

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 82 – 87

A. K. Sadanov, G. D. Ultanbekova, A. H. Khasenova, A. Massirbayeva,
N. Parkhatkyzy, K. Myrzatai, M. Esirkepyly

RSOE “Institute of Microbiology and Virology” SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: ultanbekova77@mail.ru

**STUDY ON PROMISING STRAINS OF NITROGEN-FIXING
ACTINOMYCETES BELONGING TO THE GENUS *FRANKIA*
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

Abstract. The represented 11 isolates of actinorhizal bacteria of *Frankia* spp. strains, obtained from the sea buckthorn plants (*Hippóphaë rhamnoides*), possess nitrigenase ability. Of all the samples examined, the highest nitrogenase activity was found in the actinomycete *Frankia* spp. isolate KF3, obtained from the floodplain of the Bolshaya Almatinka river – 12.0 ± 0.10 nmol C_2H_4 /protein per hour, and isolate KF7 obtained from the foothills of the Ile-Alatau nature reserve – 11.9 ± 0.12 nmol C_2H_4 /protein per hour.

Keywords: nitrogen fixing actinobacteria, *Frankia*, symbiosis, sea buckthorn, soil fertility.

УДК 631.4

А. К. Саданов, Г. Д. Ултанбекова, А. Х. Хасенова, А. Масирбаева,
Н. Пархатқызы, Қ. Мырзатай, М. Есіркепұлы

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ
АЗОФИКСИРУЮЩИХ АКТИНОМИЦЕТОВ РОДА *FRANKIA*
В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Аннотация. Представленные 11 изолятов актиноризных бактерий штаммов *Frankia* spp., выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), обладают нитрагеназной способностью. Из всех исследованных образцов наиболее высокой нитрогеназной активностью обладали изоляты актиномицетов рода *Frankia* spp. из поймы реки Большая Алматинка KF3 – $12,0 \pm 0,10$ нмоль C_2H_4 /белка в час и из предгорья Иле-Алатауского заповедника KF7 – $11,9 \pm 0,12$ нмоль C_2H_4 /белка в час.

Ключевые слова: азотфиксирующие актинобактерии, *Frankia*, симбиоз, облепиха, плодородие почв.

В настоящее время облепиха крушиновидная является пластичным растением по отношению к различным неблагоприятным экологическим условиям юго-востока Казахстана. Иными словами можно сказать, что облепиха обладает высокой экологической валентностью. Способность переносить морозы и повышенные температуры воздуха, примиримость к эдафическим условиям местопроизрастания, в том числе и засоленности почвы, а также широкий спектр областей производства, где облепиха может с успехом применяться, придают ей существенные преимущества по сравнению с другими кустарниковыми видами. Насаждения облепихи способствуют экологическому оздоровлению районов распространения этой культуры и приносят множество других полезных свойств населению и почвенному покрову, а также дикой фауне [1].

Симбиотическая фиксация атмосферного азота микроорганизмами является одним из основных процессов в природе, обеспечивающим почву связанным азотом и, следовательно,

имеющим прямое отношение к повышению плодородия почв, увеличению продуктивности сельского и лесного хозяйства. Очевидность нежелательных побочных последствий беспланового применения минеральных азотных удобрений, а также высокие энергетические затраты, связанные с их производством, служат существенными стимулами исследования этого процесса. По мнению специалистов, в ближайшие годы основным путем развития исследований по биологической азотфиксации будет изучение и дальнейшая оптимизация деятельности естественных симбиозов [2-4].

Симбиоз актиномицетов с покрытосеменными растениями занимает первое место среди других по таксономическому разнообразию растений-хозяев, характеризуется высокой эффективностью и играет важную роль во многих природных экосистемах. Актиноризные растения в возрастающей степени используются в народном хозяйстве при рекультивации и мелиорации земель, создании лесозащитных полос, в плодовом хозяйстве и медицине [5-12].

