

Биолог. журн. Армении, 4 (55), 2003

УДК 576.85.155

МЕТОДЫ КОНСЕРВАЦИИ КУЛЬТУР КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Փ.Տ. МАТЕВОСЯՆ, Տ.Ա. АРУТЮՆՅԱՆ, Н.М. АЛЕКСАՆՅԱՆ, Т.У. СТЕПАՆՅԱՆ

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Хранение клубеньковых бактерий в стерильной почве, под вазелиновым маслом, в гранулированной пемзе и физиологическом растворе от 8 до 20 лет обеспечивает их выживаемость с сохранением культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств, а также вирулентности и азотфиксирующей активности.

Պաշարաբակտերիաների պահպանումը ստերիլ հողում, վազելինի յուղի տակ, պեմզայի հատիկներում և ֆիզիոլոգիական լուծույթում ապահովում է նրանց կենսունակությունը, պահպանելով կուլտուրալ-մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգակենսաբանական հատկանիշները, ինչպես նաև վարակունակությունն ու ազոտֆիքսացիայի ակտիվությունը 8-20 տարի:

The storage of nodul bacteria in sterile soil, under mineral oil, in granular pемce and physiological liquid during 8-20 years guarantees their survival keeping cultural-morphological, physiological-biochemical characteristics and also virulence and nitrogen-fixing activity.

Клубеньковые бактерии - хранение - консервация культур бактерий

Известно, что клубеньковые бактерии при использовании их для нитрагинизации оказывают положительное влияние на бобовые культуры [9, 18]. При этом отпадает необходимость применения химических удобрений. Это свойство клубеньковых бактерий имеет важное значение для сельского хозяйства.

О положительном эффекте по инокуляции посевов бобовых растений в Армении пишет Петросян [11]. Из низинных и горных районов Армении были получены различные экотипы клубеньковых бактерий люцерны, эспарцета, клевера, вики, из которых 20 штаммов были апробированы во Всесоюзном институте сельскохозяйственной микробиологии, девять из них переданы производству нитрагина. Как в зоне кислых, так и нейтральных почв применение клубеньковых бактерий дает существенные прибавки - 15.2 и 21.0 % урожая зерна гороха и фасоли. На эти штаммы получены авторские свидетельства [4, 5]. Штаммы депонированы в РЦДМ НАН Армении.

До начала 70-х годов в Армении существовал небольшой завод по производству бактериальных препаратов, который в числе других выпускал и бактериальный препарат „Нитрагин“ на основе активных штаммов

клубеньковых бактерий, предоставляемых нашей лабораторией. „Нитрагин“ успешно использовался и имел большой спрос как в Армении, так и в других республиках бывшего Советского Союза.

Коллекция клубеньковых бактерий начала создаваться в лаборатории азотфиксирующих микроорганизмов Сектора микробиологии с 1943-го года доктором биологических наук А.П. Петросян и пополнялась в течение многих лет силами научных сотрудников лаборатории под руководством доктора биологических наук профессора А.Д. Налбандяна.

С начала существования Коллекции по настоящее время культуры клубеньковых бактерий поддерживаются в основном с помощью периодических пересевов на агаризованной среде бобового экстракта, соответствующей их физиологическим потребностям. Несмотря на положительные стороны - постоянная доступность культур для работы, возможность непосредственного контроля за их чистотой и состоянием - метод трудоемкий, требующий своевременного пересева. Все это привело к поискам более экономичных методов длительного сохранения микроорганизмов.

Многие авторы уделяют особое внимание хранению культур микроорганизмов, в том числе клубеньковых бактерий, методом лиофилизации и под минеральным маслом с сохранением жизнеспособности и физиологической активности [1, 3, 12, 15]. Разработан эффективный способ лиофилизации активных штаммов различных видов клубеньковых бактерий. Были получены сухие лиофилизированные препараты клубеньковых бактерий гороха, фасоли, эспарцета, люцерны и сои. Азотфиксирующая активность лиофилизированных культур находилась на том же уровне, что и у периодически пересеваемых [6]. Известно также, что в стерильной почве клубеньковые бактерии сохранялись до 30-40 лет [16].

