

УДК 576.809.31.

А. В. Киракосян, Ж. С. Мелконян, Э. А. Овсепян, М. М. Мкртчян

Хранение производственных и коллекционных штаммов клубеньковых бактерий и азотобактера

В настоящее время имеется обширная литература по хранению микроорганизмов под минеральным маслом, в стерильной почве, а также другими способами. (Сборник, 1967). Особое внимание уделяется хранению культур под минеральным маслом как более доступному и простому способу. Хартселл (Hartsell, 1956) сохранял под маслом штаммы многих видов микроорганизмов от 1 до 14 лет без периодических пересевов. Многие из хранившихся культур в основном сохранили физиологические и биохимические свойства. Надирова и Земляков (1970) установили, что при хранении под маслом в течение трех лет разные виды бактерий сохраняют свои основные свойства. По данным Йенсена (Jensen, 1961), разные виды клубеньковых бактерий в течение 10—40 лет выжили в стерильной почве. По данным Бонье (Bonnier, 1955), сохранение свойств штамма клевера в различных типах почв зависит от особенностей отдельных почв. Исследования Пумпянской (1964) показали, что клубеньковые бактерии, азотобактер и другие виды микроорганизмов, хранимые под минеральным маслом в течение 14—40 месяцев, сохранили жизнеспособность и физиологическую активность. Некоторые изменения культурально-морфологического, иногда и физиолого-биохимического порядка, происходящие при хранении под маслом, восстанавливаются после пересева на свежие питательные среды. Восстановление утраченных свойств после пассажей отмечается и другими исследователями.

Наша цель заключалась в том, чтобы подобрать оптимальные условия для хранения местных штаммов клубеньковых бактерий и азотобактера.

Объекты и методика исследования

Объектом наших исследований являлись клубеньковые бактерии люцерны—1 штамм, эспарцета—1 штамм, фасоли—

4 штамма, гороха—4 штамма, предоставленные нам докт. биол. наук А. П. Петросян, и по одному стандартному штамму гороха и фасоли. Использовались также по одному штамму культуры следующих трех видов азотобактера—*Az. chgo-*
osocum, *Az. nigricans* и *Az. agile*, выделенные из разных типов почв Армении.

Штаммы клубеньковых бактерий и азотобактера вносились в различные типы стерильных почв с увлажнением, примерно, 60% от полной влагоемкости, затем пробирки с зараженной почвой выдерживались в термостате при 27—28°C до воздушно-сухого состояния почв и далее хранились при комнатной температуре. Наличие бактерий в почвах проверялось периодическим засевом почв на соответствующие питательные среды методом серийных разведений.

Вышеотмеченные культуры клубеньковых бактерий и азотобактера одновременно сохранялись и на различных питательных средах. Клубеньковые бактерии сеялись на агаризованный бобовый отвар (БА) с тремя источниками энергетического материала—сахароза (1%), маннит (1%) и сахароза (0,5%) с мелассой (1%). Штаммы азотобактера сеялись на агаризованные среды Эшби, Виноградского и на модифицированную среду Федорова (вода дистиллированная—1 литр, сахароза—20 г; K_2HPO_4 —0,3 г; $CaHPO_4$ —0,1 г; $MgSO_4$ —0,2 г; K_2SO_4 —0,1 г; $NaCl$ —0,3 г; $CaCO_3$ —3,0 г; $FeSO_4$ —0,05г; H_3BO_3 —0,005г; $MnSO_4$ —0,005 г; $ZnSO_4$ —0,002г; $CuSO_4$ —0,005г; $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ —0,005 г).

На агаризованных средах штаммы клубеньковых бактерий и азотобактера хранились под стерильным медицинским вазелиновым маслом слоем в 1 см, а параллельные пробирки—без масла, при различных температурах: 6—8°, 12—14° и 27—28°C. Выживаемость и культурально-морфологические изменения исследуемых штаммов определялись периодически сменами со всех вариантов опыта на соответствующие питательные среды и микроскопированием препаратов.

Из физиологических свойств азотобактера изучена азотфиксирующая способность, для установления стабильности этого свойства при хранении. Исследованы штаммы, хранившиеся на среде Эшби без масла, под маслом и в бурой почве. Контролем служили те же культуры, хранившиеся в обычных лабораторных условиях. Азот определялся микро-методом Кьельдаля.

Сохранение физиологических свойств клубеньковых бактерий проверялось определением их вирулентности и дегидрогеназной активности. Вирулентность определялась методом Ковровцевой у клубеньковых бактерий люцерны, хранимых

в стерильном черноземе и на среде бобового агара под маслом. Дегидрогеназная активность клубеньковых бактерий люцерны, эспарцета и фасоли, хранившихся при разных условиях опыта, определялась по методу Галстяна (1962).