Согласно литературным данным, инокуляция облепихи специально подобранными штаммами *Frankia spp.* в условиях открытого грунта снижает гибель семян и саженцев растений, особенно в первые годы вегетации. Инокулированные растения превышают контрольные по весу, длине стебля, диаметру ствола, количеству и размеру листьев, а также по количеству и объему корневых клубеньков [13-15].

В естественных условиях эти актиномицеты образуют симбиотические связи с древесными породами – ольха, лох, облепиха. Однако данные последних лет по экспрессии отдельных генов у актиноризных растений позволяют заключить, что азотфиксация древесных не бобовых растений имеет много общего с бобовыми растениями [16]. По меньшей мере, семь общих генов задействованы в этих двух типах симбиоза. Эти гены получили название “*common symbiosis genes*”. В их число, например, входят гены, отвечающие за образование «преинфекционных нитей», которые впоследствии заселяются симбиотическими бактериями [17].

Существует вероятность, что лектины бобовых растений (аналогично лектинам актиноризных) участвуют в инициации симбиоза с *Frankia spp.* [18, 19].

Фиксация азота относится к превращению атмосферного газообразного азота (N_2) в форму, пригодную растениям и другим организмам. Фиксация азота осуществляется с помощью различных бактерий, как в качестве свободных живых организмов и в симбиотической ассоциации с растениями. Современные сельскохозяйственные системы зависят от фиксации азота облепихи, казуарина и других не бобовых древесных культур.

Живые организмы нуждаются в азоте, так как он является частью аминокислот, которые составляют белки и нуклеиновые кислоты, которые составляют ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) и РНК (рибонуклеиновой кислоты). Азот в живых организмах, в конечном счете разлагается и превращается в атмосферный азот (N_2). Эта форма, однако, обладает высокой стабильностью и не вступает в реакцию химически, и поэтому не доступна для использования большинством организмов [20].

Основным элементом симбиоза является, нитрогеназа – многомерный фермент.

Для активной работы нитрогеназы необходимы микроаэрофильные условия, которые в клубеньке обеспечиваются диффузным барьером (слой плотноприлегающих друг к другу клеток во внутреннем кортексе) и синтезом леггемоглобина (гемоглобинподобный белок, синтезируемый растительными клетками).

Леггемоглобин связывает O_2 , транспортирует его к симбиосомам, обеспечивая дыхательную активность клубеньков. Он составляет 30% белка в клубеньках и придает им ярко-розовый цвет. Леггемоглобин напоминает по своей структуре и функции гемоглобин человека и животных, специализирующийся, как известно, на транспорте O_2 и CO_2 . Леггемоглобин расположен в клетках клубеньков, где живут азотфиксирующие актиноризные микроорганизмы.

Нитрогеназный комплекс, образующий аммиак из воздуха, действует по физико-химическим законам очень экономно. Если в среде обитания достаточно ионов аммония или нитратов, он прекращает работу. Потребление растениями аммиака, образовавшегося при азотфиксации или восстановлении нитратов почвы, осуществляется ферментами, связанными с биосинтезом так называемых первичных аминокислот, прежде всего глютаминовой, аспарагиновой кислот и их

амидов. В конечном итоге азот в виде аминокрупп вовлекается в серию биосинтетических реакций организма, поддерживая его жизненные функции [21].

Цель работы заключалась в изучении азотфиксирующей способности актиномицетов рода *Frankia*.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись изоляты актиномицетов рода *Frankia*, выделенные из поймы реки Большая Алматинка и предгорья Иле-Алатауского заповедника.

Азотфиксирующую (нитрогеназную) способность актиномицетов рода *Frankia* изучали методом ацетиленредукции [22, 23].

Для определения способности к ацетиленредукции у чистых культур *Frankia spp.* Использовали биомассу, выращенную на богатой среде А (QMod) в течение 21 суток при 29°C и отмытую от среды физиологическим раствором.

Среда А (среда QMod), г/л: K_2HPO_4 – 0,3; $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 0,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; KCl – 0,2; дрожжевой экстракт Дифко – 0,5; пептон Дифко (бакто) – 5,0; глюкоза – 10,0; $FeC_6H_5O_7 \times nH_2O$ (цитрат железа) – 0,01; раствор микроэлементов – 1 мл/л; дистиллированная вода – 1000 мл.