Более простой и доступный способ хранения - это хранение клубеньковых бактерий сои и вигны в стерильной воде в течение одного года. Однако быстрорастущие штаммы клубеньковых бактерий в тех же условиях не сохраняют жизнеспособность [14]. В литературе имеются данные о высокой адаптивной способности микроорганизмов к хлористому натрию, однако данных о хранении культур клубеньковых бактерий в физиологическом растворе не имеется [13]. В работе указано, что штаммы с различной вирулентностью хорошо росли на высоком солевом фоне - до 3%, сохраняя при этом вирулентность и активность. В лаборатории азотфиксирующих микроорганизмов нами разработан метод хранения культур клубеньковых бактерий в растворах хлористого натрия [7] и в гранулах хрупкой горной породы пемзы.

В настоящей работе представлены результаты длительного хранения коллекционных культур клубеньковых бактерий различными методами.

Материал и методика. Объектом исследования служили коллекционные штаммы клубеньковых бактерий разных видов: *Rhizobium faseoli* - 3 штамма, *Rhizobium meliloti* - 6 штаммов, *Rhizobium leguminosarum* - 3 штамма (горох), *Rhizobium simplex* - 4 штамма,

Bradyrhizobium japonicum - 4 штамма, выделенные из разных почвенно - климатических зон Армении, полученных из России и Венгрии, и из растений сои, привезенных из Грузии.

Поддержание жизнеспособности коллекции этих бактерий осуществляли следующими способами.

Хранение в стерильной почве. Штаммы клубеньковых бактерий выращивали на бобовом агаре. Выросшие культуры до начала стационарной фазы вносили в различные типы стерильных почв с увлажнением, примерно 60% от полной влагоемкости почвы. Затем пробирки с зараженной почвой выдерживали в термостате при 27-28° до воздушно-сухого состояния и далее хранили при комнатной температуре.

Хранение под вазелиновым маслом. Масло предварительно стерилизовали в автоклаве при 1атм, а затем для удаления влаги прогревали в сушильном шкафу при температуре не выше 150°. Клубеньковые бактерии, выросшие на столбиках в пробирках, заливали стерильным медицинским вазелиновым маслом слоем 1-1.5 см и хранили при комнатной температуре. (Масло не является абсолютным изолятором для воздуха, поэтому культуры под ним продолжают развиваться).

Хранение клубеньковых бактерий в физиологическом растворе. Культуры выращивали на косяках бобового агара в течение 48-72 ч при 26-27°. Затем культуры смывали с агара и готовили бактериальную суспензию в растворе хлористого натрия (0.85%), которую разливали в стеклянные стерильные ампулы по 2.5мл, запаивали и хранили при 5°.

Хранение в гранулах пемзы. Измельченную (размером с семя люцерны) пемзу стерилизовали дробно в автоклаве при 132.9° 45 мин 3-4 дня. До стерилизации в течение 24 ч и каждый день после стерилизации образцы пемзы увлажняли и держали при 36° до следующей стерилизации. Таким образом происходила полная стерилизация пемзы. Пемзу инокулировали густой суспензией клубеньковых бактерий.

Выживаемость клубеньковых бактерий определяли методом последовательных разведений на агаризованных пластинках. Культурально-морфологические свойства изучали на агаризованной питательной среде бобового отвара и минеральной среде следующего состава (г/%) : сахара 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.05; K_2HPO_4 -0.05; NaCl -0.02; MgSO_4 -0.02; pH-7. Морфологию клеток изучали под световым микроскопом, физиолого - биохимические свойства определяли, используя ряд дифференциально - диагностических питательных сред [8, 17]. Усвоение различных источников углерода (29) и азота (11) изучали ауксанографическим методом [17]. Влияние продолжительности хранения на вирулентность и активность клубеньковых бактерий изучали в вегетационных и полевых опытах.

Вегетационные опыты были заложены в сосудах, со стерильным песком массой 4 кг, в трехкратной повторности. В песок вносили питательную среду Прянишникова с уменьшенной дозой азота до 25% от полной нормы, азотфиксирующую активность определяли методом Кьельдаля [11]. Вирулентность определяли по интенсивности образования клубеньков на корнях, эффективность - по воздействию клубеньковых бактерий на урожай. Уборку и учет урожая проводили в период цветения и образования плодов.

Выживаемость клубеньковых бактерий определяли через 3, 6, 12 месяцев хранения и далее каждый год. В статье приведены данные о сохранности клубеньковых бактерий в стерильной почве и под вазелиновым маслом через 1, 2, 8 лет, в физиологическом растворе - 1, 2, 20 и в гранулах пемзы - 1, 2, 18 лет.

