



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 стимулирующих рост растений ризобактерий

Разработан Е.В. Дубровской, А.Ю. Муратовой и С.Н. Голубевым
(Октябрь 2013)

1. Методы

1.1. Отбор пробы

- 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 стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR)

- 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 безазотистую среду (2.1). Пробирки инкубируют при 30°C в течение 3-5 суток.
- 0,1 мл культуральной жидкости переносят в пробирки со свежей средой и инкубируют 5-7 суток.
- Производят посев разведений инокулянта на соответствующую плотную среду и инкубируют 3-5 суток.
- Изолированные колонии отсеивают, проверяют чистоту.
- Проверку способности выделенных штаммов мобилизовать фосфаты проводят на среде Муромцева (2.2). Фосфатрастворяющие микроорганизмы образуют прозрачные зоны.
- Выявление способности выделенных штаммов к синтезу фитогормона ИУК проводят фотоэлектроколориметрически методом Сальковского (Glickmann and Dessaux, 1995). Продукты ИУК образуют на среде с триптофаном (2.3) окрашенные индольные соединения.
- Способность выделенных культур стимулировать рост растений проверяют в вегетационных опытах на проростках и взрослых растениях.
- Микроорганизмы, стимулирующие рост растений, отбирают.

1.3. Идентификация

- Идентификацию проводят на основании изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических, иммунохимических 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 LB 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 LB 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. Безазотистая среда (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 Муромцева (Muromtsev, 1957)

Глюкоза	10,0 г
K ₂ SO ₄	0,2 г
MnSO ₄	0,4 г
CaCl ₂	2,2 г
Na ₃ PO ₄	3,8 г
KNO ₃	0,5 г
Аспарагин	0,1 г
Дистиллированная вода	1,0 л
Агар-агар	2,0 г

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

2.3. Среда с триптофаном

K ₂ HPO ₄	0,5 г
KNO ₃	2,0 г
NH ₄ Cl	1,0 г
Na ₂ SO ₄	2,0 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 г
Na сукцинат	1,0 г
DL-триптофан	0,4 г
FeSO ₄	следы
Раствор микроэлементов (после автоклавирования)	1,0 мл
Дистиллированная вода	1,0 л

Автоклавируют при 105°C в течение 30 мин.

Раствор микроэлементов	
H ₃ BO ₃	0,5 г
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,04 г
KI	0,1 г
FeCl ₃	0,2 г
MnSO ₄ · H ₂ O,	0,4 г
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,2 г
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,4 г
Дистиллированная или деионизованная вода	1 л

3. Литература

Glickmann E., Dessaux Y. A Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61, N 2. – P. 793-796.



Muromtsev G.S. Some methods for studying the dissolution of calcium phosphates by microorganisms // *Microbiologiya*. – 1957. – Vol. 26. – P. 172-178 (In Russian)

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.