Результаты исследований и их обсуждение

Штаммы клубеньковых бактерий эспарцета, люцерны и фасоли хранились в течение 49 месяцев в черноземе, бурой почве и речном песке. Результаты периодических анализов этих почв приведены в табл. 1, из которой видно, что через

Таблица 1
Сохраняемость клубеньковых бактерий в разных типах почвы и речном песке

Виды и штаммы	Типы почв	Количество клеток в 1 г почвы, в млн.			
		3 месяца	15 месяцев	38 месяцев	49 месяцев
Эспарцет 46	Буряя почва	0.008	0.005	—	—
	Чернозем	0.350	0.300	0.074	0.030
	Чернозем с песком	1.300	0.700	0.300	0.024
	Речной песок	0.050	0.006	—	—
Люцерна 21	Буряя почва	8.000	—	1.600	2.800
	Буряя почва с песком	14.500	21.600	9.400	1.100
	Чернозем	39.000	116.800	26.000	13.800
	Речной песок	11.500	11.400	2.300	2.300
Фасоль 90	Буряя почва	0.430	0.200	0.060	0.400
	Буряя почва с песком	0.150	0.400	1.600	0.080
	Чернозем	3.500	5.200	0.900	0.400
	Чернозем с песком	2.000	13.100	0.700	0.040
	Речной песок	0.080	0.040	—	0.0001

Примечание: (—)—анализ не сделан.

15 месяцев количество клубеньковых бактерий люцерны и фасоли значительно увеличивалось, а в дальнейшем почти во всех вариантах число клеток сильно уменьшалось. Сравнивая данные по сохранению бактерий в разных почвах, можно заметить, что для клубеньковых бактерий лучшим субстратом являлся чернозем, об этом же известно из литературы. Поэтому в дальнейшем клубеньковые бактерии для хранения вносились только в нейтральный чернозем. Наблюдения за изме-

нениями культурально-морфологических свойств клубеньковых бактерий показали, что они лучше всего сохранялись в черноземе, а в других субстратах подвергались некоторым изменениям.

Таблица 2

Сохраняемость клубеньковых бактерий гороха и фасоли в черноземе

Виды и штаммы	Количество внесенных клеток в 1 г почвы, в млн.	Количество клеток в 1 г почвы, в млн.			
		2 суток	7 месяцев	32 месяцев	43 месяцев
Фасоль 683 (стандартный)	224,0	482,0	18,8	2,7	5,2
Фасоль 28	82,0	1060,0	68,0	11,8	2,6
Фасоль 42	—	413,0*	1,8	1,5	1,3
Фасоль 88	—	46,0*	25,7	7,0	4,7
Фасоль 102	—	92,0*	21,5	3,6	2,4
Горох 227а (стандартный)	700,0	2830,0	36,9	9,0	3,3
Горох 41	191,0	275,0	3,8	21,0	10,0
Горох 129	70,0	760,0	510,0	20,6	8,0
Горох 140	372,0	1264,0	11,8	104,6	—
Горох 144	328,0	138,0	20,0	0,3	1,3

* Анализ произведен на 25-е сутки после инокуляции почвы.

В табл. 2 приведены данные по сохраняемости количества нескольких штаммов клубеньковых бактерий фасоли и гороха в черноземе. На вторые сутки после инокуляции почвы количество клеток сильно увеличивалось, далее, в период хранения при комнатной температуре, постепенно падало, а через 3 1/2 года число их было сильно понижено по сравнению с первоначально внесенным. Однако надо полагать, что сильное уменьшение количества клеток не может привести к полному исчезновению их в почве, о чем свидетельствуют и данные Иенсена, обнаружившего клубеньковые бактерии в почве через 10—40 лет после их инокуляции.

Изменения свойств клубеньковых бактерий при разных условиях хранения на питательных средах в основном зависят от индивидуальных качеств отдельных штаммов. В общей сложности они в течение 3—4 лет хорошо сохранили культурально-морфологические свойства, но отдельные факторы отрицательно влияли на их сохраняемость. Так, в зависимости от

температуры и среды одни штаммы под вазелиновым маслом, другие—без масла не выживали. А штамм люцерны №21 под вазелиновым маслом на всех средах не выжил как при температуре 6—8°C, так и при 12—14°C. Этот штамм на второй год хранения под маслом потерял вирулентность, тогда как при хранении в почве вирулентность сохранилась. Культуры, хранившиеся на скошенных средах без масла, засыхали и перед каждым анализом за несколько часов в пробирки добавлялась стерильная питательная среда или вода. Почти все штаммы клубеньковых бактерий, хранившиеся под вазелиновым маслом при 27—28°C, по своим культурально-морфологическим свойствам видоизменились. Так как за летний период комнатная температура достигает 28—30°C и выше, то хранить их при комнатной температуре не желательно.

