашу думку, однією з причин цього може бути підкислення середовища росту азотофіксувальних бактерій, що позначається на інтенсивності споживання енергетичного матеріалу і продуктивності діазотрофії бактеріями роду *Azotobacter* (Гуляев, Патыка, 2004; Курдиш, 2012; Jnawali et al., 2015).

Потребу бактерій роду *Azotobacter* у фосфорному живленні можуть задовольняти різні сполуки фосфору – як розчинні, так і слабозчинні. Мобілізація фосфору з важкодоступних сполук у них здійснюється за допомогою фосфатаз на поверхні клітин і обумовлена контактною взаємодією з кислими зонами глікокаліксу. Це сприяє розчиненню кальцію фосфату і задоволенню потреби

бактерій у фосфорному живленні (Курдиш, 2012; Sashidhar, Podile, 2010). Тому цікаво було дослідити особливості використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі з різними сполуками фосфору.

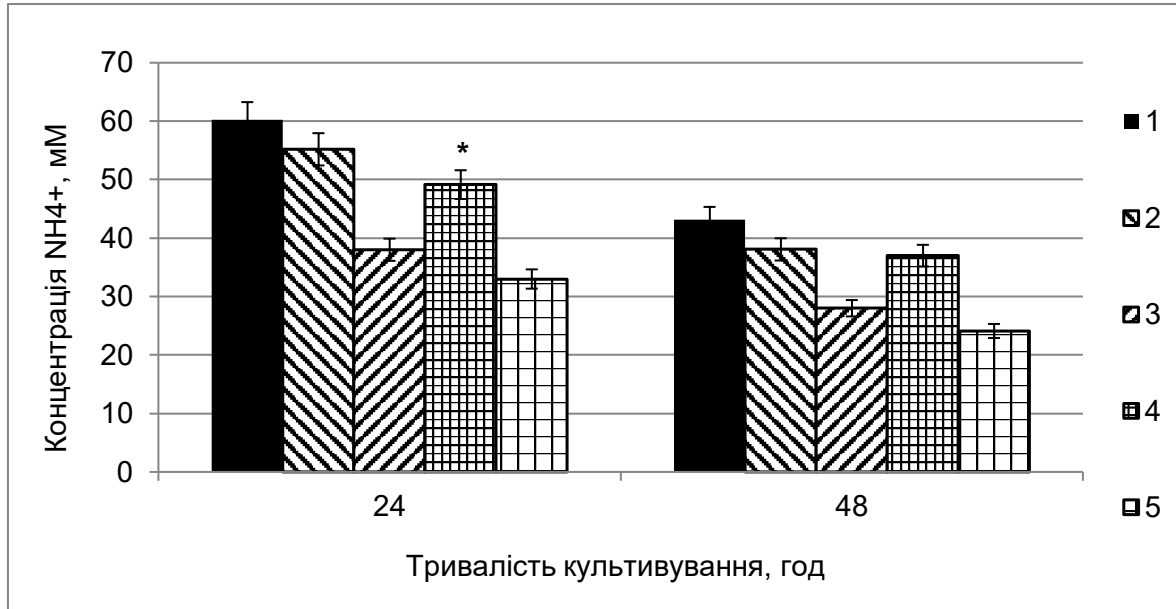


Рис. 4. Концентрація іонів амонію у культуральній рідині азотофіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5) (\* $p \leq 0,05$ )

