

А.К. САДАНОВ, Г.Д. УЛТАНБЕКОВА, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА,
М. УСИКБАЕВА, Г.М. МАХАНБЕТОВА Ж.А. БАЙГОНУСОВА

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *SINORHIZOBIUM MELILOTI* Л5-1, СТИМУЛИРУЮЩЕГО РОСТ ЛЮЦЕРНЫ

Аннотация

Подобрана оптимальная среда с бобовым отваром для роста и накопления биомассы штамма клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 (титр клеток $6,1 \times 10^8$ КОЕ/мл). Установлено, что максимальный титр клеток ($3,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) обеспечивается при использовании в качестве источника углерода сахарозы в концентрации 6 г/л. Неорганические соли: CaCO_3 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ оказывают стимулирующее действие на накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1, увеличивая титр клеток до $1,0 \times 10^9$ - $1,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: *Sinorhizobium meliloti* Л-5, люцерна, штамм.

Современное состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса Казахстана тесно связаны с регулированием уровня плодородия почв. Главным критерием этого является обеспечение максимальной урожайности сельскохозяйственных культур в различных почвенно-климатических условиях. Приоритетными являются технологии, обеспечивающие рациональное использование земельных ресурсов, сохранение и повышение почвенного плодородия, получение стабильной урожайности и высокое качество продукции растениеводства.

В Казахстане остро стоит проблема не только низкого плодородия почв, но и животного белка. В решении этих проблем важная роль отводится зерновым бобовым растениям и кормовым травам. Поэтому увеличение площадей бобовых культур и введение новых видов зерновых и кормовых трав является одним из приоритетных направлений в развитии сельского хозяйства Республики Казахстан.

Для повышения урожайности бобовых культур (сои, гороха, чечевицы, нута, фасоли, люцерны, донника и др.) в Институте микробиологии и вирусологии КН МОН РК разработан и внедрен в практику биопрепарат «Ризовит-АКС», полученный на основе азотфиксирующих клубеньковых бактерий, которые, фиксируя азот атмосферы, обогащают почву легкодоступным для растений биологическим азотом. Одна из серий биопрепарата разработана на основе высокоэффективного штамма клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. Люцерна является ценной сельскохозяйственной кормовой культурой, посевы которой в Казахстане составляют 200г/га и с каждым годом планируется их увеличение. Разработка биопрепарата для повышения урожайности люцерны является важным этапом для решения задачи животного белка и, одновременно, повышения плодородия почв.

Целью данного исследования являлся подбор оптимальной питательной среды для роста и накопления биомассы штамма клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 и изучение влияния источников углерода и неорганических солей.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований являлся штамм клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. Штамм инкубировали на агаровой среде Мазэ в течение 24 часов при температуре 28°C .

Для подбора оптимальных условий роста и накопления биомассы культивирование штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 выращивали на 10 жидких питательных средах: среде с

3% кукурузным экстрактом, Исварана, Лазарева, с бобовым отваром, Грэхема, Фреда, Норриса, МРС, Мазэ, минимальной среде. Состав сред приведен в г/л.

1. Среда с 3% кукурузным экстрактом: кукурузный экстракт - 30,0; K_2HPO_4 -0,5; глюкоза - 10,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ -0,2; $NaCl$ -0,2; $(NH_4)_2SO_4$ -0,5; pH 6,8-6,9.

2. Среда Исварана: сахароза-10,0; K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ -0,2; глюконат кальция-1,5; $FeCl_3$ -0,01; дрожжевой экстракт-2,0; pH 6,8-7,0.

3. Среда Лазарева: KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ -0,2; $NaCl$ -0,2; $MnSO_4$ -0,005; сахароза-10,0; дрожжевой экстракт-100 мл; pH 7,2.

4. Среда с бобовым отваром: KH_2PO_4 -1,0; $MgSO_4$ -0,3; сахароза -2,0; бобовый отвар-50; pH 7,0.

5. Среда Грэхема: маннит-0,5; лактоза-0,5; $NaCl$ -0,2; $CaCl_2$ -0,2; $MgSO_4$ -0,1; $FeCl_3$ -0,1; дрожжевой экстракт-0,5; pH 7,0.

6. Среда Фреда: KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,2; $CaCO_3$ -3,0; $NaCl$ -0,1; дрожжевой экстракт-1,0; сахароза, маннит или глюкоза-10,0; pH 6,8-7,0.

