

N E W S

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 16 – 21

IDENTIFICATION OF THE ISOLATED STRAINS OF NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIA

G. B. Baimakhanova¹, A. K. Sadanov¹, B. K. Zayadan²

¹Institute of Microbiology and Virology CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: bgulb@mail.ru

Key words: nitrogen fixation, cyanobacteria.

Abstract. One of the main tasks of agriculture is its ecologization, which involves the use of soil resources for the conservation and the potential increase, as well as effective soil fertility. Approaches to solving the problem is the use of microbial components of soil. Cyanobacteria - the indispensable and a large group of phototrophic microorganisms is attractive in this respect. Therefore, work on nitrogen-fixing cyanobacteria screening for use in agricultural biotechnology is very actual. The article presents data on the identification of isolated strains of nitrogen-fixing cyanobacteria by molecular biology techniques based on 16S rRNA gene. The results of nitrogen-fixing activity of cyanobacteria isolated *Anabaena variabilis* K-1 and *Nostoc calcicola* K-1 strains.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Г. Б. Баймаханова¹, А. К. Саданов¹, Б. К. Заядан²

¹Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: азотфиксация, цианобактерия.

Аннотация. Одной из главных задач земледелия является его экологизация, которая включает использование ресурсов почвы для сохранения и потенциального увеличения, а также эффективного плодородия почв. Подходы к решению задачи, заключаются в использовании микробной компоненты почвы. Привлекательна в этом плане непременная и многочисленная группа фототрофных микроорганизмов - цианобактерий. В связи с этим актуальны работы по подбору азотфикссирующих цианобактерий для применения в агробиотехнологии. В статье представлены данные по идентификации выделенных штаммов азотфикссирующих цианобактерий методами молекулярной биологии на основе гена 16S рРНК. Получены результаты азотфикссирующей активности выделенных штаммов цианобактерий *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1.

Важная экологическая роль цианобактерий обуславливается их уникальной способностью к фиксации молекулярного азота атмосферы, широкому спектру адаптации к различным почвенным и гидротермическим условиям [1]. Цианобактерии служат дополнительным источником органического вещества, как энергетического материала для гетеротрофных организмов и тем самым способствуют повышению плодородия почв. С точки зрения прикладного использования, они технологичны, что включает низкую стоимость сред для культивирования (отсутствие в среде органических соединений и источников минерального азота) и быстрое накопление биомассы, не требующей при этом дорогостоящего оборудования [2]. Вместе с тем, на общем фоне исследований роль цианобактерий в агробиотехнологии недостаточно изучена. Поэтому внимание исследователей сосредоточено на изучении воздействия азотфикссирующих цианобактерий на рост и развитие растений и возможности создания на их основе активных биопрепараторов.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили пробы воды, отобранные на рисовых полях Карактыбинского опорного пункта Казахского НИИ рисоводства им. Ибрая Жахаева г. Кызылорды. Определение видового состава цианобактерий проводили по методике Сиренко с использованием определителей [3-5]. Для выделения чистой культуры применяли микробиологические методы – разделение, пересевы, чашечный метод на средах Громова №6, BG-11. Культивирование проводилось в условиях лабораторного люминистата в непрерывном режиме при температуре 25-30°C и освещенности 3000-2000 лк. Для оценки активности цианобактерий использовались альгологические и бактериологически чистые формы [6, 7].

Определение азотфикссирующей активности проводили ацетиленовым методом.

Для идентификации выделенных штаммов цианобактерий использовались общепринятые методы. Проводилось изучение их культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств в соответствии с современными принципами классификации и с использованием определителей Еленкина, Голлербахас с уточнением по Комареку и Анаэностидису [8-12].

Молекулярные методы идентификации. Для молекулярного анализа, геномную ДНК из клеток азотфикссирующих цианобактерий выделяли методом экстракции горячим фенолом.