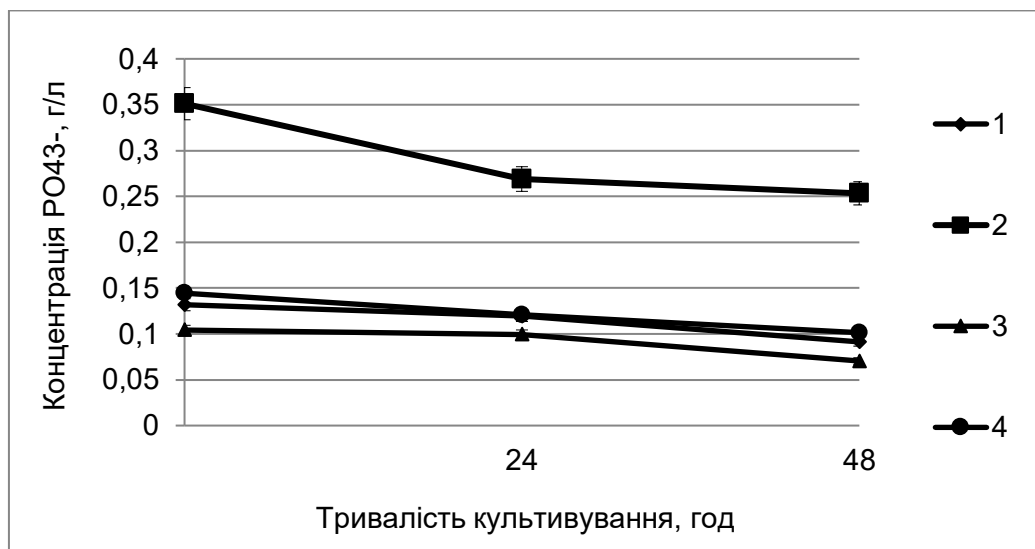


Рис. 5. Використання бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі (1); у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $K_2HPO_4$  (2); у модифікованому середовищі Ешбі з  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (3); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (4)



Ріст бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі Ешбі супроводжувався зниженням концентрації фосфат-іонів, які вносили у середовище у вигляді калію гідроортофосфату. Упродовж першої доби росту бактерії засвоїли 9 % фосфат-іонів, другої – 31 %. За умови внесення у середовище Ешбі підвищених концентрацій  $K_2HPO_4$  бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 за першу добу засвоїли 23 % фосфат-іонів, за другу – 29 % (вихідна концентрація фосфат-іонів у середовищі Ешбі становила  $0,131 \pm 0,011$  г/л, у середовищі Ешбі з підвищеним вмістом  $K_2HPO_4$  –  $0,351 \pm 0,023$  г/л) (рис. 5).

За умови росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у середовищі з натрій гідроортофосфатом концентрація фосфат-іонів впродовж першої доби знизилася на 13 %, другої – на 33 % порівняно з контролем. У середовищі Ешбі з підвищеною концентрацією  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  бактерії використали за першу добу 9 % фосфат-іонів, за другу – 11 %. Отже, розчинні неорганічні сполуки (калію гідроортофосфат, натрію гідроортофосфат) бактерії *A. chroococcum* ВКМ В-1272 можуть з різною ефективністю використовувати у процесі росту як джерело фосфору.

Під час росту бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом концентрація фосфат-іонів знизилася на 8 %. За умови зростання концентрації суперфосфату бактерії упродовж двох діб засвоїли 3,5 % фосфат-іонів (рис. 6).

Унаслідок додавання у середовище Ешбі фосфоритного борошна замість  $K_2HPO_4$  концентрація фосфат-іонів зросла на 9–16 % упродовж першої-другої діб, що може свідчити про фосфатмобілізувальні властивості *A. chroococcum* ВКМ В-1272. У середовищі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна концентрація фосфат-іонів суттєво не зросла порівняно зі зразком, у який вносили фосфоритне борошно в еквімолярній за  $K_2HPO_4$  концентрації. Можливо, фосфат-іони, вивільнені бактеріями у процесі фосфатмобілізації з фосфоритного борошна, у середовищі не накопичуються, а використовуються культурою у процесі росту. За даними літератури, не завжди мікроорганізми, які проявляють високі фосфатмобілізувальні властивості, утворюючи значні зони розчинення ортофосфату кальцію на щільному живильному середовищі, утворюють високі концентрації фосфат-іонів у рідкому середовищі (Лаврентьєва та ін., 2011).

