

НЕКОТОРЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOTOBACTER*

Ковалёв А.А., студент 1 курса факультета ветеринарной медицины
и биотехнологии

Научный руководитель – Майоров П.С., кандидат биологических
наук, доцент

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: питательные среды, *Azotobacter*,
азотофиксирующие бактерии, почвенная микрофлора

*В данной работе рассмотрены некоторые питательные среды, применяемые и потенциально применимые для выделения бактерий рода *Azotobacter* из объектов окружающей среды, проведен сравнительный анализ состава этих сред.*

Введение. Ни одни исследования в области общей и частной бактериологии не обходятся без использования тех или иных жидких или плотных питательных сред. Классически, для их приготовления применяются азотсодержащие ингредиенты, такие как пептон, гидролизат рыбной муки и другие [1, 2]. Однако субстраты, содержащие в своём составе доступный бактериям азот не очень удобны, когда необходимо провести выделение из объектов окружающей среды изолятов бактерий, способных фиксировать и использовать в своём метаболизме молекулярный азот из атмосферного воздуха, например, бактерии рода *Azotobacter*. Для этих целей рекомендуется применять специальные плотные и жидкие питательные среды, имеющие оптимально подобранный состав, не включающий доступный азот. По сути своей такие субстраты являются селективными, и их применение позволяет отсеять всю неспособную к азотофиксации микрофлору [3, 4]. В связи с этим особый интерес представляет сбор и систематизация данных о средах, применимых для выделения штаммов N₂-фиксирующих бактерий с целью их.

Цель работы - сбор и систематизация о реально применяемых и потенциально применимых для выделения изолятов бактерий рода *Azotobacter* жидких и плотных питательных средах.

Результаты исследований. В современном научном мире при проведении микробиологических исследований, связанных с выделением из объектов окружающей среды, в первую очередь из почвы, штаммов азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* в основном применяется довольно ограниченное число испытанных и проверенных временем на эффективность сред. Однако существует так же целый ряд субстратов, применение которых тоже возможно, но по каким-либо причинам не пользуется популярностью среди учёных-микробиологов России и мира.

К, так сказать, «классическим», широко известным и применяемым во многих исследованиях, безазотным питательным средам можно отнести: из плотных сред: агар Эшби, а также агаровый вариант среды Барка; из жидких сред: жидкая среда Барка и безазотная среда Виноградского [3, 4, 5].

Таблица 1. Наиболее часто используемые питательные среды и их состав

Название среды	Состав питательной среды, г/л	Культивируемые бактерии
агар Эшби	Маннит 20,00, KH_2PO_4 0,200, MgSO_4 0,200, NaCl 0,200, K_2SO_4 0,100, CaCO_3 5,000, агар бактериологический 15,00	Все виды азотфиксирующих бактерий
агар Барка	MgSO_4 0,20, K_2HPO_4 0,80, KH_2PO_4 0,20, CaSO_4 0,13, FeCl_3 0,00145, Na_2MoO_4 0,000253, сахара 20,00, агар 15,00	Все виды азотфиксирующих бактерий
среда Барка	MgSO_4 0,20, K_2HPO_4 0,80, KH_2PO_4 0,20, CaSO_4 0,13, FeCl_3 0,00145, Na_2MoO_4 0,000253, сахара 20,00	Все виды азотфиксирующих бактерий
среда Виноградского	KH_2PO_4 50,00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25,00, NaCl 25,00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,00, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,00, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Все виды азотфиксирующих бактерий

Стоит отметить, что наиболее удобной для идентификации именно бактерий рода *Azotobacter* из представленных выше жидких азотосвободных питательных субстратов является жидкая среда Барка. Чем, в том числе, и объясняется её популярность среди отечественных

микробиологов. На Западе же в исследованиях несколько чаще применяется среда Виноградского. Кроме возможности идентификации азотобактера путём культивирования его в среде Барка с 3% содержанием этанола, что стимулирует цистообразование и позволяет идентифицировать бактерию методом микроскопирования, данная среда содержит источник углерода в виде сахарозы, что потенциально улучшает прирост биомассы микроорганизмов при культивировании [3, 4, 5, 8, 10].

Таблица 2. Редко используемые питательные среды и их состав

Название среды	Состав питательной среды, г/л	Культивируемые бактерии
<i>Azotobacter chroococum</i> Medium	CaCO ₃ 20,0, глюкоза 20,0, K ₂ HPO ₄ 1,0, MgSO ₄ *7H ₂ O 0,5	<i>Azotobacter chroococum</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i> Medium	Бензоат натрия 1,0, K ₂ HPO ₄ 0,5, маннит 0,5	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>Azotobacter paspali</i> Medium	Агар бактериологический 20,0, сахароза 20,0, CaCO ₃ 1,0, MgSO ₄ *7H ₂ O 0,2, K ₂ HPO ₄ 0,15, K ₂ HPO ₄ 0,05, CaCl ₂ 0,02, Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O 2,0, 50% спиртовой раствор бромтимолового синего 10 мл, 10% водный раствор FeCl ₃ 0,1 мл	<i>Azotobacter paspali</i>
ATCC Medium 12	Агар бактериологический 15, K ₂ HPO ₄ 1, MgSO ₄ *7H ₂ O 0,2, NaCl 0,2, FeSO ₄ *7H ₂ O 5, почвенный экстракт (садовая почва 0,5 г, Na ₂ CO ₃ 0,5 г, H ₂ O 200 мл) 100 мл, маннит 20	Бактерии рода <i>Azotobacter</i> и <i>Azomonas</i>
ATCC Medium 240	Агар бактериологический 15, MgSO ₄ *7H ₂ O 0,2, K ₂ HPO ₄ 0,13, K ₂ HPO ₄ 0,05, CaCl ₂ 0,02, Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O 2, FeCl ₃ 1	Все виды азотификсирующих бактерий