Таблица 3

Сохраняемость штаммов азотобактера в разных почвах и речном песке

Виды и штаммы	Типы почв	Количество клеток и г почвы, в тыс.			
		3 месяца	15 месяцев	38 месяцев	48 месяцев
Az. chroococcum 159	Бурая почва	417.0	70.0	20.0	25.0
	Бурая почва с песком	342.0	315.0	40.0	15.5
	Чернозем	345.0	180.0	70.0	22.0
	Речной песок	792.0	122.0	86.0	108.0
Az. agilis 2	Бурая почва	10.0	20.0	7.0	2.7
	Бурая почва с песком	17.0	8.0	20.0	0.6
	Чернозем	1.0	0.3	0.2	0
	Чернозем с песком	1.0	0	0	0
	Речной песок	0.2	0	0	0
Az. nigricans 106	Бурая почва	7440.0	5400.0	3500.0	1530.0
	Бурая почва с песком	6140.0	5300.0	6300.0	16000.0
	Чернозем	3800.0	1800.0	1200.0	410.0
	Чернозем с песком	1060.0	1900.0	600.0	210.0
	Речной песок	600.0	1200.0	1100.0	328.0

Различные способы хранения не влияли на дегидрогеназную активность клубеньковых бактерий люцерны, эспарцета и фасоли.

Три штамма трех видов азотобактера хранились в тех же типах почв, что и клубеньковые бактерии. В табл. 3 приведены результаты периодических исследований по сохранности азотобактера. Приведенные данные показывают, что число клеток в почвах в основном с течением времени значительно падает. Но безусловно, количество клеток при длительном хранении зависит от первоначального количества, обнаруженного в почве после инокулирования. Так, например, число клеток *Az. nigricans* в начальный период хранения в бурой почве составляло 7440 тыс. в 1 г почвы, а через 48 месяцев — 1530 тыс. Первоначальное содержание *Az. agile* в той же почве составляло 10 тыс. клеток, через 48 месяцев — 2,7 тыс., к концу исследований в черноземе и речном песке он вовсе не

Таблица 4
Азотфиксирующая способность штаммов азотобактера, хранившихся в различных условиях

Виды и штаммы	Условия хранения	Внесенный сахар в г	Усвоенный сахар в г	Фиксировано N на количество усвоенного сахара в мг	Количество N на усвоенного сахара в мг
<i>Az. chroococcum</i> 159	Эшби под маслом	0,85	0,05	1,54	30,0
	Эшби без масла	"	0,85	8,40	9,9
	Бурая почва с речным песком	"	0,85	10,22	12,0
	Контроль	"	0,80	8,54	10,4
<i>Az. nigricans</i> 106	Эшби под маслом	"	0,85	10,22	12,0
	Эшби без масла	"	0,05	1,26	25,2
	Бурая почва с речным песком	"	0,10	1,68	16,8
	Контроль	"	0,85	8,54	10,0
<i>Az. agile</i> 2	Эшби под маслом	"	0,77	9,24	12,0
	Эшби без масла	"	0,80	9,10	11,4
	Бурая почва с речным песком	"	0,85	9,52	11,2
	Контроль	"	0,85	7,14	8,5

был обнаружен. В бурой почве культурально-морфологические свойства штаммов изученных видов азотобактера хорошо сохранились, а в черноземе и речном песке *Az. agile* и *Az. nigricans* видоизменились, и особенно сильно изменился последний. Заметно, что для изученных трех штаммов азотобактера, за некоторыми исключениями, лучшим субстратом для хранения является бурая почва. В этой почве в условиях Армении азотобактеры наиболее распространены.

Из трех сред—Виноградского, Федорова и Эшби азотобактеры лучше сохранились на Эшби, вероятно, потому, что обычно в лаборатории они культивируются на этой среде. Температура 6—8°C отрицательно влияла на штаммы *Az. nigricans* и *Az. agile*, первый потерял жизнеспособность на третий год хранения на всех трех средах, а второй—на четвертый год, выжив только на среде Эшби. Хранимые под маслом штаммы азотобактера в основном видоизменились, особенно при температуре 27—28°C. Двукратный пассаж культур в большинстве не привел к восстановлению культурально-морфологических свойств, утерянных в период хранения.