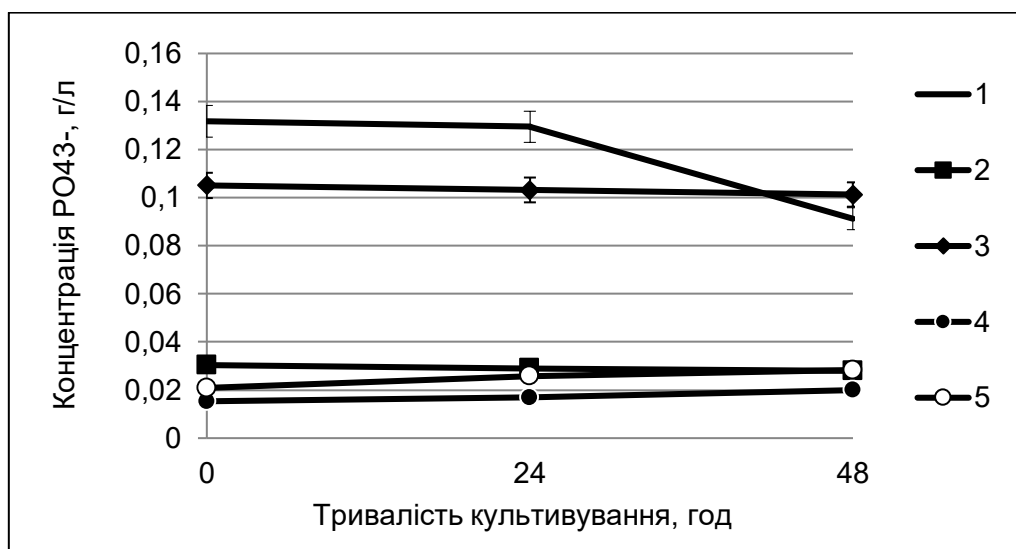


Рис. 6. Використання бактеріями *Azotobacter chroococcum* ВКМ В-1272 фосфат-іонів під час росту у середовищі Ешбі (1); у модифікованому середовищі Ешбі з суперфосфатом (2); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом суперфосфату (3); у модифікованому середовищі Ешбі з фосфоритним борошном (4); у модифікованому середовищі Ешбі з підвищеним вмістом фосфоритного борошна (5)

Отже, азотофіксувальні бактерії роду *Azotobacter* можуть використовувати у процесі росту різні джерела фосфору – як розчинні, так і малорозчинні. Натрію і калію гідроортофосфат вони засвоюють

краще порівняно з суперфосфатом. Малорозчинне фосфоритне борошно досліджені бактерії теж використовують у метаболічних процесах завдяки здатності до фосфатмобілізації. Проте підвищені кількості цих сполук негативно впливають на нагромадження біомаси та фіксування атмосферного азоту цими бактеріями. Тому отримані нами результати не лише дають цінну інформацію щодо культивування азотофіксувальних бактерій роду *Azotobacter*, але свідчать також про чутливість азотофіксувальних бактерій *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до вмісту у середовищі росту неорганічних забруднювачів та важливість раціонального використання у сільському господарстві фосфорних добрив.

