

УДК 633.11:581.144.2

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ АССОЦИАТИВНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ КОРНЕЙ ЗЛАКОВ

М. И. ЧУМАКОВ, Л. Ю. ИВАНОВА, В. Т. ЕМЦЕВ

(Кафедра микробиологии)

Разработан метод выделения аэробных, микроаэрофильных и анаэробных ассоциативных бактерий из корней яровой пшеницы четырех сортов. Подобраны химические стерилизующие агенты и режимы обработки корней. Предлагаемый метод позволяет освободить поверхность корней от спорных и неспорных форм бактерий и выделить инфицирующие корень формы бактерий.

В последние годы получили широкое развитие исследования почвенных микроорганизмов, в частности ассоциаций diaзотрофных бактерий на корнях злаков [8, 9, 11]. Тем не менее вопрос о выделении ассоциативных бактерий остался нерешенным [1, 4, 8, 9, 11]. То же можно сказать о предварительной обработке корней при исследовании ризосферы, ризопланы и поверхностной стерилизации корней при изучении гистосферы. Выбор того или иного стерилизующего агента и режима обработки не доказывается экспериментально, поэтому полученные данные об ассоциативной микрофлоре в почве под одним и тем же видом растения трудно сравнимы.

Микросимбионтами для злаков могут быть представители 11 родов бактерий [1, 8—11], что также не учитывается при подборе режима выделения ассоциации из корней конкретного вида растений.

Нами была предпринята попытка подобрать химический стерилизующий агент и режим обработки им корней яровой пшеницы, который позволил бы полностью освободить корневую поверхность от представителей различных групп diaзотрофов.

Методика

Яровую пшеницу сортов Саратовская 29, Альбидум 43, Саратовская 52, WS 1616 выращивали до стадии 3 листьев при комнатной температуре и обычном освещении. Нитрогеназную активность почвы определяли в модифицированных нами устройствах по методу, предложенному в работе [10]. Объем сосудов 70—80 мл, навеска почвы 10—15 г, песка — 20 г.

Влажность почвы в сосудах поддерживали на уровне капиллярной, производя подпитку снизу смесью Гельригеля без азота. Повторность опытов 3—4-кратная. Для предупреждения роста синезеленых водорослей сосуды оборачивали черной бумагой.

Микробиологический анализ почвы, ризосферы и ризопланы пшеницы проводили в соответствии с принципами, предложенными в работе [10] и рекомендациями [4]. Почву для анализа брали на расстоянии большем, чем 0,5 см от корня. Зона ризосферы считали почвой, оставшуюся в виде муфточки (1—2 мм) на корнях после их встряхивания. Корни с прилипшей зем-

лей перед посевом обрабатывали на микроизмельчителе тканей при 5 тыс. об/мин в течение 10—15 мин для десорбции микроорганизмов с поверхности частичек почвы и корней.

В микровегетационных опытах исследовали микробиологическую популяцию ризопланы корней. Ризосферную почву удаляли, размачивая корни с почвой в воде. Затем в колбах с физиологическим раствором (по 100 мл) проводили 2-кратную мягкую отмывку корней ручным встряхиванием в течение 5 мин, а в дальнейшем — 2-кратную обработку корней при помощи микроизмельчителя тканей РТ-2 при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин в физиологическом растворе ($V=100$ мл). Обработанные таким образом корни делили на четыре части. Одну часть корней растирали в стерильной ступке и делали микробиологический анализ, вторую — стерилизовали с поверхности (см. ниже), дважды отмывали в физиологическом растворе, растирали стерильно в фарфоровой ступке и производили микробиологический анализ; третью

и четвертую часть корней не растирали. Нестерилизованные и стерилизованные корни проверяли на обрастание, используя следующие элективные среды: твердую среду Эшби; полужидкую оптимально дифференцированную среду и полужидкую среду предложенную в работе [2].

Количество бактерий рода *Clostridium* учитывали методом предельных разведений в двух параллельных рядах пробирок и на чашках Петри. Повторность 3-кратная.

Характерный для *Clostridium* рост определяли по изменению окраски индикаторного красителя нейтральрота с красной на флуоресцирующую желтую, интенсивному газообразованию в толще агара и характерному запаху масляной кислоты. Пересчет вели по таблицам Мак-Креди. Численность аэробных форм азотфиксаторов определяли на полужидкой среде [2] в пробирках Хангейта и Эшби в чашках Петри. Накотельные и чистые культуры бактерий выделяли из 3—5 разведений, где была выявлена положительная активность ацетиленредукции.