7. Среда Норриса: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,8; $CaSO_4$ -0,1; $NaCl$ -0,2; $FeCl_3$ -0,01; дрожжевой экстракт-2,0; 0,4% р-р бромтимолового синего-5мл; маннит-10,0; pH 7,2

8. Минерально-растительная среда: K_2HPO_4 -0,5; KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,1; $CaSO_4$ -0,1; $NaCl$ -0,2; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ -следы; маннит или глюкоза-20; соевая мука-10; pH 6,8-7,0

9. Среда Мазэ: KH_2PO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,3; $NaCl$ -0,5; сахароза-10,0; горох-100,0; pH 7,0

10. Минимальная среда: K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4$ -0,2; $NaCl$ -0,1; NH_4NO_3 -0,1; маннит-10,0; соевая мука-10,0; pH 7,0

Штамм *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 инкубировали на жидких средах в течение 48 часов на ротационном шейкере при 180-200 об/мин и температуре 28°C.

Влияние источников углерода (сахарозы, глюкозы, маннита, глицерина), неорганических солей ($CaCO_3$, $NaCl$) и микроэлементов ($MnSO_4$, H_3BO_3 , $ZnSO_4$, $CoCl_2$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$) на рост и накопление биомассы клубеньковых бактерий сои и люцерны изучали на оптимальной среде. Источники углерода вносили в питательную среду в концентрациях, (г/л): 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; микроэлементы - 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; $CaCO_3$ - 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 и $NaCl$ - 0,2; 0,4; 0,6; 0,8.

Для оптимизации состава подобранной оптимальной среды разработаны следующие варианты:

Вариант №1: $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - 0,02; $ZnSO_4$ - 0,005; $CoCl_2$ - 0,005; $MnSO_4$ - 0,02; $CaCO_3$ -6,0; сахароза - 6,0; горох - 50,0;

Вариант №2: $MnSO_4$ - 0,02; $CoCl_2$ - 0,005; $ZnSO_4$ -0,005; сахароза - 6,0; горох - 50,0;

Вариант №3: $MnSO_4$ - 0,02; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - 0,02; сахароза - 6,0; горох - 50,0;

Вариант №4: $CaCO_3$ -6,0; $MnSO_4$ -0,02; $ZnSO_4$ -0,005; сахароза - 6,0; горох - 50,0;

Вариант №5: $CaCO_3$ -6,0; $MnSO_4$ -0,02; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - 0,02; сахароза - 6,0; горох - 50,0;

Эффективность использования питательных сред, источников углерода и неорганических солей для накопления биомассы клубеньковых бактерий сои и люцерны оценивали по величине титра клеток и культурально-морфологическим показателям (размерам и форме колоний). Значение титра клеток выражали в КОЕ/мл.

Результаты и обсуждение

При культивировании штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 установлено, что титр клеток на изученных питательных средах изменялся в пределах $2,6 \times 10^4$ - $6,1 \times 10^8$ КОЕ/мл (таблица 1). Среда Фреда, МРС, Лазарева, минимальная среда, среда с 3% кукурузным экстрактом в меньшей степени обеспечивали рост штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. Титр клеток на этих средах составлял $2,6 \times 10^4$ - $4,9 \times 10^5$ КОЕ/мл. Наиболее оптимальными для роста *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 являлись среды с бобовым отваром, Исварана, Грэхема и Норриса. При культивировании исследуемого штамма на этих средах величина титра составляла $1,8 \times 10^5$ - $6,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Наиболее оптимальной для роста штамма

Sinorhizobium meliloti Л5-1 является среда с бобовым отваром, на которой титр клеток достигает $6,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. На фоне этой среды изучено влияние источников углерода, неорганических солей и микроэлементов на рост штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 и накопление его биомассы.