Результаты и обсуждение. В лаборатории проведена работа по сохранению клубеньковых бактерий эспарцета, люцерны, фасоли в разных почвах: в черноземе, бурой почве, речном песке. Наблюдения за изменениями культурально - морфологических свойств клубеньковых бактерий показали, что они лучше всего сохранялись в черноземе, а в других субстратах подвергались изменениям [2]. В дальнейшем хранение культур проводилось только в черноземе. В табл. 1 приведены данные по сохранению жизнеспособных клеток клубеньковых бактерий в черноземе. После 8 лет хранения в черноземе жизнеспособность 10-ти штаммов различных видов клубеньковых бактерий была сравнительно высокая. Как видно из приведенных данных, по мере

Таблица 1. Изменение жизнеспособности клубеньковых бактерий, хранимых в разных субстратах

Культуры	Штаммы	Количество жизнеспособных клеток, млрд															
		в 1 г почвы				в 1 г биомассы под вазелиновым маслом				в 1 мл физраствора				в 1 г пемзы			
		Нач.	Через, лет			Нач.	Через, лет			Нач.	Через, лет			Нач.	Через, лет		
			1	2	8		1	2	8		1	2	8		1	2	8
<i>R. phaseoli</i>	B-5682	2.9	1.6	0.96	0.61	2.9	2.8	2.7	1.2								
	B-5696	2.8	1.5	0.9	0.49	2.8	2.7	2.6	1.1								
	B-5700	2.6	1.2	0.81	0.46	2.6	2.0	1.8	1.0								
<i>R. legumino- sarum</i> группа	B-5601	6.4	4.3	3.85	1.82	6.4	6.0	4.1	2.0	2.6	1.6	0.1	+				
	B-5603	4.5	3.1	2.2	1.1	4.5	4.5	4.45	2.4	2.47	1.35	0.88	+				
	B-5604	4.4	3.2	2.9	1.2	4.4	4.4	4.2	2.5	2.45	1.55	0.95	+				
<i>R. meliloti</i>	B-5503	4.8	2.4	2.0	0.9	4.8	4.7	4.4	2.1					5.8	3.2	2.83	0.6
	B-5515	6.9	4.37	3.3	1.26	6.9	6.8	5.6	3.0					5.25	3.1	2.7	0.51
	B-5516	4.4	2.6	1.2	0.82	4.4	4.3	4.1	2.3					4.5	3.7	3.1	1.68
	B-5518	4.0	2.2	1.0	0.81	4.0	4.0	3.5	2.0					5.1	3.0	2.7	0.5
	B-5545	5.4	3.2	2.2	1.0	5.4	5.3	4.6	2.4					6.4	2.9	2.45	0.33
	2012 из ВНР	4.3	2.5	1.1	0.82	4.3	4.4	4.0	2.1					5.3	3.1	2.75	0.52
<i>R. simplex</i>	B-5877	7.0	4.56	3.4	0.92	7.0	6.9	6.1	3.1	3.6	1.2	0.1	-				
	B-5879	6.0	3.4	2.0	0.8	6.0	5.9	5.2	2.9	3.38	1.0	0.1	-				
	B-5880	5.9	2.2	1.1	0.7	5.9	6.0	5.5	2.7	3.39	1.3	0.085	-				
	B-5881	6.1	2.6	1.2	0.8	6.1	6.0	5.4	2.8	3.4	1.0	0.07	-				
<i>B. japonicum</i>	B-5783	8.5	5.1	4.7	1.8	8.5	8.5	7.6	3.6	4.2	1.85	0.8	+				
	B-5787	7.0	3.2	1.75	0.75	7.5	7.5	6.5	3.3	3.9	1.7	0.6	+				
	B-5789	8.3	5.0	4.5	1.7	8.3	8.4	7.4	3.2	3.68	1.3	0.65	+				
	B-5805	7.2	3.0	1.6	0.6	7.2	7.2	6.1	3.0	3.7	1.1	0.4	+				

Примечание: + количество клеток не определяли, - исследования не проводились, □ - хранение не проводилось

хранения наблюдается постепенное уменьшение числа жизнеспособных клеток. У некоторых видов, например у штаммов *B. japonicum* В - 5783, В - 5789, *R. leguminosarum* 2-х штаммов В - 5601, В - 5604, *R. meliloti* В - 5515, *R. simplex* В - 5877 снижение количества клеток меньше. Важное значение имеет большое количество жизнеспособных клеток после одного года хранения. В таких случаях через 8 лет число жизнеспособных клеток остается высоким - 0.92 - 1.82 млрд кл/г почвы.