Азотфиксирующую активность чистых и накопительных культур определяли ацетиленовым методом [7] на средах, предложенных для анаэробных и аэробных форм азотфиксирующих бактерий [2, 3].

Стерилизацию поверхности корней проводили следующими растворами: NaOCl в концентрации 0,25—10 %, раствор получали согласно методике, предложенной в работе [5]; Ca(OCl)₂—1—4% (производство "Fluka"); хлорамина Б— 10 %; диацета; H₂O₂—12,5%; этилового спирта — 96 % при перемешивании. После стерилизации корни дважды обильно отмывали стерильной дистиллированной водой или физиологическим раствором. Обработанные корни или растирали в ступке и проводили микробиологический анализ, или целые корни раскладывали на среды, как описано выше.

Стерилизующий эффект хлорамина Б, Ca(OCl)₂, H₂SO₄ проверяли на спорах *Clostridium* и *Bacillus*.

Споры наносили на мембранный фильтр «Владипор», который помещали в специальное устройство. Через фильтр по замкнутому кругу циркулировал стерилизующий агент. После инкубации со стерилизующим агентом споры промывали в том же устройстве стерильной дистиллированной водой в проточном режиме. Затем фильтр извлекали из устройства и помещали в среды для роста *Clostridium*, описанные в работе [3], и *Bacillus* (МПА).

Результаты

Первоначально в качестве стерилизующих химических агентов были выбраны этиловый спирт, хлорамин Б, NaOCl в концентрациях, которые обычно применяются в подобных случаях. Однако эксперименты показали, что перечисленные выше вещества не гарантировали полной стерилизации поверхности корней пшеницы.

Этиловый спирт (96 %, 5 мин инкубации), хлорамин Б (1—10 %, 10—60 мин инкубации), NaOCl (0,25—1 %, 3—5 мин инкубации) не оказывали полного стерилизующего действия на чистые культуры микроаэрофильных и анаэробных азотфиксирующих бактерий.

При стерилизации поверхности корней пшеницы этими же веществами в указанных режимах она полностью не освобождалась от ассоциативных азотфиксирующих бактерий, т. е. стерилизованные, но неразрушенные кусочки корней давали микробный рост на средах 4А [3], малатной и Эшби.

По-видимому, режимом абсолютной (полной) стерилизации поверхности корней следует считать тот, при котором корень после обработки не дает микробного роста на питательных средах, но после его механического разрушения наблюдается рост. Это свидетельствует о том, что сохранились и начали расти только те бактериальные клетки, которые находились в растительной ткани и были защищены от стерилизующего агента.

Предстояло найти химический агент, который с запасом прочности действовал бы на чистую культуру бактерий, режим обработки и скорректировать последний при стерилизации поверхности корней.

Очевидно, что устойчивость и выживаемость представителей спорообразующих и неспорообразующих форм азотфиксаторов при действии химических агентов будут различными. У спорообразующих бактерий устойчивость к воздействию химических веществ определяется устойчивостью спор, поэтому для определения режима полного стерилизующего эффекта химических агентов, указанных в методической части, были взяты старые культуры *Clostridium* и споры *Bacillus*.

Как показали опыты (табл. 1), полным стерилизующим действием на споры обладал 60 % раствор H₂SO₄ (5—20 мин). Все остальные хи-

Таблица 1

Выживаемость спорообразующих бактерий при обработке поверхности корней H_2SO_4

Время обработки, мин	Концентрация H_2SO_4 , %									
	1	10	40	50	55	60	65	70	80	
Clostridium (споры)										
5	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
10	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
20	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Bacillus (споры)										
5				+	—	—	—	—	—	—
10				+	—	—	—	—	—	—
20				—	—	—	—	—	—	—

более полностью освобождает поверхность корня (табл. 2). После разрушения корня наблюдается рост бактерий различных групп азотфиксаторов. Поскольку одним из требований к режиму химической стерилизации должна быть надежность, то, видимо, при выделении ассоциативных азотфиксирующих бактерий следует использовать пороговую концентрацию $NaOCl$ 4 % при обработке 15—20 мин. Однако трудоемкость получения этого препарата в лабораторных условиях может сдерживать его применение. Поэтому нами в качестве стерилизующего агента был испытан $Ca(OCl)_2$. Опыты показали, что $Ca(OCl)_2$ обладает сходным действием с $NaOCl$ при аналогичных режимах обработки. Следует отметить, что $Ca(OCl)_2$ изготавливается в твердом виде, поэтому более стоек при хранении.

