



Коллекция ризосферных микроорганизмов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов

Российской академии наук

Россия, 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13; <http://collection.ibppm.ru>



Стандартный протокол выделения азоспирилл

Впервые разработан Федоровой с соавт. (1985) на основе (Döbereiner and Day, 1976) и (Caceres, 1982)

Обновленная версия – Е.В. Дубровской (Октябрь 2013)

1. Методы

1.1. Отбор пробы

- Бактерии рода *Azospirillum* наиболее часто выделяются из ризосферы злаков.
- Растения выкапывают титановой лопатой, отряхивают, затем помещают вместе с оставшейся на корнях почвой в полиэтиленовые пакеты, снабженные этикетками с указанием вида растения, даты, времени и места отбора образца.

1.2. Выделение азоспирилл

- В лаборатории корни отделяют и тщательно отмывают в проточной водопроводной воде, затем переносят их в колбу объемом 1 л, содержащую 0,5 л стерильной водопроводной воды, и отмывают в ней в течение 0,5 часа при встряхивании на качалке, процедуру повторяют трижды, затем трехкратную отмывку производят аналогично в стерильной дистиллированной воде.
- Отмытые корни переносят в стерильную чашку Петри и измельчают ножницами, предварительно обработанными спиртом и обожженными в пламени спиртовки. Измельченные корни переносят в пробирки, содержащими по 6 мл полужидких селективных сред 2.1 (для большинства *Azospirillum* spp.), 2.2 (для *Azospirillum amazonense*) или 2.3 (для *Azospirillum halopreference*). Пробирки инкубируют при 30°C (для среды 2.1) или при 37°C (для сред 2.2 и 2.3) в течение 3-5 суток.
- 0,1 мл культуральной жидкости переносят в пробирки со свежей средой и инкубируют 5-7 суток.
- На полужидкой среде азоспириллы имеют характерный рост - подповерхностное кольцо. Пробирки, в которых обнаруживается характерный микроаэрофильный рост, отбирают, микробную пленку микроскопируют, при обнаружении клеток с характерным винтообразным движением производят посев на соответствующие плотные среды и инкубируют 3-5 суток.
- Изолированные колонии отсевают, проверяют чистоту.

1.3. Идентификация

- Предварительную идентификацию осуществляют иммунодиффузионным методом. Штаммы, образующие преципитационные полосы, отбирают.
- Идентификацию проводят на основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических характеристик и анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК микроорганизма.



1.4. Хранение

Осуществляется двумя методами: криоконсервацией (при -70°C) и хранением под минеральным маслом.

1.5. Криоконсервация

- Пробирку с 5 мл жидкой среды 2.1 (2.2 или 2.3) засевают петлей 18-48 ч агаровой культуры.
- Культуру выращивают при 30°C на качалке до фазы позднего экспоненциального роста.
- Микроскопируют для проверки чистоты.
- Суспензию клеток разбавляют в соотношении 1:1 свежей средой, содержащей 40% глицерина.
- Полученную суспензию разливают по стерильным пробиркам Эппендорфа объемом 0,5-1,0 мл, снабженным этикетками с указанием видового названия, лабораторного шифра штамма и даты консервации.
- Замораживают в жидком азоте.
- Хранят в морозильной камере при температуре -70°C .

1.6. Хранение под вазелиновым маслом

- Пробирку с 9 мл полужидкой среды 2.1 (2.2 или 2.3) засевают уколом петлей 18-48 ч агаровой культурой.
- Посевы культивируют при 30°C в термостате.
- Столбики с выросшей культурой заливают 1-2 мл стерильного вазелинового масла.
- Пробирки с культурами хранят в холодильнике при 4°C .

2. Среды

Физиологический раствор

Готовят 0,85% раствор NaCl и стерилизуют.

2.1. Среда для азоспирилл (Tarrand et al., 1978)

K_2HPO_4	0,25 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 г
NaCl	0,1 г
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0 мг
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0 мг
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 г
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 г
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 г
Na малат	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Дрожжевой экстракт	0,05 г
Биотин	0,1 мг
Дистиллированная вода	1,0 л
Агар-агар	0,5 или 1,5 г



Значение pH корректируют до 7,2-7,4; автоклавируют при 105°C в течение 30 мин.

2.2. Среда для *Azospirillum amazonense* (Magalhães et al., 1983)

K ₂ HPO ₄	0,2 г
KH ₂ PO ₄	0,6 г
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,02 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 г
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2,0 мг
FeCl ₃	0,01 г
Бромтимоловый синий (0,5% в 0,2N KOH)	5,0 мл
Сахароза	5,0 г
Агар-агар	0,5 или 1,5 г
Дистиллированная вода	1,0 л

Значение pH корректируют до 6,0; автоклавируют при 105°C в течение 30 мин.

2.3. Малатная среда с 0,25% NaCl (Reinhold et al., 1985)

DL-яблочная кислота	5,0 г
KOH	4,5 г
KH ₂ PO ₄	0,6 г
K ₂ HPO ₄	0,4 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 г
NaCl	2,5 г
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,02 г
MnSO ₄	0,01 г
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,002 г
Fe(III) EDTA (0.66% водный раствор)	10,0 мл
Биотин	0,1 мг
NH ₄ Cl	0,5 г
Дрожжевой экстракт	0,1 г
Агар-агар	0,5 или 1,5 г
Дистиллированная вода	1,0 л

Значение pH корректируют до 7,2; автоклавируют при 105°C в течение 30 мин.

3. Литература

Döbereiner J. and Day J. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation Vol. 2 / Eds Newton W.E., Nyman C.J. // Washington State Univ. Press, Pullman, Washington. – 1976. – P. 518-538.

Caceres E.A.R. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. // Appl. and Environm. Microbiol. – 1982. – Vol. 44, N 4. – P. 990-991.

Reinhold B., Hurek T., Fendrik J. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. // J. Bacteriology. – 1985. – Vol. 162. – P.190-195.



Magalhães F.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendaee J.R., Döbereiner J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species // An. Acad. Bras. Cienc. – 1983. – Vol. 55, N 4. – P. 417-430.

Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. // Can. J. Microbiol. – 1978. – Vol. 24, N 8. – P. 967-980.