В табл. 4 представлены данные по сохранности азотфиксирующей активности штаммов азотобактера. Следует отметить, что в некоторых вариантах опыта (*Az. chroococcum* на Эшби под маслом, *Az. nigricans* на Эшби без масла и в бурой почве) усвоение сахара азотобактером очень слабое—0,1—0,2%, и, соответственно, атмосферный азот фиксировался от 1,26 до 1,68 мг на 50-мл среды. При пересчете на 1 г усвоенного сахара получают завышенные данные для слабо усваивающих сахар штаммов—от 16,8 до 30,0 мг азота. В большинстве вариантов азотассимилирующая способность азотобактера была выше контрольной. Несмотря на то, что культурально-морфологические свойства при хранении в различных условиях подвержены значительным изменениям, физиологическая их функция по ассимиляции азота не ослабеваеа.

Выводы

1. Условия хранения изученных штаммов клубеньковых бактерий и азотобактера в основном зависят от индивидуальных свойств отдельных штаммов.

2. Для клубеньковых бактерий лучшим субстратом при хранении является нейтральный чернозем, а для азотобактера—бурая почва.

3. Клубеньковые бактерии, хранимые под вазелиновым маслом, в основном сохранили культурально-морфологические свойства, кроме штамма люцерны 21, который на втором году хранения потерял вирулентность, а на третьем—жизнеспособность. Азотобактер же под маслом большей частью видоизменился.

4. Азотассимилирующая способность трех штаммов азотобактера при разных условиях хранения хорошо сохранилась.

5. Исследованные штаммы клубеньковых бактерий и азотобактера под вазелиновым маслом при 26—28°C по культурально-морфологическим свойствам видоизменились.

поэтому хранить их в этих условиях не рекомендуется. Температура 6—8°C часто неблагоприятна для клубеньковых бактерий, а *Az. nigricans* и *Az. agile* на всех средах, как под маслом, так и без масла всюду теряют жизнеспособность. Поэтому при данной температуре хранить изученные культуры нецелесообразно.

Ա. Վ. ԿԻՐԱԿՈՍՅԱՆ, Ժ. Ս. ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ, Է. Ա. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ,
Մ. Մ. ՄԿՐՏՅԱՆ

ՊԱԼԱՐԱՔԱՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԵՎ ԱԶՈՏԱՔԱՏԵՐԵՆԵՐԻ ԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ
ԵՎ ԿՈԼԵԿՑԻՈՆ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Պալարաքակտերիաների և ազոտաքակտերների տարբեր տեսակների ուսումնասիրված շտամների պահպանման պայմանները հիմնականում կախված են առանձին շտամների յուրահատկություններից: Պալարաքակտերիաների պահպանման համար լավ միջավայր է շեղոք սեահողը, իսկ ազոտաքակտերների համար՝ գորշ հողը:

Հանքային յուղի տակ պահված պալարաքակտերիաները հիմնականում պահպանել են իրենց կուլտուր-մորֆոլոգիական հատկությունները, բացի առվույտի № 21 շտամից, որը պահպանման 2-րդ տարում կորցրել է իր վիրուլենտությունը, իսկ 3-րդ տարում՝ կենսունակությունը:

Պահպանման տարբեր պայմաններում ազոտաքակտերների տարբեր տեսակների ազոտաֆիքսացիայի ունակությունը լավ է պահպանվել:

Հանքային յուղի տակ 27—28°C-ում պահված պալարաքակտերիաների և ազոտաքակտերների ուսումնասիրված շտամները իրենց կուլտուր-մորֆոլոգիական հատկություններով ձևափոխվել են, այդ պատճառով էլ պահպանումը այդ պայմաններում խորհուրդ չի տրվում: Պալարաքակտերիաների պահպանման համար 6—8° ջերմությունը որոշ դեպքերում անբարենպաստ է, իսկ *Az. nigricans*-ի և *Az. agile*-ի շտամները ջերմության արդ պայմաններում բոլոր սննդամիջավայրերի վրա հանքային յուղի տակ և առանց յուղի, կորցնում են իրենց կենսունակությունը, այդ պատճառով տվյալ ջերմաստիճանում ուսումնասիրված կուլտուրաների պահպանումը նպատակահարմար չէ:

ЛИТЕРАТУРА

- Галстян А. Ш. 1962. ДАН Арм. ССР, 35, 4.
Сборник 1967. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М., «Наука».
Надирова И. М. и Земляков В. Л. 1970. Микробиология, 39, 6.
Пумпянская Л. В. 1964. Микробиология, 33, 6.
Bonnier Charles. 1955. Bull. Inst. agron. et stat. rech., Gembloux, 23, 4.
Hartsell S. E. 1956. Applied. Microbiology, 4, 6.
Jensen H. L. 1961. Nature, 192, 4803.