У большинства штаммов клубеньковых бактерий, хранимых под вазелиновым маслом, процент живых клеток был высоким без пересевов в течение 8 лет, за исключением клубеньковых бактерий фасоли и гороха, (шт. В-5700 и В-5601), которые требовали пересевов после второго года хранения. При высеве штаммов на соответствующие питательные среды наблюдался обильный рост культур. Титр всех штаммов был довольно высоким. После второго года хранения культуры имели такие же показатели выживаемости, как и культуры, поддерживаемые пересевами на специфической агаризованной среде. В дальнейшем хранении выживаемость клубеньковых бактерий сохранялась в течение 8 лет с постепенным уменьшением количества клеток.

Данные по характеру изменений важнейших признаков культур клубеньковых бактерий люцерны и эспарцета - выживаемость, сохранение способности к инокуляции растения-хозяина, к фиксации атмосферного азота и других физиолого-биохимических особенностей при 30-месячном хранении в 0.85%-ных и 2.0%-ных растворах хлористого натрия приведены в работе [7]. Выявлено, что клубеньковые бактерии гороха и сои могут быть поддержаны в жизнеспособном состоянии в течение 20-ти лет хранения в физиологическом растворе (0.85%-ный NaCl). Однако надо отметить, что процент выживших клеток был очень низким, но при этом не происходило изменений форм и размеров их по сравнению с исходными. К сожалению, процент выживаемости клубеньковых бактерий, сохраненных в физиологическом растворе, не устанавливался.

После хранения в течение 18-ти лет в гранулированной пемзе была проверена жизнеспособность 6-ти штаммов клубеньковых бактерий люцерны. Большинство исследованных штаммов сохранили высокое число жизнеспособных клеток - порядка 0.33-0.68 млрд кл/г пемзы.

Исследования показали, что клубеньковые бактерии, хранившиеся в разных субстратах, сохраняют способность к инокуляции растения - хозяина. В вегетационных опытах гранулированный нитрагин с пемзой спустя 18 лет сохранил свою вирулентность, оказывая благоприятное влияние на урожайность и азотфиксирующую активность люцерны. Растения, инокулированные клубеньковыми бактериями люцерны из гранулированной пемзы, имели крупные клубеньки и интенсивную зеленую окраску. Прибавка урожая (34.6 и 34.7; 21.9 и 21.6%) и содержание протеина в зеленой массе люцерны (9.8 и 10.0; 3.3 и 3.2%) находились на том же уровне, что и при инокуляции культурами бактерий, поддерживаемых пересевами на агаризованной среде

Таблица 2. Эффективность клубеньковых бактерий в симбиозе

Культуры	Штаммы	Прибавка урожая							Прибавка протеина, %						
		Зеленой массы, %				Зерна, ц/га			В зеленой массе				В зерне		
		на агариз. среде	в почве	под вазелин. маслом	в пемзе	на агариз. среде	в почве	под вазелин. маслом	на агариз. среде	в почве	под вазелин. маслом	в пемзе	на агариз. среде	в почве	под вазелин. маслом
<i>B. japonicum</i>	B-5783	46.7	45.2	46.6	-	9.0	8.9	9.1	7.7	7.5	7.6	-	8.6	8.4	8.6
	B-5787	42.8	41.2	42.6	-	5.1	5.0	5.1	6.1	6.0	6.2	-	7.6	7.5	7.6
<i>R. phaseoli</i>	B- 5696	27.3	27.0	27.2	-	7.6	7.7	7.7	2.9	2.8	3.0	-	3.1	3.0	3.0
	B-5700	30.0	29.8	30.0	-	6.0	5.9	6.0	2.5	2.4	2.6	-	2.7	2.7	2.8
<i>R. leguminosarum</i> , группа	B-5601	21.2	21.1	21.2	-	3.0	3.1	3.2	3.5	3.3	3.5	-	5.7	5.5	5.5
	B-5604	40.4	40.1	40.5	-	2.9	2.8	2.7	3.8	3.7	3.8	-	3.6	3.5	3.6
<i>R. meliloti</i>	B-5515	34.7	33.9	34.5	34.6				10.0	9.8	9.9	9.8			
	B-5516	21.6	21.5	21.7	21.9				3.2	3.0	3.2	3.3			

Примечание: - хранение не проводилось

(табл. 2).

