

**ІНТЕНСИВНІСТЬ УТВОРЕННЯ ПІГМЕНТІВ
БАКТЕРІЯМИ РОДІВ *AZOTOBACTER*, *AZOSPIRILLUM*,
PSEUDOMONAS ЗАЛЕЖНО ВІД ЯКОСТІ
ВИКОРИСТАНОГО АГАР-АГАРУ**

Ковалевська Т.М., Горбань В.П., Романова І.М.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: kovalevskaTM@mail.ru

*Виявлено, що утворення пігментів досліджуваними штамми бактерій родів *Azotobacter*, *Azospirillum* та *Pseudomonas* залежить від якості агар-агару, використаного для приготування живильного середовища. Втрата цієї властивості бактеріями при культивуванні на середовищах з різними видами агару може ускладнити їх ідентифікацію.*

Ключові слова: *бактерії, живильне середовище, агар-агар, пігменти.*

Протягом останніх 10 років у Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН велика увага приділяється формуванню колекції культур корисних ґрунтових мікроорганізмів. Колекція заснована в 1998 році на матеріалі, зібраному в регіонах України і включає штамми, які виділені з ґрунту, органів рослин та інших природних джерел. На сьогодні в колекційних фондах підтримується 620 культур бактерій та грибів. У 2002 році постановою Кабінету Міністрів України колекція внесена до державного реєстру наукових об'єктів, що становлять національне надбання України.

Варто зазначити, що фонди колекції сформувались на основі колекцій культур мікроорганізмів, які зберігали в лабораторіях інституту та відображали їхні інтереси і напрями наукової діяльності. Так, у результаті багаторічних досліджень в галузі біологічної азотфіксації створена одна з найбільших у країні колекція симбіотичних та асоціативних азотфіксувальних бактерій. Колекція також має широкий спектр штамів ентомопатогенних бактерій, штамів – продуцентів біологічно активних речовин.

Зважаючи на велику різноманітність мікроорганізмів, для їх гарантованого тривалого зберігання застосовуються різні методи: субкультивування, підтримка під мінеральним маслом,

ліофілізація. Одним із основних є метод періодичних пересівів. Перевагою цього методу є зручний візуальний контроль за чистотою культури та її морфологічною мінливістю, а також постійний доступ культур для наукових досліджень. Разом із тим, відомо, що за частих пересівів мікроорганізми можуть змінювати та втрачати деякі властивості. Так, у процесі субкультивування пігментних бактерій нами було виявлено, що від якості агар-агару, який використовувався для приготування живильних середовищ, залежала їх пігментсинтезувальна здатність.

Слід зазначити, що пігментація колоній у сукупності з іншими фізіологічними властивостями використовується як важлива додаткова ознака при ідентифікації бактерій [1]. Водночас, за літературними даними, якісний і кількісний склад пігментів мікроорганізмів може суттєво змінюватися залежно від компонентів середовища та умов культивування [2, 3]. Тому, метою цієї роботи було дослідити вплив різних видів агар-агару на пігментутворювальну здатність штамів бактерій, що належать до родів *Azotobacter*, *Azospirillum* та *Pseudomonas*.

Матеріали і методи. У роботі використовували пігментні бактерії роду *Azotobacter*: *Azotobacter chroococcum* шт. С-16, М-70, 10; *Azotobacter vinelandii* шт. 10702, 208 (VKM В-1617, типовий штам); *Pseudomonas fluorescens* шт. П-10, 211, В-149 (UCM В-17, типовий штам), *Pseudomonas sp.* шт. 1070 та *Azospirillum brasilense* шт. 18-2, R- і S- форми цього штаму.

Культури вирощували на живильних середовищах такого складу: бактерії роду *Azotobacter* на середовищі Ешбі (г/л: K_2HPO_4 – 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, $CaCO_3$ – 5,0, сахароза – 20,0, агар-агар – 15,0, вода водопровідна – 1 л, рН до стерилізації – 7,2.); бактерії роду *Pseudomonas* на середовищі Іцука-Комагата:(г/л: амоній молочнокислий – 2,5, гліцерин – 10,0, глутамат натрію – 5,0, K_2HPO_4 – 1,0, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,05, KCl – 0,1, агар-агар – 15,0, вода дистильована – 1 л, рН до стерилізації – 7,0); бактерії роду *Azospirillum* на картопляному агарі з яблучною кислотою (г/л: картопля – 200,0, яблучна кислота – 2,5, цукроза – 2,5, КОН – 2,0, агар-агар – 15,0, вода водопровідна – 1 л, рН до стерилізації – 6,8).