Доводили pH до 6,8-7,0 гидроокисью натрия или соляной кислотой, потом добавляли $CaCO_3$ – 0,1 г, лецитин – 0,005 г/л, или Твин-80 – 1 мл/л. Растворяли 500 мг L- а- лецитина в 50 мл абсолютного этанола, добавляли 50 мл дистиллированной воды, использовали 1 мл на 1 л среды.

Раствор микроэлементов – 1 мл/л: H_3BO_3 – 1,5 г; $MnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,8 г; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,6 г; $CuSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1 г; $(NH_4)_6MoO_{24} \times 4H_2O$ – 0,2 г; $CoSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01 г; дистиллированная вода – 1000 мл.

Среда безазотная (БС) для проверки способности к азотфиксации, г/л:

KH_2PO_4 – 1,0; KCl – 0,1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,01; микроэлементы (мг/л): FeNaЭДТА – 10; H_3BO_3 – 2,86; $MnCl_2 \times 2H_2O$ – 1,81; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,22; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0,025; дистиллированная вода – 1000 мл.

Биомассу 50-80 мг помещали на среду БС (безазотная среда) во флаконы емкостью 50 мл с ватными пробками.

Через 3-5 суток, в течение которых флаконы инкубировались при температуре 29°C, ватную пробку заменяли на резиновую с зажимом, добавляли ацетилен (5 мл) и через 1-3 часа отбирали пробы газовой фазы для анализа.

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.

Количество этилена определяли на GX Agilent GC 7890/5977 MSD и количество образовавшегося этилена рассчитывали по величине пика этилена в сопоставлении с эталонной смесью (10 нмоль этилена в 1 мл воздуха).

Использование хромато-масс спектрометра Agilent GC 7890/5977 MSD позволяет сократить время инкубации исследуемых образцов в пробе с C_2H_2 и получить точные и достоверные результаты.

Так как, во всех исследованных образцах наиболее высокой нитрогеназной активностью ($12,0 \pm 0,10$ нмоль C_2H_4 /белка в час) обладал изолят рода *Frankia spp.*, выделенный из поймы реки Большая Алматинка KF3. Этот штамм был идентифицирован молекулярно-генетическим методом.

Результаты и их обсуждение

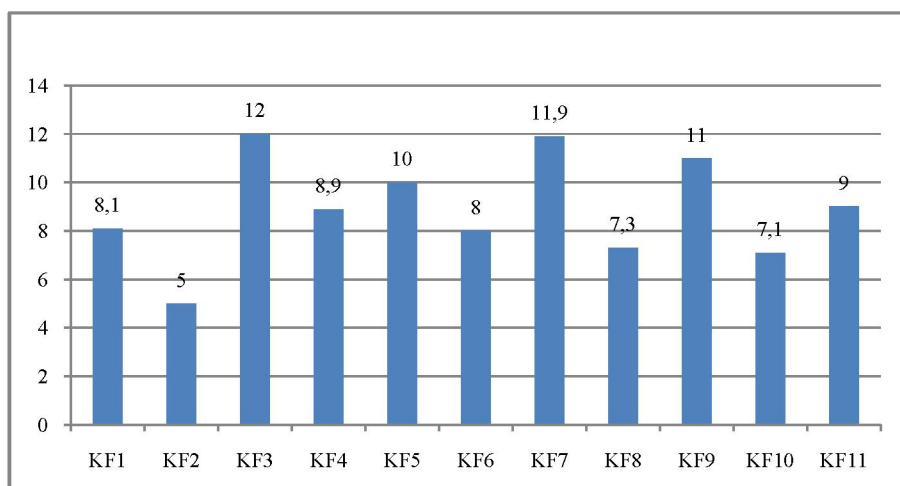
Исследование азотфиксирующей способности актиномицетов рода *Frankia* в лабораторных условиях

Азотфиксирующая система – сложная динамическая система. Процесс симбиотической азотфиксации является результатом большого числа процессов. Актиноризные древесные растения, имеющие симбиотические взаимоотношения с азотфиксирующими актиномицетами рода *Frankia*

spp., играют важную экологическую роль в качестве растений-пионеров для освоения бедных азотом почв, повышения их продуктивности и стабильности. Около 15% фиксированного азота в мире обеспечивается в результате симбиотических отношений между представителями семейства *Frankia spp.* и их растений-хозяев.