#### Список літератури / References

- Бабьева И.П., Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. (2005). Биология почв. М.: Изд-во Московского ун-та. 445 с. [Babeyeva I.P., Zviagintsev D.G., Zenova G.M. (2005). *Soil biology*. Moscow: Moscow State University. 445 p.]
- Бербець М.А., Назаренко І.І., Том'юк Б.П. (2006). Про домінуючі фосфати твердих фаз ґрунту. *Ґрунтознавство*, 7(3–4), 15–20. [Berbets N.A., Nazarenko I.I., Tomyuk B.P. (2006). The dominating phosphates of the soil's solid phases. *Gruntoznavstvo (Soil Science)*, 7(3–4), 15–20.]
- ГОСТ 31725-2012. Добавки пищевые. Натрия фосфаты Е339. Общие технические условия. [GOST 31725-2012. Food supplements. Sodium phosphate E339. General specifications.]
- Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В. та ін. (2014). Практикум з мікробіології. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. 436 с. [Gudz S.P., Hnatush S.O., Yavorska G.V. et al. (2014). *Workshop on microbiology*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 436 p.]
- Гуляев Б.И., Патыка В.Ф. (2004). Фосфор как энергетическая основа процессов фотосинтеза, роста и развития растений. *Агроэкологический журнал*, 2, 3–9. [Gulyaev B.I., Patyka V.P. (2004). Phosphorus as the energy basis of photosynthesis, growth and development of plants. *Agroecological Journal*, 2, 3–9.]
- Зінчук В.К., Левицька Г.Д. (2000). Лабораторний практикум з аналітичної хімії для студентів хімічного факультету. Львів: ЛНУ імені Івана Франка. 98 с. [Zinchuk V.K., Levytska H.D. (2000). *Laboratory workshop on analytical chemistry for students of the faculty of chemistry*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv. 98 p.]
- Курдиш І.К. (2012). Роль мікроорганізмів у відтворенні родючості ґрунтів. *Сучасні аграрні технології*, 5, 10–19. [Kurdysh I.K. (2012). The role of microorganisms in rehabilitation of soil fertility. *Modern Agricultural Technology*, 5, 10–19.]
- Лаврентьева К.В., Харченко П.І., Черевач Н.В., Вінніков А.І. (2015). Фактори, що впливають на мобілізацію малорозчинних фосфатів ґрунтовими бактеріями. *Землеробство*, 3, 15–20. [Lavrentyeva K.V., Kharchenko P.I., Cherevach N.V., Vinnikov A.I. (2015). Factors affecting the mobilization of poorly soluble phosphates by soil bacteria. *Zemledelie*, 3, 15–20.]
- Лаврентьева К.В., Черевач Н.В., Вінніков А.І. (2011). Мобілізація фосфору з ортофосфату кальцію деякими ґрунтовими бактеріями. *Мікробіол. журн.*, 73(4), 41–45. [Lavrentyeva K.V., Cherevach N.V., Vinnikov A.I. (2011). Phosphorus mobilization from calcium orthophosphate by some soil bacteria. *Microbiol. J.*, 73(4), 41–45.]
- Лакин Г.Ф. (1990). Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с. [Lakin G.F. (1990). *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola. 352 p.]
- Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. (2003). Біологічний азот. К.: Світ. 422 с. [Patyka V.P., Kots S.Ya., Volkohon V.V. et al. (2003). *Biological nitrogen*. Kyiv: Svit. 422 p.]
- Ластухін Ю.О. (2009). Харчові добавки. Е-коди. Будова. Одержання. Властивості. Львів: Центр Європи, 2009. 836 с. [Lastukhin Yu.O. (2009). *Nutritional supplements. E-codes. Structure. Obtaining. Properties*. Lviv: Center of Europe. 836 p.]
- Патика В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. (2005). Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів. К.: Основа. 300 с. [Patyka V.P., Makarenko N.A., Mokliachuk L.I. (2005). *Agroecological evaluation of mineral fertilizers and pesticides*. Kyiv: Osnova. 300 p.]
- Jnawali A., Ojha R., Marahatta S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability – a review. *Adv. Plants Agric. Res.*, 2(6), 250–253. <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
- Markou G., Chatzipavlidis I., Georgakakis D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28(8), 2661–2670. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1076-4>



Nosrati R., Owlia P., Saderi H. et al. (2014). Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iran J. Microbiol.*, 6(4), 285–295.

Saribay G.F. (2003). *Growth and nitrogen fixation dynamic of Azotobacter chroococcum in nitrogen-free and OMW containing medium* [Department of Food Engineering]. The Middle East Technical University. 68 p.

Sashidhar B., Podile A. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *J. Appl. Microbiol.*, 109(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04654.x>

Yandigeri M.S., Yadav A.K., Meena K.K., Pabbi S. (2010). Effect of mineral phosphates on growth and nitrogen fixation of diazotrophic cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Westiellopsis prolifica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(3), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9411-y>

## **Influence of phosphorus compounds on the formation of ammonium ions by cells of nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter chroococcum* VKM V-1272**

G.I. Zvir, H.M. Rizun, S.O. Hnatush

This article presents the results of investigation of the influence of inorganic compounds of phosphorus (potassium hydroorthophosphate, sodium hydroorthophosphate) and phosphorus fertilizers (superphosphate, phosphorite flour) on the accumulation of biomass and the formation of ammonium ions by the cells of nitrogen-fixing bacteria *A. chroococcum* VKM V-1272. Sodium hydrophosphate, superphosphate and phosphorite flour were introduced into the culture medium (Ashby medium) instead of  $K_2HPO_4$  at equimolar concentrations to the phosphate ion concentration in Ashby medium and at double concentration. It was established that  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , superphosphate and phosphorite flour at equimolar concentration stimulated the accumulation of biomass of *A. chroococcum* VKM V-1272, but at higher concentration they inhibited bacterial growth when compared to control. An increase of the concentration of  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  and  $K_2HPO_4$  in the culture medium there was inhibited not only the growth but also the formation of ammonium ions by *A. chroococcum* VKM V-1272 bacteria. Phosphate fertilizers at all concentrations inhibited the nitrogen fixation process. The effectiveness of the using of phosphorus compounds by bacteria *A. chroococcum* VKM V-1272 in the growth process has also been investigated. It has been established that soluble inorganic compounds (potassium hydroorthophosphate, sodium hydroorthophosphate) can be used by bacteria with different effectiveness as a source of phosphorus. In a medium with  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $K_2HPO_4$  and superphosphate we observed a decrease of the concentration of phosphate ions that evidences that bacteria *A. chroococcum* VKM B-1272 use them during growth. Increasing of the concentration of phosphate ions in the medium with phosphorite flour indicates the ability of bacteria to phosphate mobilization. So the accumulation of biomass and the formation of ammonium ions by nitrogen-fixing bacteria *A. chroococcum* VKM B-1272 depended on the nature and concentration of the phosphorus source in the growth medium. Therefore, further studies of the influence of phosphorus nutrition on the physiological and biochemical properties of nitrogen-fixing bacteria will allow to evaluate the sensitivity of *A. chroococcum* VKM B-1272 to the action of inorganic pollutants and to show the importance of rational use of phosphorus fertilizers in agriculture.

