

А. Д. МАСИРБАЕВА, Ж. А. БАЙДЫЛЬДАЕВА, А. К. САДАНОВ,  
Ж. А. БАЙГОНУСОВА, Г. Д. УЛТАНБЕКОВА

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,  
РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан)

## ИЗУЧЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ И КОНКУРЕНТНОЙ СПОСОБНОСТИ КЛУБЕНКОВЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHIZOBIUM*

**Аннотация.** Изучена азотфиксирующая активность и конкурентная способность 3 штаммов клубеньковых бактерий гороха рода *Rhizobium*. По изученным производственно-ценным показателям проведена селекция штаммов и отобраны варианты клубеньковых бактерий с уровнем нитрогеназной активности и конкурентной способности: *Rhizobium leguminosarum* штаммы ОТ, *Rhizobium leguminosarum* ГК, *Rhizobium leguminosarum* К-Г. Уровень нитрогеназной активности у отобранных штаммов варьирует от – 6,7 до 12,9 нмоль  $C_2H_4$ /час, конкурентная способность составляет 13,0–32,5%.

**Ключевые слова:** *Rhizobium leguminosarum*, фиксация, хроматография, штамм.

**Тірек сөздер:** *Rhizobium leguminosarum*, фиксация, хроматография, штамм.

**Keyword:** *Rhizobium leguminosarum*, fixation, chromatography, strain.

В Республике Казахстан отмечается повсеместное снижение плодородия почв из-за недостаточного применения органических и минеральных удобрений, в первую очередь, азотных, а также нарушение севооборотов вследствие преобладания посевов зерновых колосовых культур. По данным казахстанских почвоведов, 60% всей территории почвенного покрова Казахстана подвержено деградации. За последние 20-40 лет потери гумуса – основы плодородия почв составили 8-30%, в том числе наиболее ценных гуминовых кислот и гидролизуемого азота – 45 и 48%, соответственно. Процессы деградации почв усиливаются на фоне опустынивания, вторичного засоления, процессов ветровой и водной эрозии почв, ухудшения в целом экологической ситуации в республике. Сложившаяся опасная тенденция требует неотложных мер по восстановлению плодородия почв [1].

Одним из радикальных путей восстановления плодородия почв является введение в севооборот кормовых и пищевых бобовых культур. Положительные эффекты бобовых растений могут быть усилены за счет использования микробных препаратов, состоящих из эффективных штаммов клубеньковых бактерий, которые, фиксируя азот атмосферы, обогащают почву легкодоступным для растений биологическим азотом. Это позволяет повысить содержание белка в кормах и продуктах питания, защитить окружающую среду от химических загрязнений, сэкономить энергоресурсы и дорогостоящие минеральные азотные удобрения.

Бобовые растения обладают уникальной способностью вступать в симбиоз со специфическими для каждого вида растений клубеньковыми бактериями, образовывать азотфиксирующие клубеньки и усваивать за вегетацию до 125-480 кг/га азота воздуха. Это обеспечивает высокие урожаи дешевого растительного белка без применения дорогостоящих и экологически небезопасных минеральных азотных удобрений. С пожнивно-корневыми остатками многолетних бобовых трав в почве остается в среднем около 50% фиксированного из воздуха азота, который на 2-3 года существенно повышает плодородие почвы и урожай последующих культур [2].

Азот имеет первостепенное значение в жизни растений, как и всего органического мира, являясь составной частью белков и нуклеиновых кислот. В среде, окружающей растение, азот находится, в основном, в двух формах: в виде газообразного азота атмосферы ( $N_2$ ), который составляет 80% воздуха (по объему) и не усваивается большинством растений, и в виде различных органических и неорганических соединений азота. Молекулярный азот атмосферы химически очень инертен, и критическим шагом в его использовании растениями является его превращение в нитраты и нитриты, или аммоний. Такая фиксация азота осуществляется микроорганизмами, которые обладают ферментами, необходимыми для восстановления атома азота до аммония, в сравнительно мягких условиях, характерных для живой клетки. В таких неорганических формах