Изучена азотфиксирующая активность 11 штаммов актиноризных бактерий облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*). Полученные результаты представлены на рисунке.

На рисунке представлены данные, по изучению азотфиксирующей активности 11 изолятов актиноризных бактерий рода *Frankia spp.* выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*).



По оси ординат – нитрогеназная активность актиномицетов рода *Frankia* (нмоль C₂H₄/ч/ на 1 млн. клеток клубеньковых бактерий);
по оси абсцисс – наименование изолятов актиномицетов рода *Frankia spp.*

Нитрогеназная активность актиномицетов рода *Frankia spp.*

Из данных рисунка видно, что из всех исследованных образцов, наиболее высокой нитрогеназной активностью (12,0±0,10 нмоль C₂H₄/белка в час) обладает изолят актиномицета рода *Frankia spp.* KF3, выделенный из поймы реки Большая Алматинка.

Азотфиксирующая активность актиноризных бактерий является одним из важнейших критериев отбора перспективных коммерческих штаммов микроорганизмов для создания на их основе биопрепарата. В настоящее время в мире выделено, отселекционировано и поддерживается в искусственных условиях множество штаммов актиноризных бактерий облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), которые могут быть использованы для разработки биопрепаратов.

Установлено, что при изучении азотфиксирующей активности все представленные 11 изолятов актиноризных бактерий штаммов *Frankia spp.*, выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), обладают нитрогеназной способностью.

Таким образом, из всех исследованных образцов наиболее высокой нитрогеназной активностью обладали изоляты актиномицетов рода *Frankia spp.* выделенные из поймы реки Большая Алматинка KF3 – 12,0±0,10 нмоль C₂H₄/белка в час и из предгорья Иле-Алатауского заповедника KF7 – 11,9±0,12 нмоль C₂H₄/белка в час.

Отобран перспективный штамм актиномицета рода *Frankia spp.* KF3 с наиболее высокой нитрогеназной активностью.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Кентбаев Е.Ж. Перспективы выращивания облепихи в условиях Кызылординского Приаралья // Матер. междунар. науч. конф. «Современное экологическое состояние приаралья, перспективы решения проблем». – Кызылорда, 2011. – С. 35-38.