Таблица 1 - Подбор оптимальной среды для роста и накопления биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1

Питательные среды	Титр клеток, КОЕ/мл	Морфологические признаки колоний
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> Л5-1	
Исварана	$1,7 \times 10^7$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3-0,6 см
Лазарева	$4,9 \times 10^5$	
Бобовый отвар	$6,1 \times 10^8$	
Кукурузный экстракт	$1,6 \times 10^5$	
Грэхема	$2,9 \times 10^7$	
Фреда	$1,4 \times 10^5$	
Норриса	$1,8 \times 10^5$	
МРС	$7,2 \times 10^6$	
Мазэ	$5,5 \times 10^7$	
Минимальная среда	$2,6 \times 10^4$	

Все исследуемые источники углерода значительно влияли на накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. Полученные данные приведены в таблице 2. Наиболее высокий титр клеток ($3,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) наблюдался на среде с сахарозой в концентрации 6 г/л. Как уменьшение концентрации сахарозы до 2 г/л, так и её дальнейшее увеличение (выше 6 г/л) ингибирует рост штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. Глюкоза, глицерин и маннит незначительно влияют на прирост биомассы. При внесении глюкозы и маннита в среду отмечено увеличение титра с $7,1-1,5 \times 10^6$ (концентрация 2,0 г/л) до $5,7-6,1 \times 10^8$ (концентрация 6 г/л). При увеличении концентрации глицерина в среде накопление биомассы клубеньковых бактерий снижается.

Таблица 2 - Влияние источников углерода на рост и накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1

Углеводы	Концентрация, г/л	Титр клеток, КОЕ/мл	Морфологические признаки колоний
		<i>Sinorhizobium meliloti</i> Л5-1	
1	2	3	4
Сахароза	2,0	$6,1 \times 10^8$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3-0,6 см
	4,0	$1,0 \times 10^9$	
	6,0	$3,6 \times 10^{10}$	
	8,0	$5,6 \times 10^7$	
	10,0	$3,2 \times 10^7$	
Глюкоза	2,0	$5,0 \times 10^6$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 см
	4,0	$7,0 \times 10^6$	
	6,0	$5,7 \times 10^7$	
	8,0	$1,2 \times 10^7$	
	10,0	$1,05 \times 10^7$	
Глицерин	2,0	$4,8 \times 10^7$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 см
	4,0	$1,1 \times 10^6$	
	6,0	$5,5 \times 10^4$	
	8,0	$2,7 \times 10^4$	
	10	$1,3 \times 10^4$	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Маннит	2,0	$1,5 \times 10^6$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,5 см
	4,0	$5,3 \times 10^7$	
	6,0	$6,1 \times 10^7$	
	8,0	$2,8 \times 10^7$	
	10,0	$1,5 \times 10^7$	
Контроль (сахароза)	2,0	$6,1 \times 10^8$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3 см

Неорганические соли по-разному влияют на накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 (таблица 3). CoCl_2 и ZnSO_4 в минимальных концентрациях (0,005 г/л) оказывают положительное воздействие на накопление биомассы, увеличивая титр клеток до $3,0-6,3 \times 10^9$ КОЕ/мл, при дальнейшем увеличении концентрации этих солей накопление биомассы уменьшается. Mn^{2+} и Mo^{7+} в концентрации 0,02 г/л также оказывают положительное воздействие на накопление биомассы штамма Л5-1, при этом титр клеток возрастает до $1,6 \times 10^{10}-5,4 \times 10^9$ КОЕ/мл. Бор (H_3PO_3) в изученных концентрациях ингибирует рост клеток штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1. При внесении в среду NaCl титр клеток уменьшается с увеличением концентрации соли, в концентрации NaCl - 0,2-0,4 г/л, титр возрастает до $3,5-5,8 \times 10^9$. CaCO_3 с увеличением концентрации стимулирует прирост биомассы до $4,5 \times 10^9$ КОЕ/мл в концентрации 8 г/л.

Таблица 3 - Влияние неорганических солей на рост и накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1

Неорганические соли	Концентрация, г/л	Титр клеток, КОЕ/мл	Морфологические признаки колоний
1	2	3	4
MnSO_4	0,005	$3,2 \times 10^8$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 см
	0,01	$4,1 \times 10^8$	
	0,02	$1,6 \times 10^{10}$	
	0,04	$5,7 \times 10^9$	
ZnSO_4	0,005	$6,3 \times 10^9$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 и 0,6 см
	0,01	$7,9 \times 10^7$	
	0,02	$2,6 \times 10^6$	
	0,04	$2,2 \times 10^6$	
CoCl_2	0,005	$3,0 \times 10^9$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 и 0,6 см
	0,01	$2,0 \times 10^8$	
	0,02	$1,8 \times 10^8$	
	0,04	$1,4 \times 10^7$	
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,005	$2,2 \times 10^8$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные колонии
	0,01	$2,7 \times 10^8$	
	0,02	$5,4 \times 10^9$	
	0,04	$3,6 \times 10^6$	
H_3BO_3	0,02	$2,3 \times 10^6$	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные колонии
	0,04	$1,4 \times 10^6$	
	0,06	$1,2 \times 10^5$	
	0,08	$1,3 \times 10^5$	