**Key words:** *nitrogen fixation, nitrogen-fixing bacteria, ammonium ions, phosphorus compounds, phosphorus fertilizers, phosphate mobilization.*

### **About the authors:**

G.I. Zvir – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, [galynazvir@ukr.net](mailto:galynazvir@ukr.net), <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

H.M. Rizun – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, [rszun@ukr.net](mailto:rszun@ukr.net), <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

S.O. Hnatush – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine, Hrushevsky Str., 4, Lviv, Ukraine, 79005, [gmatuk88@ukr.net](mailto:gmatuk88@ukr.net), <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

## **Влияние соединений фосфора на образование ионов аммония клетками азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum* VKM B-1272**

Г.И. Звір, А.М. Різун, С.А. Гнатуш

В статье представлены результаты исследования влияния неорганических соединений фосфора (гидроортофосфата калия, гидроортофосфата натрия) и фосфорных удобрений (суперфосфата, фосфоритной муки) на накопление биомассы и образование ионов аммония клетками азотфиксирующих бактерий *A. chroococcum* VKM B-1272. Гидроортофосфат натрия, суперфосфат и фосфоритную муку добавляли в среду

культивування (середя Ешбі) замість  $K_2HPO_4$  в концентраціях, еквімолярних концентрації фосфат-іонів в середя Ешбі, і в два рази вище. Установлено, що  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , суперфосфат і фосфоритна мука в еквімолярній концентрації стимулювали накоплення біомаси *A. chroococcum* ВКМ В-1272, однак підвищені концентрації подавляли ріст бактерій по порівнянню з контролем. Зростання концентрації  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  і  $K_2HPO_4$  в середя культивування інгібувало не тільки ріст, но і утворення іонів амонія бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272. Фосфорні добрива во всіх концентраціях інгібували процес азотфіксації. Досліджена також ефективність використання бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 зв'язаних фосфора в процесі росту. Установлено, що розчинимі неорганічні зв'язки (гідроортофосфат калія, гідроортофосфат натрія) бактерії можуть з різною ефективністю використовувати як джерело фосфора. В середя з  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $K_2HPO_4$  і суперфосфатом спостерігали зниження концентрації фосфат-іонів, що свідчить про використання їх бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 во время росту. Зростання вмісту фосфат-іонів в середя з фосфоритної мукою свідчить про здатність бактерій до фосфатомобілізації. Ітак, накоплення біомаси і утворення іонів амонія азотфіксуючими бактеріями *A. chroococcum* ВКМ В-1272 залежало від природи і концентрації джерела фосфора в середя росту. Тому далішні дослідження впливу фосфорного харчування на фізіолого-біохімічні властивості азотфіксуючих бактерій дозволять оцінити чутливість *A. chroococcum* ВКМ В-1272 до дії неорганічних забруднювачів і показати важливість раціонального використання в сільському господарстві фосфорних добрив.

**Ключові слова:** азотфіксація, азотфіксуючі бактерії, іони амонія, зв'язки фосфора, фосфорні добрива, фосфатомобілізація.

**Об авторах:**

Г.І. Звир – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, galynazvir@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-9047-4418>

А.М. Ризун – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, rszun@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-3059-3789>

С.А. Гнатуш – Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів, Україна, 79005, gnatur88@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0002-5353-102X>

**Представлено: Н.М.Гринчишин / Presented by: N.M.Grynchyshyn**

**Рецензент: О.І.Віннікова / Reviewer: O.I.Vinnikova**

*Подано до редакції / Received: 09.02.2020*