- [2] Малишкайте Ю.Б., Таптыкова С.Д., Евтушенко В.М. и др. Родовая принадлежность актиномицетов, выделенных из кулбеньков ольхи и других небобовых растений // Биологические науки. – 1984. – № 4 (244). – С. 83-865.
- [3] Sekar C., Prasad N.N., Sundaran M.D. Enhancement of polygalacturonase activity during auxing induced paranodulation and endorhizosphere colonization of Azospirillum in rice roots // Indian J. Exp. Biol. – 2000. – Vol. 38, N 1. – P. 80-83.
- [4] Tomar O.S., Minhas P.S., Sharma V.K., Singh Y.P., Gupta R.K. Performance of 31 tree species and soil conditions in a plantation established with saline irrigation // Forest Ecology and Management. – 2003. – Vol. 177. – P. 333-346.
- [5] Forrester D.I., Bauhus J., Cowie A.L., Vanclay J. K. Mixed-species plantations of Eucalyptus with nitrogen-fixing trees: a review // Forest Ecology and Management. – 2006. – Vol. 233, N 2. – P. 211-230.
- [6] Benson D.R., Dawson J.O. Recent advances in the biogeography and geneecology of symbiotic *Frankia* and its host plants // Physiol Plant. – 2007. – Vol. 130. – P. 318-330.
- [7] Chaia E.E., Wall L.G., Huss-Danell K. Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia* // Symbiosis. – 2010. – Vol. 51. – P. 201-226.
- [8] Dawson J.O. Ecology of actinorhizal plants // Nitrogen fixing actinorhizal symbioses. – 2008. – Vol. 78. – P. 199-234.
- [9] Diouf D., Diop T.A., Ndoeye I. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? Afric // Biotechnol. – 2003. – Vol. 2. – P. 1-7.
- [11] Dutta R.K., Agrawal M. Litterfall, litter decomposition and nutrient release in five exotic plant species planted in coal mine spoils // Pedobiologia. – 2001. – Vol. 45. – P. 298-312.
- [12] He X., Critchley C., Ng H., Bledsoe C. Nodulated N₂-fixing *Casuarina cunninghamiana* in the sink for net N transfer from non-N₂-fixing *Eucalyptus maculata* via an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. using ¹⁵NH₄⁺ or ¹⁵NO₃⁻ supplied as ammonium nitrate // New Phytol. – 2005. – Vol 167. – P. 897-912.
- [13] Mansour S.R. Survival of *Frankia* strains under different soil conditions // Online J. Biol.Sci. – 2003. – Vol. 3. – P. 618-626.
- [14] Pawlowski K. Induction of actinorhizal nodules by *Frankia* // Microbiol. – 2009. – Vol. 8. – P. 127-154.
- [15] Sayed W.F. Effects of land irrigation with partially-treated wastewater on *Frankia* survival and infectivity // Plant Soil. – 2003. – Vol. 254. – P. 19-25.
- [16] Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журнал общей биологии. – 2002. – Т. 63. – С. 451-472.
- [17] Markmann K., Giczey G., Parniske M. Functional Adaptation of a Plant Receptor-Kinase Paved the Way for the Evolution of Intracellular Root Symbioses with Bacteria // PLoS Biology. – 2003. – Vol. 177. – P. 333-346.
- [18] Вершинина З.Р., Дмитрюкова М.Ю., Баймиев А.Х. Получение трансгенных по гену лектина бородачатых корней на люцерне, облепихе и рапсе // Матер. междунар. науч. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». – Сыктывкар, 2007. – Т. 3. – С. 229-230.
- [19] Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Куликова О.Л. Генетическое биоразнообразие популяций ризобий *Sinorhizobium meliloti*, вступающих в симбиоз с бобовыми родов *Medicago* и *Melilotus* произрастающих в Башкортостане // Генетика микроорганизмов и биотехнология: матер. междунар. школа-конф., посв. 100-летию со дня рождения С. И. Алиханяна. – М., 2006. – С. 35-38.
- [20] Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Симбиотические реакции трансгенных бородачатых корней, полученных на облепихе (*Hippophae rhamnoides* L.), с актиномицетами и ризобиями // Матер. V съезда «Общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова». – Пущино, 2008. – С. 9-14.
- [21] Сытников Д.М. Биотехнология микроорганизмов-азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе // Биотехнология. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 34-45.
- [22] Ступарь О.С. Выделение, изучение и практическое использование актиномицетов рода *Frankia*: Автореф. ... к. б. н. 03.00.07. – Пущино, 1991. – 16 с.
- [23] Умаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119-123.