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
CaCO ₃	2,0	4,5×10 ⁸	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные и средние колонии с диаметром 0,4 см
	4,0	5,6×10 ⁸	
	6,0	1,0×10 ⁹	
	8,0	4,5×10 ⁹	
NaCl	0,2	3,5×10 ⁹	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные и крупные колонии до 0,9 см
	0,4	5,8×10 ⁹	
	0,6	4,0×10 ⁷	
	0,8	5,9×10 ⁷	
Контроль	Сахароза (2,0) Без внесения солей	6,1×10 ⁸	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3 см

Таким образом, на фоне среды с бобовым отваром подобраны оптимальный источник углерода (сахароза, 6 г/л) и оптимальные концентрации неорганических солей (CaCO₃; MnSO₄; ZnSO₄; CoCl₂; (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O), стимулирующих накопление биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1.

Для оптимизации питательной среды с бобовым отваром изучен рост штамма клубеньковых бактерий люцерны на пяти вариантах сред с различным составом неорганических солей и сахарозой (6 г/л) в качестве источника углерода (таблица 4). Титр клеток на изученных вариантах сред изменялся в пределах от 1,1×10⁸ до 2,6×10¹⁰ КОЕ/мл. Установлено, что наибольшее количество биомассы накапливается на среде №3, титр составляет 2,6×10¹⁰ КОЕ/мл. Однако уровень накопления биомассы *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 на средах в сочетании сахарозы и комплекса неорганических солей ниже или не превышает титра клеток на среде только с сахарозой (3,6×10¹⁰ КОЕ/мл).

Таким образом, сахароза, как источник углерода, может быть оптимальным фактором для обеспечения максимального уровня роста штамма клубеньковых бактерий люцерны *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 без дополнительного внесения других компонентов.

Таблица 4 - Оптимизация состава среды с бобовым отваром для накопления биомассы штамма *Sinorhizobium meliloti* Л5-1

Варианты	Титр клеток, КОЕ/мл	Морфологические признаки колоний
Вариант №1	2,2×10 ⁹	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 см
Вариант №2	1,1×10 ⁸	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,1-0,3 см
Вариант №3	2,6×10 ¹⁰	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3 и 0,6 см
Вариант №4	7,1×10 ⁸	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные колонии
Вариант №5	1,6×10 ⁹	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, точечные и средние с диаметром 0,4 см колонии
Контроль (среда с бобовым отваром)	6,1×10 ⁸	Прозрачные, выпуклые, округлые с ровными краями, диаметр колоний 0,3 см

Литература:

1 Саданов А.К. Наука в Казахстане должна быть продуктивной.//Газета «Литер»14 июля 2012

2 Яницкий Е.Б. Геоэкологическая оценка и мониторинг антропогенного воздействия горной промышленности Курской магнитной аномалии с использованием ГИС: на примере Старооскольско-Губкинского района: автореф. ... географ. наук: 25.00.36.- М., 2009.- 14с.

3 Л. А. Суховицкая и др. Рост ризобактерий на питательных средах разного состава и отбор бинарной ассоциации для получения микробного препарата // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных трудов / Национальная академия наук Беларуси - Минск, 2011. - Т. 2. - С.303-311

4 Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications/ A. Oren // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. - 2002. – Vol. 28. - P. 56 – 63.

Түйін

А.Қ. САДАНОВ, Г.Д. ҰЛТАНБЕКОВА, Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА, М.
УСИКБАЕВА, Г.М. МАХАНБЕТОВА, Ж.А. БАЙГОНУСОВА

ҚР ҒК БЖҒМ РМК «Микробиология және вирусология институты», Алматы қ.