Применение для стерилизации корней H_2SO_4 в режиме, найденном для спор Clostridium и Bacillus, показало, что азотфиксирующие бактерии погибают как на поверхности корней, так и внутри него. При снижении времени обработки корней 60 % H_2SO_4 с 5 до 3 мин получены вполне удовлетворительные результаты.

Проверка предлагаемых режимов обработки корней для указанных выше химических стерилизаторов была произведена на 2—4-недельных проростках яровой пшеницы Саратовской 29, Саратовской 52, Альби-

мические стерилизаторы (хлорамия Б, $NaOCl$, этиловый спирт) в концентрациях, обычно применяемых для обработки поверхности корней, оказались недейственными для спор.

$NaOCl$ в концентрациях 4—10 % при времени обработки 15—20 мин оказывал стерилизующее действие на вегетативные клетки diaзотрофных бактерий.

Найденные режимы стерилизации бактериальных клеток были применены для обработки корней пшеницы. Эксперименты показали, что $NaOCl$ в концентрации 1 % и

Таблица 2

Выделение сахаролитических Clostridium с поверхности и из ткани корней яровой пшеницы Саратовской 29 при химической стерилизации последних

Концентрация $NaOCl$, %	Время обработки, мин	Режим обработки*		
		1	2	3
0,25	5	+	+	Не опр.
	10	+	+	» »
	20	+	+	» »
	60	+	+	» »
1	5	+	+	—
	10	+	+	—
	20	+	+	—
	60	+	+	—
4	5	Не опр.	Не опр.	—
	10	+ —	+ —	—
	20	+	+	—
	60	—	—	—
10	6	—	+ —	—
	10	—	—	—
	30	—	—	—
	60	—	—	—

* 1 — корни, гомогенизированные после мягкой отмывки, без стерилизации; 2 — корни, гомогенизированные после мягкой и жесткой отмывок и стерилизации их поверхности; 3 — обработка корней аналогична приведенной выше, корни не разрушены.

дум 43, WS 1616, выращенных в лабораторных условиях. Такой метод позволяет выделять представителей аэробной, микроаэрофильной и анаэробной групп ассоциативных азотфиксаторов, высевая бактерии на селективные среды. Способность бактерий выделяться из корней после полной стерилизации поверхности последних может служить одним из критериев их ассоциативности. Естественно, что ассоциативность должна быть подтверждена другими методами.

Таким образом, при выделении ассоциативных азотфиксирующих бактерий из корней злаков могут быть использованы 4 % водные растворы NaOCl , $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ при обработке 10—40 мин и 60 % раствор H_2SO_4 при обработке 3—5 мин с последующим отмыванием корней стерильной водой, размельчением в фарфоровой ступке и высевом на селективные среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берестецкий О.А., Васюк Л.Ф., Элисиашвили Т. А., Плющ А. В. Азотфиксирующая активность спирилл, обитающих на корнях различных растений. — Микробиол., 1985, т. 54, вып. 6, с. 1002—1007. — 2. Калининская Т. А., Редькина Т. В., Белов Ю. М. и др. Применение ацетиленового метода для количественного учета разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений. — Микробиол., 1981, т. 50, № 5, с. 924—927. — 3. Мишустин Е. Н., Емцев В. Т. Почвенные азотфиксирующие бактерии рода *Clostridium*. — М.: Наука, 1974. — 4. Рекомендации рабочей встречи УОН и МНИИР по фиксации азота в ризосфере риса (МНИИР, Лос Банос, Лагуна, Филиппины) 28 апреля — 3 мая 1984 года. — 5. Скрижаль И. Г., Малиновская Л. П., Онищенко А. Н. Метод выделения микоплазм — возбудителей желтух растений. — Микробиол. журн., 1984, № 1, с. 93—96. — 6. Valdani V. L. D., Dbbeineger J. Soil. Biol. Biochem., 1980, vol. 12, p. 433—439. — 7. Hardy R. W. F., Holstien R. D., Jackson E. K., Burus R. C. — Plant Physiol., 1968, vol. 48, N 8, p. 1185—1207. — 8. Nitrogen-fixation with con-legumes / Ed. F. A. Skinner, P. Uomala. Martinus Nijhoff Publishers, 1986. — 9. Rennie R. J. — Induced mutations as a tool for crop plant improvement. International Atomic Energy Agency Vienna, 1981, p. 293—321. — 10. Thomas-Bauzon D., Weinhard P., Pillecourt P., Balandrea J. — Can. J. Microbiol., 1982, vol. 28, p. 927—928. — 11. Vose P. V. — Can. J. Microbiol., 1983, vol. 29, p. 837—850.

Статья поступила 7 июля 1986 г.