У досліді використовували чотири види агар-агару: № 1 – агар-агар D19 виробництва Іспанії, № 2 – агар-агар В-2 виробництва Італії, № 3 – агар мікробіологічний виробництва Росії (ГОСТ

17206-84), № 4 – агар мікробіологічний виробництва України (ГОСТ 17206-84), № 5 – пластинчатий агар-агар виробництва Росії (ГОСТ 16280-88). Приготовлене середовище розділяли на 5 частин, у кожному з них додавали відповідний агар-агар та перевіряли рН середовища.

Культури висівали суцільним газоном у чашках Петрі та штрихом на скоси агару в пробірках, інкубували в термостаті при оптимальних для них температурах протягом 10 діб. Залежно від виду для посіву використовували 1 або 3-х добову пігментовану культуру бактерій. Активність росту бактерій оцінювали за 4-бальною шкалою та визначали наявність пігменту візуально, порівнюючи інтенсивність забарвлення середовища і колоній мікроорганізмів. Для перевірки здатності безпігментних форм бактерій відновлювати синтез пігментів, їх повторно пересівали на середовище такого ж складу але з іншими видами агар-агару. Кожен дослід повторювали тричі.

Результати та їх обговорення. При періодичних пересівах як музейних, так і лабораторних штамів пігментних бактерій ми звернули увагу, що інтенсивність утворення пігментів залежить від якості використаного агар-агару. Тому було проведено порівняльне вивчення пігментсинтезувальної здатності бактерій різних родів при їх культивуванні на живильних середовищах з 5 видами агару.

Встановлено, що на всіх середовищах, незалежно від використаного агару досліджувані штами бактерій, що відносяться до роду *Pseudomonas*, добре ростуть та утворюють типові за морфологією колонії. Водночас, як видно з даних, наведених у табл. 1, лише на середовищах із двома видами агару (№ 2 та № 3) флуоресцентні псевдомонади утворювали яскравий жовто-зелений пігмент. При використанні агару № 1 колонії бактерій та середовище були забарвлені в коричневий або світло-жовтий колір, що може свідчити про зміну в складі утворюваних пігментів. На живильних середовищах з агарами № 4 та № 5 спостерігали інтенсивний ріст бактерій, однак без утворення пігменту. Варто зазначити, що при повторному пересіві культур із безпігментних колоній, що виростили на агарі № 4 на середовище з агаром № 2 здатність бактерій продукувати пігменти повністю відновлювалась. Реакція всіх чотирьох штамів псевдомонад на якість агару була майже однаковою.

Таблиця 1. Вплив різних видів агар-агару на пігментоутворення бактерій роду *Pseudomonas*

Вид агар-агару	Утворення пігменту			
	<i>P. fluorescens</i> шт. 211	<i>P. fluorescens</i> шт. П-10	<i>P. fluorescens</i> шт. В-149	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> шт. 1070
№ 1	+	+	+	+
	(коричневий)	(світло-жовтий)	(світло-жовтий)	(світло-жовтий)
№ 2	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)
№ 3	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)
№ 4	–	–	–	–
№ 5	–	–	–	–

Примітка: пігментоутворення: ++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабке, – – відсутнє.

Цікаві результати отримані нами при порівняльному аналізі пігментсинтезуючої здатності бактерій роду *Azotobacter* (табл. 2). Усі досліджувані штами, незалежно від виду агар-агару, інтенсивно росли на середовищі Ешбі, однак суттєво розрізнялись інтенсивністю утворення пігменту (рис. 1). Так, штами *A. chroococcum* С-16, М-70 формували пігментовані темні колонії на середовищах із більшістю досліджуваних агарів, тоді як штамп 10 – лише на пластинчатому агарі. Водночас, штами *Azotobacter vinelandii* 10702 та 208 інтенсивно утворювали пігмент на середовищах з агарами № 2-№ 4 і зовсім втрачали цю здатність на агарі № 5. Як і в досліді з псевдомонадами, при повторному пересіві культур азотобактера, що втратили пігмент, на середовище з іншим (стимулюючим пігментоутворення) агаром, вони відновлювали здатність до синтезу пігменту. І навпаки, бактерії, узяті із забарвлених колоній і перенесені на середовище з агаром, що пригнічує пігментоутворення, формували безбарвні колонії.

Суттєво розрізнялись між собою за реакцією на якість агар-агару морфологічні *R*- і *S*- варіанти штаму *Azospirillum brasilense* 18-2 (табл. 3). Якщо вихідна культура та *R*-форма інтенсивно утворювали пігмент на середовищах з трьома видами агару, то бактерії *S*- форми формували лише окремі світло-рожеві колонії на агарі № 1 та № 5 і безбарвні на агарі № 4.