ЖОҢЫШҚАНЫҢ ТҮЙНЕКТІ БАКТЕРИЯСЫНЫҢ *SINORHIZOBIUM MELILOTI* Л5-1 ШТАММЫНЫҢ ӨСУІНЕ ҚОЛАЙЛЫ ҚОРЕКТІК ОРТАЛАРДЫ ТАҢДАУ

Жоңышқаның түйнекті бактериясының *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 штаммының өсуі мен биомассаның жиналуына қолайлы қоректік орта бұршақ тұнбасымен (жасушаның титры $6,1 \times 10^8$ КТБ/мл). *Sinorhizobium meliloti* Л5-1 штаммына көміртек көзі ретінде сахароза, ал ең қолайлы концентрациясы 6 г/л болғанда, жасушаның титры ($3,6 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) екендігі анықталған. Бейорганикалық тұздардың (CaCO_3 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$) концентрациялары анықталған, Л5-1 штаммының биомассасының жинақталуын 10^9 - 10^{10} КОЕ/мл дейін жоғарылатты.

A.K. Sadanov, G.D. Ultanbekova, L.P. Trenozhnikova, M. Usikbaeva, G.M. Mahanbetova,
Zh.A. Baygonusova

RSOE “Institute of Microbiology and Virology”, Committee of Science, Ministry of Education
and Science, Almaty, Republic of Kazakhstan

SELECTION OF OPTIMAL MEDIA FOR CULTURING THE STRAIN *SINORHIZOBIUM MELILOTI* L5-1 STIMULATING ALFALFA GROWTH

Summary

The optimal media with bean broth for growth and biomass accumulation of the strain L5-1 of alfalfa nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti* was selected (cell titer is 6.1×10^8 CFE/ml). It was found that the maximum cell titer (3.6×10^{10} CFE/ml) is provided when using sucrose as a carbon source in a concentration of 6 g/L. Inorganic salts: CaCO_3 , MnSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ have stimulating effect on the biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1 by increasing cell titer up to 1.0×10^9 - 1.6×10^{10} CFE/ml.

Key words: Strain, *shinorhizobium meliloti* l5-1, alfalfa growth

The current state and prospects of agricultural sector development in Kazakhstan are closely related to the regulation of the soil fertility level. The main criterion for this is to ensure maximum agricultural crop yield under different soil and climatic conditions. Priority is given to technologies that guarantee the rational use of land resources, preservation and improvement of soil fertility, obtaining a stable crop yield and high quality plant products.

In Kazakhstan, there is an acute problem of both low soil fertility, and animal protein. In addressing these issues, an important role is assigned to grain legumes and forage grasses. Therefore, increasing acreage under leguminous crops and introducing new types of grain and forage grasses is one of the priorities in the development of agriculture of the Republic of Kazakhstan.

To improve the yield of leguminous crops (soybeans, peas, lentils, chickpeas, beans, alfalfa, sweet clover, etc.), at the Institute of Microbiology and Virology, CS MES, RK, biological preparation "Rizovit-AKS" was developed and implemented in practice, obtained on the basis of nitrogen-fixing root nodule bacteria that by fixing atmospheric nitrogen enrich the soil with readily accessible to plants biological nitrogen. One of a series of biological preparation was developed on the basis of high-efficient strain L5-1 of alfalfa root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*. Alfalfa is a valuable agricultural field cultures, the crops of which in Kazakhstan are 200g/hect., and every year it is planned to increase them. Development of a biological preparation to improve the yield of alfalfa is an important step for the solution of the problem with animal protein and, at the same time, soil fertility improvement.

The aim of this study was selecting optimal medium for the growth and biomass accumulation of the strain L5-1 of alfalfa nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*, and studying the effect of carbon sources and inorganic salts.

Materials and research methods

The object of research was the strain L5-1 of alfalfa nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*. The strain was incubated in the Maze' agar medium for 24 hours at 28°C.

To select the optimum conditions for growth and biomass accumulation the strain L5-1 of *Sinorhizobium meliloti* was cultivated in liquid media: medium with 3% corn extract, Isvaran', Lazarev', with bean broth, Graham', Fred', Norris', MPM, Maze', minimal medium. The composition of media is given in g/L.