В целом же популярность выше обозначенных сред обязана ещё и их универсальности. N₂-фиксирующие бактерии других родов тоже могут быть выделяться в том числе при их помощи. Однако существует ряд более специфичных и менее популярных безазотных питательных сред. Среди них, например: *Azotobacter chroococum* Medium – довольно простая по составу жидкая питательная среда, применяется для выделения и специфичного культивирования бактерий вида *A. chroococum*; *Azotobacter vinelandii* Medium с этанолом – среда для

выделения и специфичного культивирования бактерий рода *A. vinelandii*; *Azotobacter paspali* Medium – плотная питательная среда для выделения и специфичного культивирования бактерий вида *A. paspali*. Кроме специфичных существуют и более универсальные, но от того не более популярные среды: ATCC Medium 12 – плотная питательная среда для выделения и культивирования бактерий рода *Azotobacter* и *Azomonas*; ATCC Medium 240 – простая по составу плотная питательная среда, предназначенная в основном для азотобактера, но позволяет культивировать азотофиксирующие бактерии и других родов [6].

Стоит отметить, что выделение бактерий с использованием каких-либо из обозначенных в данной статье питательных субстратов может проводиться любым из описанных в методической литературе способом. Будь то почвенная суспензия, диффузия почвенных комочков или почвенная паста [4, 7, 8, 9].

Выводы. По результатам анализа и систематизации данных можно сделать вывод о том, что помимо повсеместно применяемых сред для выделения и культивирования бактерий рода *Azotobacter* существует ряд субстратов, применяемых значительно реже. Это можно объяснить наличием в некоторых из них селективных компонентов таких, как бензоат натрия в *Azotobacter vinelandii* Medium, а также изменением соотношения компонентов по сравнению с популярными средами, что так же добавляет специфичность средам. В связи с этим видится интересной и логически обоснованной практическая опробация их применения в будущем.

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии : учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. – Ульяновск : Академия ветеринарных наук Поволжское региональное отделение Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии Научно-методический центр пищевых инфекций, 1998. – 150 с.

2. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии : учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев. – Ульяновск : Кафедра

микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2021. – 129 с.

3. Patil Satish Azotobacter / Satish Patil // Beneficial Microbes in Agro-Ecology / Satish Patil, Bhavana Mohite, Chandrashekhar Patil [и др.]. – USA : Academic Press, 2020. – Ch. 19. – С. 397-426. – ISBN 9780128234143

4. Aquilanti, L. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of Azotobacter from soil samples / L. Aquilanti, F. Favilli, F. Clementi // Soil Biology & Biochemistry. – 2004. – № 36. – С. 1475-14783.

5. Петенко, А.И. Изучение и подбор режима культивирования культуры *Azotobacter chroococcum* на ферментационном комплексе ока мф — 100 / А.И. Петенко, А.Н. Гнеуш, В.И. Дмитриев // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 94. – С. 1-11.

6. Atlas, R.M. Handbook of microbiological media / R.M. Atlas. – Washington, D.C. : ASM Press, 2010. – 2040 с. – ISBN 978-1-4398-0406-3.

7. Пульчеровская, Л.П. Санитарная микробиология : учебное пособие / Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. – Ульяновск : Министерство сельского хозяйства Российской Федерации ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2019. – 98 с.

8. Пульчеровская, Л.П. Сельскохозяйственная микробиология. Лабораторный практикум : учебное пособие / Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев. – Ульяновск : Министерство сельского хозяйства Российской Федерации ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА м. П.А. Столыпина», 2015. – 69 с.

9. Пульчеровская, Л.П. Сельскохозяйственная микробиология : учебное пособие / Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. – Часть I. – Ульяновск : Министерство сельского хозяйства Российской Федерации ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА м. П.А. Столыпина», 2016. – 161 с.

10. P.S. Maiorov Selection of the most prospective strains for inclusion in the composition of a biopreparation on the basis of cellulose-destroying microorganisms / Maiorov P.S., Lyashenko E.A., Feoktistova N.A. et al. // Science II International scientific and practical conference. Том 1229. Bristol, BS2 OGR, United Kingdom, 2023. P. 12031

SOME NUTRIENT MEDIUM FOR ISOLATION OF *AZOTOBACTER* BACTERIA

Kovalev A.A.

**Scientific supervisor – P.S. Maiorov,
Ulyanovsk SAU**

Keywords: *nutrient media, Azotobacter, nitrogen-fixing bacteria*

In the article, some nutrient media used and potentially applicable for the isolation of bacteria of the genus Azotobacter from environmental objects are considered, and a comparative analysis of the composition of these media is carried out.