Для лучшего разрушения клеток в эмульсию фенола добавляли додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0,1%. РНК из смеси нуклеиновых кислот, удаляли при помощи РНКазыA. Очищенную геномную ДНК получали после конечной обработки препаратов смесью фенол-хлороформ (1:1), осаждения ДНК этанолом и растворения полученного осадка в минимальном количестве стерильной дистиллированной воды [13].

Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* осуществляли с помощью набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

Гель-электрофорез. Качество и количество полученного ПЦР-продукта анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле на основе трис-ацетатного буфера с использованием камеры Mini Horizontal Electrophoresis system (VWR International, США) [14].

Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор реагентов GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas). Фрагменты ДНК после очистки клонировали в Т-вектор pTZ57R/T (Fermentas). Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Stratagene, США) и набор реагентов Transform Aid Bacterial Transformation Kit (Fermentas).

ПЦР-амплификация. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проверяли с использованием специфичных для цианобактерий, праймеры 106F и 781R, соответствующих позициям 106-127 и 781-805 *E. coli*. Реакцию проводили по следующей программе: 94°C – 5 мин, далее 35 циклов: 94°C - 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 1 мин 10 с, этап завершающего синтеза - 72°C – 10 мин.

Параметры ПЦР были следующие: 95°C – 10 мин, далее 30 циклов: 95°C – 1 мин, 57°C – 30 с, 72°C – 40 с, и этап завершающего синтеза 72°C – 6 мин.

Секвенирование. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями баз данных (GenBank), с помощью программы поиска высокогомологичных последовательностей BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Для филогенетического анализа нуклеотидные последовательности были выровнены с последовательностями из баз данных. Построение филогенетических положений проводили по двухпараметрической модели Кумиры, методом ближайших соседей при помощи пакета программ MEGA, версия 6.06 [15,16].

Результаты исследований и их обсуждение

Идентификация выделенных штаммов азотфикссирующих цианобактерий методами молекулярной биологии

При создании новой комплексной таксономической классификации цианобактерий именно молекулярно-биологические данные берутся за основу [17]. Классификация и определение филогенетического положения этих штаммов проводились на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

На рисунке 1 отображены результаты амплификации гена 16S рРНК двух образцов.

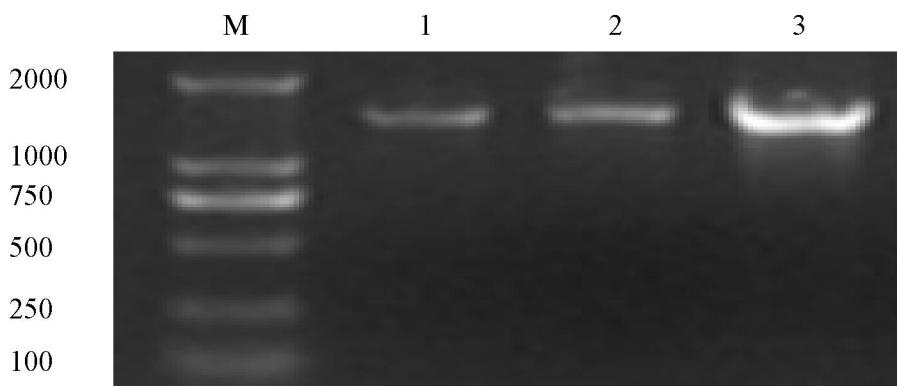


Рисунок 1 – Электрофорограмма продуктов амплификации фрагмента гена 16S рРНК ДНК штаммов цианобактерий; М-маркер, 1 – *Anabaena variabilis* K-1; 2 – *Anabaena* sp.; 3 – *Nostoc* sp. K-1

Выделенную из штаммов азотфикссирующих цианобактерий геномную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации гена 16S рРНК с помощью метода ПЦР, с использованием Hot Start *Taq*-полимеразы и бактериальных праймеров 106F и 781R [18], позволяющих получить практически полную последовательность вышеуказанного гена.