REFERENCES

- [1] Kentbaev E.ZH., Mater. mezhdunar. nauch. konf. «Sovremennoe ehkologicheskoe sostoyanie priaral'ya, perspektivy resheniya problem». Kyzylorda, **2011**, 35-38 (in Russ.).
- [2] Malishkajte YU.B., Taptykova S.D., Evtushenko V.M., Biologicheskie nauki, **1984**, 4 (244), 83-865 (in Russ.).
- [3] Sekar C., Prasad N.N., Sundaran M.D., Indian J. Exp. Biol., **2000**, 38 (1), 80-83.
- [4] Tomar O.S., Minhas P.S., Sharma V.K., Singh Y.P., Gupta R.K., Forest Ecology and Management, **2003**, 177, 333-346.
- [5] Forrester D.I., Bauhus J., Cowie A.L., Vanclay J. K. Forest Ecology and Management, **2006**, 233 (2), 211-230.
- [6] Benson D.R., Dawson J.O. Physiol Plant, **2007**, 130, 318-330.
- [7] Chaia E.E., Wall L.G., Huss-Danell K., Symbiosis, **2010**, 51, 201-226.
- [8] Dawson J.O. Nitrogen fixing actinorhizal symbioses, **2008**, 78, 199 – 234.
- [9] Diouf D., Diop T.A., Ndoeye I. Biotechnol., **2003**, 2, 1-7.
- [11] Dutta R.K., Agrawal M., Pedobiologia, **2001**, 45, 298-312.
- [12] He X., Critchley C., Ng H., Bledsoe C. New Phytol., **2005**, 167, 897-912.
- [13] Mansour S.R. Online J. Biol.Sci., **2003**, 3, 618-626 (in Russ.).
- [14] Pawlowski K. Microbiol., **2009**, 8, 127-154 (in Russ.).
- [15] Sayed W.F. Plant Soil., **2003**, 254, 19-25 (in Russ.).

- [16] Provorov N. A., Borisov A. YU., Tihonovich I. A., Zhurnal obshchej biologii., **2002**, 63, 451-472 (in Russ.).
- [17] Markmann K., Giczey G., Parniske M., PLoS Biology., **2003**, 177, 333-346.
- [18] Vershinina Z.R., Dmitryukova M.YU., Bajmiev A.H., Mater. mezhdunar. nauch. konf. «Sovremennaya fiziologiya rastenij: ot molekul do ehkositsem», **2007**, 3, 229-230 (in Russ.).
- [19] Bajmiev A.H., Bajmiev A.H., Vershinina Z.R., Kulikova O.L., Genetika mikroorganizmov i biotekhnologiya: mater. mezhdunar. shkola-konf., posv. 100-letiyu so dnya rozhdeniya S. I. Alihanyana, Moskva, **2006**, 35-38 (in Russ.).
- [20] Vershinina Z.R., Bajmiev A.H., Mater. V s"ezda «Obshchestva biotekhnologov Rossii im. YU.A. Ovchinnikova», Pushchino, **2008**, 9-14 (in Russ.).
- [21] Sytnikov D.M., Biotekhnologiya, **2012**, 5 (4), 34-45 (in Russ.).
- [22] Stupar' O.S. Vydelenie, izuchenie i prakticheskoe ispol'zovanie aktinomicetov roda Frankia, avtoref., Pushchino, **1991** (in Russ.).
- [23] Umarov M.M., Pochvovedenie, **1976**, 11, 119-123 (in Russ.).

**А. К. Саданов, Г. Д. Ұлтанбекова, А. Х. Хасенова, А. Масирбаева,
Н. Пархатқызы, Қ. Мырзатай, М. Есіркепұлы**

Микробиология және вирусология институты ҚР БҒМ ҒМ, Алматы, Қазақстан

**АЗОТСІЗІРГІШ КЕЛЕШЕГІ БАР *FRANKIA* ТУЫСЫНА ЖАТАТЫН
АКТИНОМИЦЕТ ШТАМДАРЫН ЗЕРТХАНАЛЫҚ ЖАҒДАЙДА ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Шырғанақ өсімдігінен бөліп алынған (*Hippóphaë rhamnoides*), *Frankia spp.* штамына жататын актиноризді бактериялардың 11 изоляты, нитрагеназды белсенділік қабілетін көрсетті. Барлық зерттелген үлгілердің ішінен үлкен Алматы жайылмалы су жағалауынан бөліп алынған *Frankia spp.* туысына жататын KF3 штамының нитрогеназды белсенділігі (сағатына $12,0 \pm 0,10$ нмоль C_2H_4 /ақуыз) және Іле Алатау бөктерінен бөліп алынған *Frankia spp.* туысына жататын KF7 штамының нитрогеназды белсенділігі (сағатына $11,9 \pm 0,12$ нмоль C_2H_4 /ақуыз) анықталды.

Түйін сөздер: азотсіздіргіш актинобактериялар, *Frankia*, симбиоз, шырғанақ, топырақ құнарлылығы.