1. Medium with 3% corn extract: corn steep liquor - 30.0; K_2HPO_4 - 0.5; glucose - 10.0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.2; NaCl - 0.2; $(NH_4)_2SO_4$ - 0.5; pH 6.8-6.9.
2. Isvaran' medium: saccharose - 10.0; K_2HPO_4 - 0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.2; calcium gluconate - 1.5; $FeCl_3$ - 0.01; yeast extract - 2.0; pH 6.8-7.0.
3. Lazarev' medium: KH_2PO_4 - 0.5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.2; NaCl - 0.2; $MnSO_4$ - 0.005; saccharose - 10; yeast extract - 100 ml; pH 7.2.
4. Medium with bean broth: KH_2PO_4 - 1.0; $MgSO_4$ - 0.3; saccharose - 2.0; bean broth - 50; pH 7.0.
5. Graham' medium: mannitol - 0.5; 0, lactose - 0.5; NaCl - 0.2; $CaCl_2$ - 0.2; $MgSO_4$ - 0.1; $FeCl_3$ - 0.1; yeast extract - 0.5; pH 7.0.
6. Fred' medium: KH_2PO_4 - 0.5; $MgSO_4$ - 0.2; $CaCO_3$ - 3.0; NaCl - 0.1; yeast extract - 1.0; saccharose, mannitol or glucose - 10.0; pH 6.8-7.0.
7. Norris' medium: K_2HPO_4 - 0.5; $MgSO_4$ - 0.8; $CaSO_4$ - 0.1; NaCl - 0.2; $FeCl_3$ - 0.01; yeast extract - 2.0; 0.4% blue bromthymol blue - 5ml; mannitol - 10.0; pH 7.2
8. Mineral-plant medium: K_2HPO_4 - 0.5; KH_2PO_4 - 0.5; $MgSO_4$ - 0.1; $CaSO_4$ - 0.1; NaCl - 0.2; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ - trace concentration; mannitol or glucose - 20; soy flour - 10; pH 6.8-7.0
9. Maze' medium: K_2HPO_4 - 0.5; $MgSO_4$ - 0.3; NaCl - 0.5; saccharose - 10.0; peas - 100.0; pH 7.0
10. Minimal medium: K_2HPO_4 - 0.5; $MgSO_4$ - 0.2; NaCl - 0.1; NH_4NO_3 - 0.1; mannitol - 10.0; soy flour - 10.0; pH 7.0.

The L5-1 strain of *Sinorhizobium meliloti* was incubated in liquid media for 48 hours in a rotary shaker at 180-200 rpm and a temperature of 28°C.

Effect of carbon sources (saccharose, glucose, mannitol, glycerol), inorganic salts ($CaCO_3$, NaCl) and microelement ($MnSO_4$, H_3BO_3 , $ZnSO_4$, $CoCl_2$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$) on growth and biomass accumulation of soybean and alfalfa root nodule bacteria was studied in optimal medium. The carbon sources were added to the culture medium at concentrations of

(g/L): 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0; microelements - 0.005; 0.01; 0.02; 0.04; CaCO₃ - 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; and NaCl - 0,2; 0,4; 0,6; 0,8. /

To optimize the selected optimal medium the following options have been developed:

Variant 1: (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O - 0.02; ZnSO₄ - 0.005; CoCl₂ - 0.005; MnSO₄ - 0.02; CaCO₃-6.0; saccharose - 6.0; peas - 50.0;

Variant 2: MnSO₄ - 0.02; CoCl₂- 0.005; ZnSO₄-0.005; saccharose - 6.0; peas - 50.0;

Variant 3: MnSO₄ -0.02; (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O - 0.02; saccharose - 6.0; peas - 50.0;

Variant 4: CaCO₃-6.0; MnSO₄ - 0.02; ZnSO₄-0,005; saccharose - 6.0; peas - 50.0;

Variant 5: CaCO₃-6.0; MnSO₄ - 0.02; (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O - 0.02; saccharose - 6.0; peas - 50.0.

The use efficiency of culture media, carbon sources and inorganic salts for the biomass accumulation of soybean and alfalfa nodule bacteria was evaluated by a cell titer and culture-morphological characteristics (size and shape of the colonies). The value of cell titer was expressed in CFU/ml.

Results and discussion

When cultivating the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1, it was established that the cell titer on the media under study ranged within 2.6×10⁴ - 6.1×10⁸ CFE/ml (Table 1). Fred' and Lazarev' media, MPM, minimal medium, medium with 3% corn extract to a lesser extent supported the growth of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1. The cell titer in these media varied within 2.6×10⁴ - 4.9×10⁵CFE/ml. The most optimal for the growth of *Sinorhizobium meliloti* L5- 1 was a medium with bean broth, Isvaran', Graham', and Norris' media. During the test strain cultivation in these media, the value of titer was within 1.8×10⁵- 6.1×10⁸ CFE/ml. The most optimal for growth of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1 was a medium with bean broth, in which the cell titer reached 6.1×10⁸ CFE/ml. Against this medium, the effect of carbon sources, inorganic salts and microelements on the growth of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1 and its accumulation of biomass was studied.