Выделенные штаммы цианобактерий на основании фенотипических признаков были отнесены к родам *Anabaena* и *Nostoc* и идентифицированы как *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1. Филогенетическое положение выделенных азотфикссирующих штаммов показано на рисунке 2.

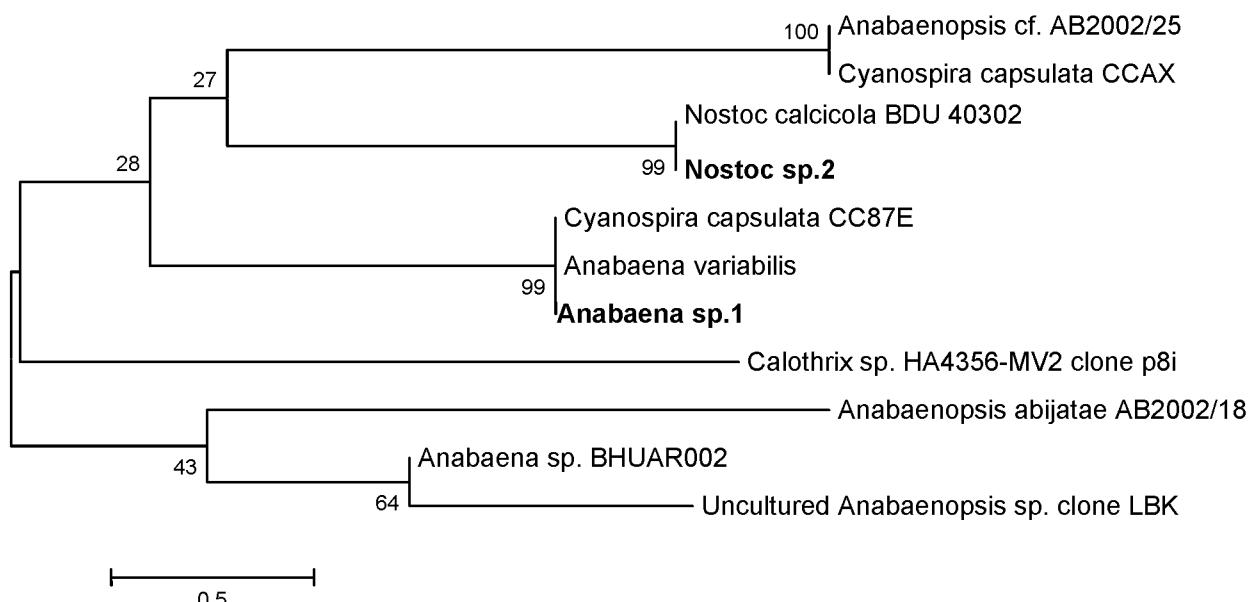


Рисунок 2 – Филогенетическое положение штаммов *Anabaena variabilis* и *Nostoc calcicola* на основании гена 16S рРНК с использованием метода ближайших соседей.
Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 10 нуклеотидов

Для подтверждения систематического положения штаммов было проведено определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК. Сравнительный анализ полученной последовательности показал высокий процент гомологии *Anabaena variabilis* (99%) и *Nostoc calcicola* (95%) с последовательностями цианобактерий *Anabaena variabilis* и цианобактериями, имеющимися в базе данных.

Это штаммы *Anabaenopsis* AB2002/25 (AM773302), *Cyanospira capsulate* CCAX (FR774777), *Nostoc calcicola* BDU 40302 (KC883980), *Cyanospira capsulate* CC87E (FR774775), *Calothrix* sp. HA4356-MV2 clone p8i (JN385289), *Anabaena psisabijatae* AB2002/18 (AM773301), *Anabaena* sp. BHUAR002 (HM235817).

Азотфикссирующие микроорганизмы усваивают азот путем фиксации атмосферного азота. Исследовали культуры *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1 на среде BG-11 без азота. Опыт проводили в трех проворностях. При измерении количества азота в качестве контрольного штамма, брали мутантный штамм *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, не фиксирующий атмосферный азот. На рисунке 3 показано содержание азота в культурах *Anabaena variabilis* K-1, *Nostoc calcicola* K-1, *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124, культивируемых на среде BG 11, без нитратов.