После 8-летнего хранения клубеньковые бактерии фасоли, гороха и сои, хранившиеся в почве и под вазелиновым маслом, сохранили вирулентность и азотфиксирующую активность на том же уровне, что и периодически пересеваемые культуры. При этом урожай зеленой массы и зерна был одинаков.

Клубеньковые бактерии, хранившиеся в гранулах пемзы, в почве, под вазелиновым маслом и в растворе хлористого натрия сохраняют культурально - морфологические и физиолого-биохимические признаки без особых изменений. Колонии клубеньковых бактерий по форме, цвету, величине, структуре и консистенции не отличаются от исходных штаммов. Клетки клубеньковых бактерий не меняются в процессе хранения, но необходимо отметить, что часть клеток некоторых штаммов удлиняется, увеличивается в размере, а при пересеве на специфические среды восстанавливает первоначальные морфологические свойства.

Результаты исследований показывают, что длительное хранение клубеньковых бактерий вышеуказанными методами не влияет на их способность усваивать те или иные источники углерода и азота, то есть все штаммы *Rhizobium* хорошо усваивают арабинозу, маннозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, рамнозу. Усваивают также глицерин, маннит, лактозу, и слабо — декстрин, сорбит, раффинозу. Не усваивают сорбозу, дульцит, инулин, салицин. Из органических кислот хорошо усваивают малеиновую, янтарную, фумаровую, шавелевую, а лимонную, пировиноградную кислоты и шавелевокислый аммоний - слабее. Не усваивают сульфаниловую, стеариновую, фталевую, салициловую и бензойную кислоты. Исследованные штаммы усваивают аммонийные, нитратные, нитритные соли азота с различной интенсивностью. Все штаммы не разжижают желатин, восстанавливают нитраты, пептонизируют молоко, не растут на МПА и МПБ.

Таким образом, нами установлено, что для длительного хранения клубеньковых бактерий с сохранением их жизнеспособности, эффективности, культуральных и физиолого-биохимических свойств наиболее удобными и эффективными методами являются хранение в почве, под вазелиновым маслом и в гранулах пемзы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Загорье И.В., Князева В.Л., Шушанова А.В., Максимова Л.М. Микробиология, 50, 3, 561-565, 1981.
2. Киракосян А.В., Мелконян Ж.С., Овсепян Э.А., Мкртчян М.М. Вопросы микробиологии VI(XVI), 130-138, 1973.
3. Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Микробиология, 66, 2, 283-288, 1997.
4. Налбандян А.Дз., Аветисян В.А., Мелконян Ж.С., Матевосян Ф.С. АС №874724, 1981.
5. Налбандян А. Дз., Матевосян Ф.С., Аветисян В.А. АС №571467, 1977.

6. Налбандян А.Дз., Аветисян В.А. Биолог. журн. Армении, 41, 2, 147-149, 1988.
7. Налбандян А.Дз., Митевосян Ф.С. Биолог. журн. Армении, 41, 2, 162, 1988.
8. Определитель бактерий Берджи, 1, М., Мир, 1997.
9. Паркер К.А. "Импакт: наука и ов-во" 2, 47-58, 1987.
10. Петросян А.П. Экологические особенности клубеньковых бактерий в Армянской ССР. 1959.
11. Рубин Б.А. Большой практикум по физиологии растений. М. "Высш. школа", 1978.
12. Сборник. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М., Наука. 1967.
13. Хайлова Г.Ф., Комар Р.Р., Ларыкова Т.П., Шильникова В. К., Строганов Б.П. Изв. Тимирязевской с/х Академии 4, 91-95, 1985.
14. Crist D.K., Wyza R.E., Nills K.K. Bauer W.D., Evans W.R. Appl. and Enviren Microbiol. 47, 5, 895-900, 1984.
15. Kirsop B.E., Doyle A. Maintenanse of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London, New York : Academ. Press, 1991.
16. Jensen H.L. Nature, 192, 4803, 1961.
17. Vinsent J.M., Nutman P.S., Shiner F.A. "Identif. Meth. Microbiol." London e.a., 49-69, 1979.
18. Wodicka B. Pflansenarzt, 34, 8, 74-75, 1982.

Поступила 17.IV.2003