атом азота может быть поглощен корнями растений. Азотфиксирующие системы можно разделить на две категории: свободноживущие организмы и симбиотические ассоциации между свободноживущими организмами и высшими растениями. Наиболее продуктивным с сельскохозяйственной точки зрения является симбиоз клубеньковых бактерий рода ризобиум (*Rhizobium*) с бобовыми растениями, в частности, с люцерной и соей. Оба компонента симбиотической системы, хотя и дистанционно, но без промежуточных стадий, прямо снабжают друг друга материалами и энергией в формах, необходимых для каждого из них, и, в целом, составляют единую систему углеродного и азотного питания растений. Бактерии получают от бобовых растений, образованные ими в процессе фотосинтеза углеводы и другие соединения, и, в свою очередь, снабжают растение азотом, фиксированным бактериями из воздуха [3-5].

Основными критериями первоначального отбора штаммов клубеньковых бактерий, как известно, являются качественные проявления способностей ризобий к симбиозу с растением-хозяином, выражающиеся в нодулирующей способности и азотфиксирующей активности [3]. В настоящее время установлено, что определяющими признаками эффективного симбиоза являются количественные признаки, как наиболее значимые: конкурентная способность – способность изучаемого штамма ризобий формировать клубеньки на корнях растения-хозяина в присутствии других штаммов клубеньковых бактерий; симбиотическая эффективность – способность создавать эффективный симбиоз и повышать продуктивность бобовых культур [4]. Наличие всех этих признаков у выделенных штаммов клубеньковых бактерий является основанием для отбора с целью разработки биопрепаратов на их основе.

### Материалы и методы исследования

Объектами исследований являлись клубеньковые бактерии гороха: *Rhizobium leguminosarum* штаммы ОТ, ГК, К-Г.

Штаммы клубеньковых бактерий инкубировали на агаровой среде Мазэ в течение 24 часов при температуре 28°C.

Азотфиксирующую (нитрогеназную) активность штаммов клубеньковых бактерий изучали ацетиленовым методом [6]. Клубеньковые бактерии выращивали на агаровой среде следующего состава, (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3; сахароза – 2,0; бобовый отвар – 50,0; рН 7,0. Микроорганизмы выращивали в закрытых ватными пробками флаконах. Для инициации роста добавляли минимальное количество источника связанного азота (0,0001–0,005% дрожжевого экстракта). В конце инкубационного периода ватную пробку заменяли стерильной пенициллиновой пробкой. Газообразный ацетилен собирали в вытяжном шкафу следующим образом. В пробирку, наполовину заполненную 15 мл воды, добавляли небольшое количество (около 1 г) карбида кальция. Пробирку закрывали пробкой с отверстием, через которое она с помощью резиновой трубки соединялась с химическим стаканом с водой. Ацетилен вводили в сосуд с культурой через резиновую пробку до концентрации 10% (по объему). Через различные промежутки времени инкубации отбирали пробы газа по 1 мл из сосуда с культурой и проверяли наличие этилена методом газовой хроматографии. Азотфиксирующую активность определяли по восстановлению ацетилена в этилен методом газовой хроматографии на хроматографе марки «Хром-3» на колонке с силикагелем АСК при температуре 50°C. Величину нитрогеназной активности выражали в нмоль  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{ч}$  / 1 млн. клеток клубеньковых бактерий.

Конкурентоспособность клубеньковых бактерий определяли методом генетического маркирования [6]. Исследуемые штаммы ризобий культивировали на минерально-растительной среде (МРС) с возрастающими (от 20 до 1000 ед/мл) дозами антибиотика (стрептомицина или канамицина). Полученные резистентные варианты использовали для проведения вегетационных исследований. На каждый вариант вегетационного опыта сеяли по 100 штук семян. Для исследования использовали сорт гороха «Аксайский усатый-55». Перед инокуляцией семена стерилизовали смесью этанола и перекиси водорода (1:1) и промывали трехкратно стерильной водой. Клубеньки, взятые с корней бобовых растений, в возрасте не менее 5 недель, стерилизовали и помещали в стерильную чашку Петри с водой. В стерильные чашки Петри предварительно разливали среду МРС (минерально-растительная среда) без антибиотика и, отдельно, такую же среду, но с 1000 ед.