Из рисунка видно, что количество азота в культуре *Anabaena variabilis* K-1 составляет 10,2 %, у культуры *Nostoc calcicola* K-1 - 9,9%, тогда как в контрольном штамме *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 количество азота равно 4,2%. Это объясняется тем, что культуры *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1 являются азотфикссирующими цианобактериями и фиксируют молекулярный азот.

По результатам проведенных исследований можно сделать заключение, что вновь выделенные культуры методами молекулярной биологии на основе гена 16S рРНК идентифицированы как штаммы азотфикссирующих цианобактерий и определена филогенетическая принадлежность к видам *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1. А также выделенные штаммы обладают высокой азотфикссирующей активностью.

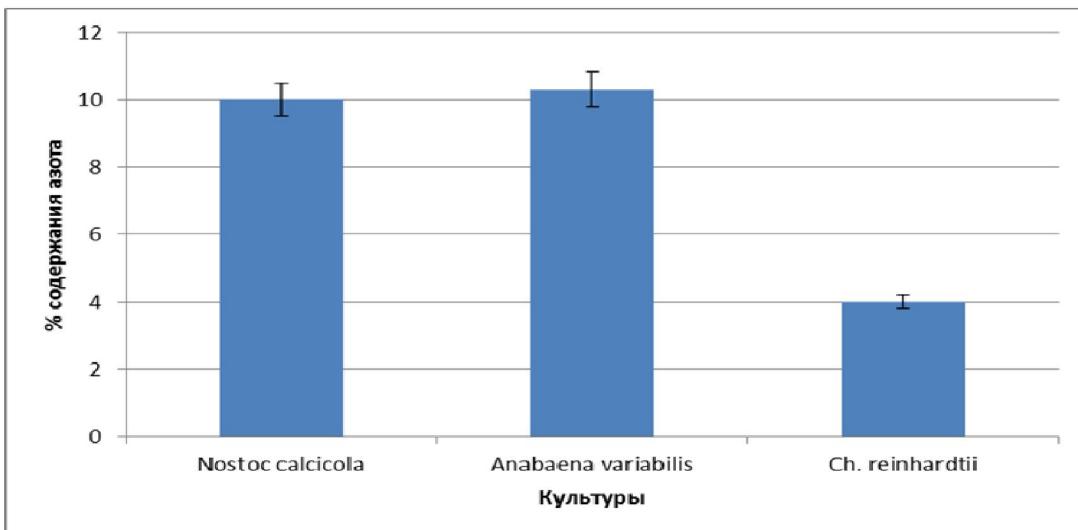


Рисунок 3 – Содержание азота в исследуемых культурах азотфикссирующих цианобактерий *Anabaena variabilis* K-1, *Nostoc calcicola* K-1 и микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124

