

УДК 631.461.5(597)

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОПЛАНЫ ОВОЩНЫХ РАСТЕНИЙ ВЬЕТНАМА
IPOMOEAE AQUATICA L. И *BRASSICA INTEGRIFOLIA* L.

Т.М. ФУНТ¹, В.Т. ЕМЦЕВ¹, Л.А. ПОЗДНЯКОВ², О.В. СЕЛИЦКАЯ¹

(¹РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; ²МГУ имени М.В. Ломоносова)

Впервые выделены культуры ассоциативных азотфиксирующих бактерий из ризопланы тропических овощных культур Вьетнама. Изучение нитрогеназной активности полученных изолятов показало, что около 227 выделенных культур обладают данной способностью, причем многие культуры характеризуются довольно высоким уровнем связывания азота. Выявлено, что многие культуры ассоциативных бактерий обладают ростостимулирующей способностью по отношению к культурным растениям.

Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии, ассоциативные бактерии, *Ipomoea aquatica* L., *Brassica integrifolia* L., рост активизирующие вещества, нитрогеназная активность, стимуляция роста растений.

В последние десятилетия число исследований, посвященных ассоциативным азотфиксирующим бактериям, существенно выросло, так как эти бактерии, обитая на корнях растений улучшают их азотное питание, а также обеспечивают защиту от фитопатогенов, чем способствуют адаптации растений к стрессовым факторам. Во Вьетнаме микробиологические удобрения изучаются с 60-х гг., однако объем производства микробных удобрений во здесь все еще недостаточен для удовлетворения практических потребностей сельского хозяйства. Поэтому особое внимание уделяется поиску новых культур микроорганизмов, перспективных для создания новых биопрепаратов, полученных на основе ассоциативных бактерий, способных расти на корнях растений и обеспечивать их атмосферным азотом.

В связи с этим, целью наших исследований явилось выделение культур ассоциативных бактерий из ризопланы корней овощных культур *Ipomoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L., широко культивируемых на почвах Северного Вьетнама, и изучение их нитрогеназной активности и способности к биосинтезу ростостимулирующих соединений.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являются ассоциативные бактерии ризопланы 2 видов овощных культур, выращиваемых в условиях Северного Вьетнама: водяной шпинат (*Ipomoea aquatica* L.) и разнолистная капуста (*Brassica integrifolia* L.), которые ранее не изучались в подобных исследованиях. Ипомея водяная или водяной шпинат — вид цветковых растений рода Ипомея (*Ipomoea*) семейства Вьюнковые (*Convolvulaceae*). Однолетнее или многолетнее травянистое растение, которое содержит 90% воды, су-

хая масса содержит 48% углеводов, 24% белков и 13% золы. Время роста 15-25 дней. Капуста разнолистная (*Brassica integrifolia* L.) из семейства капустные (*Brassicaceae*) — однолетнее растение, высотой 50-100 см. В 100 г содержится: 1,1 г белка, 0,2 г липидов, 2,1 г углеводов, 61 мг кальция, 37 мг фосфора, 0,5 мг железа, 0,01 мг каротина, 0,02 тиамин (В1), 0,04 мг витамина В2, 0,3 мг ниацина (В3), 20 мг аскорбиновой кислоты (С). Капуста разнолистная выращивается в течение всего года, время роста 35-45 дней. Эти две овощные культуры — одни из самых важных во Вьетнаме, и как продукт питания занимают особое место в рационе человека [2].

Для анализа азотфиксирующих микроорганизмов ризопланы были отобраны образцы корней двух видов овощных культур из Северного Вьетнама — *Ipomoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L. Корни растений отмывали в стерильной воде, помещали во флаконы с безазотной питательной средой Федорова-Калининской [6] (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 — 1,74; KH_2PO_4 — 0,91; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,3; $NaCl$ — 0,5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,1; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 0,01. К ней добавляли (г/л): глюкозу — 10, дрожжевой автолизат — 0,1 и бромтимолблау раствор 0,5% спиртовой — 2 мл, а затем инкубировали при температуре 25-28°C. Затем культуры пересевали в полужидкую среду Федорова-Калининской с сахарозой или манатом и смесью витаминов (мкг/л): биотин — 10, рибофлавин — 200, витамин B_{12} — 2, тиамин, пиридоксин, пантотенат кальция, никотиновая и парааминобензойная кислота — по 100. Инкубацию культур проводили при 28°C в течение 2 недель. Всего было получено 36 накопительных культур.