стрептомицина на мл среды. Состав среды МРС, (г/л):  $K_2HPO_4$  - 0,5;  $KH_2PO_4$  - 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,1;  $CaSO_4$  - 0,1;  $NaCl$  - 0,2;  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  - следы; маннит или глюкоза - 20,0; соевая мука - 10,0; рН 6,8-7,0. На 2 чашки Петри со стрептомицином (1000 ед/мл) и 1 чашку без антибиотика (контроль) стерильно пинцетом размещали клубеньки и раздавливали, делая поверхностный мазок. Предварительно под чашки Петри подкладывали расчерченные шаблоны на 25 гнезд. Итого на одной чашке анализировали 25 клубеньков. Инкубирование исследуемых чашек проводили в течение 7-10 дней. С одного варианта анализировали по 50 клубеньков. После этого подсчитывали количество клубеньков, давших рост клубеньковых бактерий на обычной среде и среде со стрептомицином. Результаты рассчитывали по следующей формуле:  $KC\% = N_{str}^f \cdot 100 / N_0$ . Величину конкурентной способности выражали в процентах.

### Результаты исследований

Изучена азотфиксирующая активность и конкурентоспособность 3 штамма клубеньковых бактерий гороха *Rhizobium leguminosarum* ОТ, ГК, К-Г. Полученные данные приведены в таблице. В таблице приведены данные по наиболее эффективным штаммам клубеньковых бактерий гороха.

Таблица 1 – Нитрогеназная активность и конкурентоспособность клубеньковых бактерий гороха

Штаммы Клубеньковых бактерий	Нитрогеназная активность, нмоль $C_2H_4/ч$ / 1 млн. клеток клубеньковых бактерий	Конкурентоспособность, %
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (горох)		
ОТ	6,7 ± 0,22	13,0 ± 0,21
ГК	12,9 ± 0,21	32,5 ± 0,22
К-Г	8,5 ± 0,10	24,0 ± 0,15

Уровень нитрогеназной активностисоставлял для *Rhizobium leguminosarum* К-Г – 8,5 ± 0,10, ГК - 12,9 ± 0,21, ОТ - 6,7 ± 0,22 нмоль  $C_2H_4/ч$ .

Установлено, что наиболее высокой нитрогеназной активностью обладали штаммы клубеньковых бактерий гороха: *Rhizobium leguminosarum* – ГК.

При изучении конкурентной способности клубеньковых бактерий гороха выявлен вариант, обладающий наиболее высокой конкурентной способностью: *Rhizobium leguminosarum* ГК (клубеньковые бактерии гороха) – 32,5 ± 0,22.

Таким образом, самыми высокими показателями азотфиксирующей активности и конкурентоспособности одновременно обладают: коллекционный штамм *Rhizobium leguminosarum* ГК (клубеньковые бактерии гороха).

По уровню нитрогеназной активности и конкурентной способности эти штаммы наиболее перспективны для разработки новых биопрепаратов с целью повышения продуктивности гороха. Поэтому для дальнейшего исследования по подбору оптимальных условий накопления биомассы на жидких средах, рекомендуемых для их роста, будут использоваться отселекционированные нами штаммы клубеньковых бактерий гороха (*Rhizobium leguminosarum* ОТ, ГК, К-Г).

### ЛИТЕРАТУРА

1 Чмиль Т.И., Чуркина Г.Н. Азотфиксирующая активность бобовых растений-источник восполнения азота почвы // Состояние и перспективы развития почвоведения. – Алматы, 2005. – С. 106-107.

2 Вишнякова М.А. Коллекция зерновых бобовых культур ВИР как источник исходного материала для актуальных и перспективных направлений селекции // Селекція і насінництво. Міжвідомчийте магичний науковий збірник. – Харків, 2005. – С. 75-83.

3 Толкачев Н.З., Дидович С.В. Хранение и переработка зерна // Журнал «Южный филиал Института сельскохозяйственной микробиологии УААН». – 2003. – 3 с.