Таким образом, культуры азотфикссирующих цианобактерий *Anabaena variabilis* K-1 и *Nostoc calcicola* K-1 можно использовать в качестве ростстимулирующих веществ в агробиотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Панкратова Е.М., Калинин А.А. Цианобактерии как возможные организмы для создания бактериальных препаратов // Роль научных исследований в развитии сельскохозяйственного производства Кировской области: Сб. тр. – Киров, 1991. - С.25-33.
- [2] Михеева Л., Карбышева Е., Шестаков С. Роль мобильных элементов в эволюции цианобактерий // Экологическая генетика / Ecological Genetics. — 2011. - Т. 9, № 4. - С. 52–62.
- [3] Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиологического-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наука думка, 1975.-247 с.
- [4] Определитель бактерий Берджи. Т.1. – Изд.9 / Под ред. Дж. Хоулта и др. - М.: Мир, 1997. - 520 с.
- [5] Музариков А.М., Эргашев А.Э., Халилова С.Х. Определитель сине-зеленых водорослей Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1987. - 88. - Т.1, Т.3 – С.3-1405.
- [6] Rai A.N. (ed.) Handbook of Symbiotic Cyanobacteria. Boca Raton. Florida: CRC. 1990. 253 p.
- [7] Заядан Б.К. Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К. Коллекция микроводорослей и методы их культивирования. – Алматы, 2013.- 158 с.
- [8] Синезеленые водоросли СССР. Монография пресноводных и наземных Cyanophyceae, обнаруженных в пределах СССР. Специальная (систематическая) часть. Вып. II. III. Hormogoneae (Geitl.) Elenk. (окончание) / АН СССР; Ботан. ин-т им. В. Л. Комарова; отв. ред. В. И. Савич. - М. - Л., 1949. - 1908 с.
- [9] Воронихин Н.Н. Растительный мир континентальных водоемов. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1953. 410 с.
- [10] Komarek J., Anagnostidis K. Cyanoprokariota 1. Teil: Chroococcales // Süsswasserflora von Mitteleuropa / Eds. Ettl H., Gartner G., Heyning H., Mollenhauer D. Jena, Stuttgart, Ltibeck, Ulm; G.Fischer, 1999. - 548 p.
- [11] Komarek J., Anagnostidis K. Cyanoprokariota 2. Teil: Oscillatoriales // Süsswasserflora von Mitteleuropa /B. Biidel, G. Gartner, L. Krienitz, M. Schagerl (Hrsg.), 2007. Bd. 19/2, 759 p.
- [12] Vasyurenko, Z.P., and Sinyak, K.M., Influence of Culture Medium of the Fatty-Acid Profile in Enteric Bacteria // J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. – 1979. - Vol. 23. - P. 397-406.
- [13] Kiseleva L.L., Serebriiskaya T.S., Horvath I., Vigh L., Lyukovich A.A., Los D.A. Expression of the gene for the acyl-lipid desaturase in the thermophilic cyanobacterium // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 2. - P. 331-338.
- [14] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [15] Kimura M. A. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences // J. Molecular Evol. - 1980. - Vol. 16. - P. 111-120.
- [16] Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. - 2004. - Vol. 5. - P. 150-163.
- [17] Richmond A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium //J. Appl. Hycology. - 2000. - Vol.12. - P.441-451.
- [18] Hoffmann, L., Komárek, J., and Ka Tovsk, J., System of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) - State in 2004, Abstr. 16th Symp. Int. Ass. Cyanophyte Res., Luxemburg, 2004. - p. 42.