Table 1 - Selection of optimal medium for the growth and biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1

Culture media	Cell titer, CFE/ml <i>Sinorhizobium meliloti</i> L5-1	Morphological characteristics of colonies
Isvaran'	1,7x10 ⁷	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.3-0.6 cm.
Lazarev'	4,9 x10 ⁵	
Bean broth	6,1 x10 ⁸	
Corn steep liquor	1,6x10 ⁵	
Graham'	2,9 x10 ⁷	
Fred'	1,4 x10 ⁵	
Norris'	1,8x10 ⁵	
MPM	7,2 x10 ⁶	
Maze'	5,5 x10 ⁷	
Minimal medium	2,6 x10 ⁴	

All studied carbon sources significantly affected the biomass accumulation of *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1. The data obtained are shown in Table 2. The highest cell titer (3.6 × 10¹⁰ CFE/ml) was observed on the medium containing saccharose at a concentration of 6 g/L. Both reducing the concentration of saccharose up to 2 g/L and, and its further increasing (higher than 6 g/L) inhibited the growth of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1. Glucose, glycerol and mannitol significantly affected the biomass increase. When adding glucose and mannitol to the medium, an increase in titer was observed from 7.1-1.5×10⁶ (concentration of 2.0 g/L) to 5.7-6.1×10⁸ (concentration of 6 g/L). When increasing the concentration of glycerol in the medium, an accumulation of nodule bacterial biomass decreased.

Table 2 - Effect of carbon source on growth and biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1

Carbohydrates	Concentration, g/L	Cell titer, CFE/ml	Morphological characteristics of colonies
		<i>Sinorhizobium meliloti</i> JI5-1	
Saccharose	2,0	$6,1 \times 10^8$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.3-0.6 cm
	4,0	$1,0 \times 10^9$	
	6,0	$3,6 \times 10^{10}$	
	8,0	$5,6 \times 10^7$	
	10,0	$3,2 \times 10^7$	
Glucose	2,0	$5,0 \times 10^6$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm
	4,0	$7,0 \times 10^6$	
	6,0	$5,7 \times 10^7$	
	8,0	$1,2 \times 10^7$	
	10,0	$1,05 \times 10^7$	
Glycerol	2,0	$4,8 \times 10^7$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm
	4,0	$1,1 \times 10^6$	
	6,0	$5,5 \times 10^4$	
	8,0	$2,7 \times 10^4$	
	10	$1,3 \times 10^4$	
Mannitol	2,0	$1,5 \times 10^6$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.5 cm
	4,0	$5,3 \times 10^7$	
	6,0	$6,1 \times 10^7$	
	8,0	$2,8 \times 10^7$	
	10,0	$1,5 \times 10^7$	
Control	2,0 (saccharose)	$6,1 \times 10^8$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.3 cm

Inorganic salts have different effects on biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1 (Table 3). CoCl_2 and ZnSO_4 at minimum concentrations (0.005 g/L) had a positive effect on the biomass accumulation, increasing cell titer to $3.0\text{-}6.3 \times 10^9$ CFE/ml; further increasing the concentration of these salts decreased the biomass accumulation. Mn^{2+} and Mo^{7+} in a concentration of 0.02 g/L also had a positive effect on biomass accumulation of the strain L5-1, at that the cell titer increased to $1.6 \times 10^{10}\text{-}5.4 \times 10^9$ CFE/ml. Boron (H_3PO_3) in the studied concentrations inhibited the growth of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1. When adding NaCl to the medium, a cell titer decreased with increase in the salt concentration; at the NaCl concentration of 0.2-0.4 g/L, the titer increased to $3.5\text{-}5.8 \times 10^9$. CaCO_3 with increase in the concentration stimulated the gain in biomass to 4.5×10^9 CFE/ml at concentration of 8 g/L.