4 Васильева Г.Г., Миронова Н.В., Глянько А.К., Шепотько Л.Н. Генерация супероксидных радикалов в проростках гороха при инокуляции азотфиксирующими бактериями разной совместимости // С.-х. биология. – 2001. – № 3. – С. 79-83.

5 Кретович В.Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями. – М.: Наука, 1994. – 168 с.

6 Методические рекомендации. Способы, приемы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции // Российская Академия сельскохозяйственных наук. Всерос. науч.-исслед. инст. сои. – Благовещенск, 2005. – С. 34-35.

#### REFERENCES

- 1 Chmel <sup>ti</sup>, Churkin G.N. Azotfiksirushaya activity of leguminous plants-nitrogen soil replenishment /source/ status and prospects of soil science. Almaty, 2005. P. 106-107.
- 2 Vishnyakova M.A. Collection of grain legumes WRI as a source of raw material for actual and prospective areas of selection. Selekcija i nasinnictvo. Mizvidomcijte maticenij naukovij zbirnik. Kharkov, 2005. S. 75-83.
- 3 Tolkachev N.Z., Didovich S.V. Grain storage and processing. Journal of the southern branch of the Institute of agricultural microbiology. 2003. 3 с.
- 4 Vasileva G.G., Mironova N.V., Glan'ko A.K., Shepot'ko L.N. Generate superoxide radicals in pea sprouts with n-fixing bacteria inoculation with different compatibility. С.-h. biology. 2001. N 3. P. 79-83.
- 5 Kretovich V.L. Biochemistry of nitrogen absorption air plants. М.: Nauka, 1994. 168 p.
- 6 Metodisheskie recommendations. Methods, techniques and the selection of effective strains of nodulating bacteria. Analytical methods of selection. Russian Academy of agricultural sciences. All. researcher-issled. inst. soy. Blagoveschensk, 2005. S. 34-35.

#### Резюме

А. Д. Масырбаева, Ж. А. Байділдаева, А. К. Саданов, Ж. А. Байғонусова, Г. Д. Ұлтанбекова

(Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан, Микробиология және вирусология институты, Алматы, Қазақстан)

#### ТҮЙНЕКТІ БАКТЕРИЯЛАР *RHIZOBIUM* ТУЫСЫНЫҢ АЗОТФИКСАЦИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЖӘНЕ БӘСЕКЕЛЕСТІК ҚАБІЛЕТТІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Түйнекті бактериялардың бұршақтың *Rhizobium* туысының 3 штаммы зерттелді. Бәсекелестік қабілеттілігі және нитрогеназды белсенділігін түйнекті бактериялардың өндірістік құнды көрсеткіші бойынша зерттелген түйнекті бактериялардың штамдары іріктелді: *Rhizobium leguminosarum* штаммы ОТ, *Rhizobium leguminosarum* ГК, *Rhizobium leguminosarum* К-Г. Іріктелген штамдардың нитрогеназды белсенділігі 6,7-ден 12,9 нмоль дейін  $C_2H_4$ /сағ, бәсекелестік қабілеттілігі 13,0-32,5% көрсетті.

**Кілт сөздер:** *Rhizobium leguminosarum*, фиксация, хроматография, штамм.

#### Summary

A. D. Masirbaeva, J. A. Bajdyldaeva, A. K. Sadanov, J. A. Bajgonusova, G. D. Ultanbekova

(Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,  
Institute of Microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan)

#### STUDY OF AZOTFIKSIRUJUSHCHEJ ACTIVITY AND THE COMPETITIVE ABILITY OF KLUBENKOVYH BACTERIA GENERA *RHIZOBIUM*

Studied azotfiksirushaya activity and the competitive ability of 3 stammovkluben'kovyh peas roda *Rhizobium* bacteria. The studied production and cennympokazatel'm a selection of strains and selected options of nodulating bacteria with nirogenaznoj activity and level of competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains: of *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium leguminosarum* GK, k-g. The level of activity of selected strains of nirogenaznoj varies from-6.7-12, 9nmol'  $S_2N_4$ /h, competitiveness is 13.0% - 32.5.

**Keyword:** *Rhizobium leguminosarum*, fixation, chromatography, strain.

Поступила 10.03.2014 г.