REFERENCES

- [1] Pankratova E.M., Kalinin A.A. Cyanobacteria as a possible bacterial organisms to create drugs // The role of scientific research in the development of agricultural production of the Kirov region: Coll. tr. - Kirov, 1991. - p.25-33. (in Russ.).
- [2] Mikheyeva L., Karbysheva E., Shestakov S. Role of transposable elements in the evolution of cyanobacteria // Ecological Genetics / Ecological Genetics. - 2011 V. 9, № 4. - pp 52-62. (in Russ.).
- [3] Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F., Lukina L.F., et al. Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice. - Kiev: Science Dumka, 1975.-247 p. (in Russ.).
- [4] The determinant of bacteria Burgi. V.1. - Iss.9 / Ed. J. Holt et al. - M.: Mir, 1997. - 520 p. (in Russ.).
- [5] Muzaferov A.M., Ergashev A.E., Khalilova S.Kh. The determinant of blue-green algae in Central Asia. - Tashkent: Fan, 1987. - 88 - Vol.1, Vol.3 - p.3-1405. (in Russ.).
- [6] Rai A.N. (ed.) Handbook of Symbiotic Cyanobacteria. Boca Raton. Florida: CRC. 1990. 253 p. (in Russ.).
- [7] Zajadan B.K., Akmuanova N.R., Sadvakasova A.K. Collection of microalgae and their methods of cultivation. - Alma-ty, 2013.- 158 p. (in Russ.).
- [8] The blue-green algae of the USSR. Monograph freshwater and terrestrial Cyanophyceae, found in the USSR. Special (systematic) part. Vol. II. III. Hormogoneae (Geitl.) Elenk. (end) / USSR Academy of Sciences; Nerd. Inst them. Komarov; Ans. Ed. VI Savich. - M. - L., 1949. - 1908 p. (in Russ.).
- [9] Voronikhin N.N. The flora of the continental waters. - M.-L.: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1953. 410 pp. (in Russ.).
- [10] Komarek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokariota 1. Teil: Chroococcales* Süsswasserflora von Mitteleuropa Eds. Ettl H., Gartner G., Heyning H., Möllenhauer D. Jena, Stuttgart, Ltibeck, Ulm; G. Fischer, 1999. - 548 p. (in Engl.)
- [11] Komarek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokariota 2. Teil: Oscillatoriaceae* Süsswasserflora von Mitteleuropa B. Biidel, G. Gartner, L. Krienzl, M. Schagerl (Hrsg.), 2007. Bd. 19/2, 759 p. (in Engl.)
- [12] Vasyurenko, Z.P., and Sinyak, K.M., *Influence of Culture Medium of the Fatty-Acid Profile in Enteric Bacteria* J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1979. Vol. 23. - P. 397-406. (in Engl.)
- [13] Kiseleva L.L., Serebriiskaya T.S., Horvath I., Vigh L., Lyukovich A.A., Los D.A. *Expression of the gene for the Δ 9 acyl-lipid desaturase in the thermophilic cyanobacterium* J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 2. P. 331-338. (in Engl.)
- [14] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. (in Engl.)
- [15] Kimura M. A. *Simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotides sequences* J. Molecular Evol. 1980. Vol. 16. P. 111-120. (in Engl.)
- [16] Kumar S., Tamura K., Nei M. *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment* Briefings in Bioinformatics. 2004. Vol. 5. P. 150-163. (in Engl.)
- [17] Richmond A. *Microalgal biotechnology at the turn of the millennium* J. Appl. Hycology. 2000. Vol.12. P.441-451. (in Engl.)
- [18] Hoffmann, L., Komárek, J., and Ka Tovsk, J., *System of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria)* - State in 2004, Abstr. 16th Symp. Int. Ass. Cyanophyte Res., Luxemburg, 2004. p. 42. (in Engl.)

БӨЛІНІП АЛЫНГАН АЗОТФИКСАЦИЯЛАУШЫ ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАР ШТАМДАРЫНЫҢ ИДЕНТИФИКАЦИЯСЫ

Г. Б. Баймаханова¹, А. К. Саданов¹, Б. К. Заядан²

¹ҚР БФМ ФК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан,

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: азотфиксациялар, цианобактериялар, микробалдырылар.

Аннотация. Егіншілкітің ең басты мәселелердің бірі - оның экологизациясы, оған потенциялды жоғарылату, сактап қалу және де топырактың тиімді құнарлылығы үшін топырактың ресурстарын пайдалану кіреді. Мәселені шешу топырактың микробы компоненттерін пайдалану тәсіліне негізделеді. Бұл тұрғыда тұрақты және сансыз фототрофты микроорганизмдер тобының – цианобактериялары тиімді. Осылан орай азотфиксациялаушы цианобактерияларды агробиотехнологияда пайдалану үшін іріктеу жұмыстарын жүргізу өзекті мәселе болып табылады. Макалада бөлініп алынған штамдарға 16S rPHK ген негізінде молекуларлы биология әдісімен идентификация жүргізілгендігі жайлы мәліметтер келтірілген. Бөлініп алынған *Anabaena variabilis* K-1 және *Nostoc calcicola* K-1 цианобактериялар штамдарының азотфиксациялаушы белсенделілігі туралы нәтижелер алынды.

Поступила 02.02.2016 г.