Table 3 - Effect of inorganic salts on the growth and biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1

Inorganic salts	Concentration, g/L	Cell titer, CFE/ml	Morphological characteristics of colonies
1	2	3	4
MnSO4	0,005	$3,2 \times 10^8$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm
	0,01	$4,1 \times 10^8$	
	0,02	$1,6 \times 10^{10}$	
	0,04	$5,7 \times 10^9$	
ZnSO4	0,005	$6,3 \times 10^9$	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 and 0.6 cm
	0,01	$7,9 \times 10^7$	
	0,02	$2,6 \times 10^6$	
	0,04	$2,2 \times 10^6$	

Continued Table 3

1	2	3	4
CoCl ₂	0,005	3,0×10 ⁹	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 and 0.6 cm
	0,01	2,0×10 ⁸	
	0,02	1,8×10 ⁸	
	0,04	1,4×10 ⁷	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O	0,005	2,2×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint colonies
	0,01	2,7×10 ⁸	
	0,02	5,4×10 ⁹	
	0,04	3,6×10 ⁶	
H ₃ BO ₃	0,02	2,3×10 ⁶	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint colonies
	0,04	1,4×10 ⁶	
	0,06	1,2×10 ⁵	
	0,08	1,3×10 ⁵	
CaCO ₃	2,0	4,5×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint and medium colonies with diameter of 0.4 cm
	4,0	5,6×10 ⁸	
	6,0	1,0×10 ⁹	
	8,0	4,5×10 ⁹	
NaCl	0,2	3,5×10 ⁹	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint and large colonies up to 0.9 cm
	0,4	5,8×10 ⁹	
	0,6	4,0×10 ⁷	
	0,8	5,9×10 ⁷	
Control	Saccharose (2.0) without addition of salts	6,1×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.4 cm

Thus, against the medium with bean broth the optimal carbon source was chosen (saccharose, 6 g/L) as well as optimal concentrations of inorganic salts (CaCO₃; MnSO₄; ZnSO₄; CoCl₂; (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O), stimulating the biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1.

To optimize a medium with bean broth, the growth of the strain of alfalfa root nodule bacteria was studied in five medium variants with different composition of inorganic salts and saccharose (6 g/L) as a carbon source (Table 4). The cell titer in the investigated medium variants ranged from 1.1×10⁸ to 2.6×10¹⁰ CFE/ml. It was found that the greatest amount of biomass was accumulated in the medium No 3, the titer is 2.6×10¹⁰ CFE/ml. However, the level of biomass accumulation of *Sinorhizobium meliloti* L5-1 in media under the combination of saccharose and inorganic salts is lower or does not exceed the cell titer in a medium with saccharose only (3.6×10¹⁰ CFE/ml).

Thus, saccharose as a carbon source may be the optimal factor to provide the maximum growth level of the L5-1 strain of alfalfa nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti* without adding other components.

Table 4 - Optimization of the medium composition with bean broth for biomass accumulation of the *Sinorhizobium meliloti* strain L5-1

Variants	Cell titer, CFE/ml	Morphological characteristics of colonies
Variant 1	2,2×10 ⁹	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm
Variant 2	1,1×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm
Variant 3	2,6×10 ¹⁰	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.3-0.6 cm
Variant 4	7,1×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint colonies
Variant 5	1,6×10 ⁹	Transparent, convex, rounded with smooth edges, pinpoint and medium colonies with diameter of 0.4 cm
Control (medium with bean broth)	6,1×10 ⁸	Transparent, convex, rounded with smooth edges, the diameter of colonies is 0.1-0.3 cm

References:

- 1 Sadanov A.K. Science in Kazakhstan should be productive. "Liter" the newspaper. July 14, 2012.
- 2 Yanitsky E.B. Geo-ecological assessment and monitoring of the human impact of the mining industry in the Kursk magnetic anomaly using GIS: by the example of Starooskol-Gubkin district: abstract of a thesis: 25.00.36 / E.B. Yanitsky; Rus. Geograph. Acad. - Moscow, 2009. – 14 p.
- 3 L.A. Sukhovitskaya et al. Growth of rhizobacteria on nutrient media of different composition and selection of a binary association for microbial drug. // *Microbial Biotechnologies: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers / National Academy of Sciences of Belarus - Minsk, 2011. - Vol. 2. - P. 303-311.*
- 4 Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. - 2002. – Vol. 28. - P. 56 – 63.*