Таблиця 2. Вплив різних видів агар-агару на пігментоутворення бактерій роду *Azotobacter*

Вид агар-агару	Утворення пігменту				
	<i>A. chroosocum</i> шт. С-16	<i>A. chroosocum</i> шт. М-70	<i>A. chroosocum</i> шт. 10	<i>A. vinelandii</i> шт. 10702	<i>A. vinelandii</i> шт. 208
№ 1	+ (світло-коричневий)	+ (світло-коричневий)	–	+ (світло-жовтий)	+ (світло-жовтий)
№ 2	+ (світло-коричневий)	+++ (чорний)	–	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)
№ 3	+ (світло-коричневий)	++ (коричневий)	–	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)
№ 4	+ (світло-коричневий)	++ (коричневий)	–	++ (жовто-зелений)	++ (жовто-зелений)
№ 5	++++ (чорний)	++++ (чорний)	+ (світло-коричневий)	–	–

Примітка: пігментоутворення: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабе, – – відсутнє.



*Рис. 1. Утворення пігменту *Azotobacter chroosocum* шт. С-16 на середовищі Ешбі з агаром № 1 та № 5*

№1 №5

Таблиця 3. Вплив різних видів агар-агару на пігментоутворення штаму *Azospirillum brasilense* 18-2 та його R- і S- форм

Вид агар-агару	Утворення пігменту		
	вихідна культура <i>A. brasilense</i> шт. 18-2	R-форма <i>A. brasilense</i> шт. 18-2	S-форма <i>A. brasilense</i> шт. 18-2
№ 1	++++ (рожевий)	++++ (рожевий)	+ (окремі колонії світло-рожеві)
№ 4	++ (світло-рожевий)	++ (світло-рожевий)	–
№ 5	++ (світло-рожевий)	++ (світло-рожевий)	+ (окремі колонії світло-рожеві)

Примітка: пігментоутворення: +++++ – інтенсивне, +++ – добре, ++ – помірне, + – слабе, – – відсутнє.

Варто зазначити, що реакція бактерій на якість агар-агару в деякій мірі залежала і від хімічної природи пігменту, що ними синтезується. Так, представники роду *Pseudomonas* та *Azotobacter*, які утворювали флуоресцентні, жовто-зелені пігменти на середовищах з агарами № 2 та № 3, втрачали пігментацію на агарі № 5. Тоді як бактерії виду *A. chroococcum*, на середовищі саме з цим агаром (№ 5) найінтенсивніше синтезували темні пігменти меланінової групи.

Таким чином, результати наших досліджень засвідчують, що наявність пігменту і інтенсивність його утворення у досліджуваних штамів бактерій залежить від якості агару-агару, який застосовують для приготування середовищ. Забарвлення колоній та середовища не є стабільною ознакою і висновок щодо здатності бактерій до синтезу пігментів необхідно робити обережно, лише після ретельного вивчення мікроорганізму за різних умов культивування. Недостатня увага до складу компонентів середовища та їх якості може призвести до одержання невірних результатів, що істотно ускладнить ідентифікацію бактерій.

1. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* /В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова. – К.: Наук. думка, 1990. – 262 с.

2. Колесникова И.Г. Образование пигментов бактериями из рода *Pseudomonas* в зависимости от соотношения компонентов среды /Колесникова И.Г., Сергеева Л.Н., Бехтерева М.Н., Хохлова Ю.М. //Микробиол. – 1971. – Т. XL, Вып. 3. – С. 485-489.

3. Israel Nur Carotenoid composition and function in nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum* /Israel Nur, Yuval L. Steinitz, Yaacov Okon, Yigal Henis //J. of gen. Microbiol. – 1981. – Vol. 122. – P. 27-32.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ПИГМЕНТОВ БАКТЕРИЯМИ РОДОВ *AZOTOBACTER*, *AZOSPIRILLUM*, *PSEUDOMONAS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КАЧЕСТВА АГАР-АГАРА

Ковалевская Т.М., Горбань В.П., Романова И.Н.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
г. Чернигов

*Установлено, что образование пигментов исследуемыми штаммами бактерий родов *Azotobacter*, *Azospirillum* и *Pseudomonas* зависит от качества агар-агара, применяемого для приготовления питательных сред. Потеря бактериями этого свойства при культивировании на средах с разными видами агара может усложнять их идентификацию.*

Ключевые слова: *бактерии, питательная среда, агар-агар, пигменты.*

INTENSITY OF PIGMENTS FORMATION OF BACTERIA OF GENERA *AZOTOBACTER*, *AZOSPIRILLUM*, *PSEUDOMONAS* DEPENDING ON THE QUALITY OF AGAR-AGAR

Kovalevska T.M., Gorban V.P., Romanova I.N.

Institute of Agriculture Microbiology UAAS, Chernihiv

*It is established, that the pigments formation of studied bacteria strains of genera *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Pseudomonas* depends on the agar-agar quality used for preparation of nutrient mediums. Loss of this property by bacteria at growth on medium with different kinds of agar can complicate their identification.*

Key words: *bacteria, nutrient medium, agar-agar, pigments.*