Активность фиксации азота определяли ацетиленовым методом [5] с помощью газового хроматографа Chrom-4 на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова. Диазотрофные культуры выращивались в пенициллиновых флакончиках, закрытых ватными пробками. Перед измерением пробки заменяли на эластичные резиновые, прочно заворачивали в полиэтилен, добавляли во флакон 1 мл ацетилена, а затем инкубировали образцы сутки при 28°C. Азотфиксирующую активность выражали в наномолях образовавшегося этилена за 1 час инкубации. Активность азотфиксации вычисляли по формуле:

$$A\Phi = \frac{0,0067 \times S \times V}{t}, \text{ (наномоль } C_2H_4/\text{ч)}$$

где 0,0067 — калибровочная коэффициент на этилен, S — площадь пика этилена (мВ-сек), V — объем воздуха в пенициллиновом флакончике, T — время инкубации с ацетиленом (ч).

Из накопительных культур, показавших высокий уровень нитрогеназной активности, выделяли чистые культуры бактерий на средах DAS [4] и Эшби [6]. Затем пересевали чистые культуры в пенициллиновые флакончики с 5 мл полужидкой среды Федорова-Калининской с сахарозой и через неделю использовали для определения нитрогеназной активности.

Для выяснения способности выделенных культур к биосинтезу ростовых веществ был проведен опыт с кресс-салатом. Повторность опытов трёхкратная. Семена замачивали в течение 30 мин в суточной бактериальной культуре разной концентрации: разведение в 10, 100, 1000 раз; контроль — вода. После этого в чашках Петри на фильтровальную бумагу раскладывали по 20 замачиваемых семян и добавляли 2 мл воды. Затем семена проращивали в термостате при 25°C. Через 72 ч измеряли длину корешков и стебельков проростков.

Схема модельного опыта с огурцом и разнолистной капустой

Варианты:

1 — без инокуляции (контроль).

В остальных вариантах растения инокулировались изолятами, выделенными из ризопланы двух видов овощных культур, для которых была характерна самая высокая азотфиксирующая способность и способность к активизации роста растений:

2 — изолят С 7,

3 — изолят С43,

4 — изолят С22,

5 — изолят F12,

6 — изолят С19,

7 — изолят E17,

8 — изолят J26.

В каждом варианте выращивали растения в 5 г вермикулита с 15 мл раствором смеси Прянишникова [1].

Модельный опыт проводили на партенокарпическом гибриде Fj огурца (*Cucumis sativus* L.) Кассандра Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А.Тимирязева и разнолистной капусте (*Brassica integrifolia* L.) сорта «VK 13» агрофирмы «Vinh Nong». Выращивание растений проводилось в условиях климатической камеры в течение 40 дней при следующих параметрах: день — 16 ч при 25°C, ночь — 8 ч при 18°C. Семена огурцов замачивали в воде в течение 2 сут, а семена разнолистной капусты — 1 сут при температуре 25°C. Перед посевом проросшие семена двух видов растений выдерживали в суточной бактериальной культуре в течение 2 ч. Титр суточной культуры составлял 7,5Т0⁸- 8,0Т0⁸ КОЕ/мл. Обработанные проросшие семена высевали в стеклянные сосуды (объем 150 мл) с вермикулитом и раствором смеси Прянишникова, сосуды закрывались ватной пробкой. После 20 дней растения поливали в каждом варианте 8 мл раствора бактериальной суточной культуры, разведение 1:50 (титр суточной культуры составлял интервал 1,80Т0⁸- 2,0Т0⁸ КОЕ/мл). Повторность опытов шестикратная.

Для определения нитрогеназной активности культур в ассоциации с растениями на десятый и двадцатый дни наблюдения мы добавляли в сосуды с вермикулитом и растением 10 мл ацетилена, закрывали их эластичной резиновой пробкой, прочно заворачивали в полиэтилен и инкубировали в течение 2 сут.

Для измерения нитрогеназной активности на корнях растений после 40 дней наблюдений мы отбирали корни растений (0,1 г для огурца и 0,01 г для разнолистной капусты), отмывали их в воде, помещали во флаконы (объем 15 мл) с 5 мл безазотной питательной среды Федорова-Калининской и инкубировали в термостате (28°C) в течение 1 нед. Затем добавляли 1 мл ацетилена и после этого инкубировали 1 сут перед измерением.

Анализы также включали в себя измерение высоты и массы стебля растений после 40 дней наблюдений. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 5,5.

Результаты исследований

Нитрогеназная активность накопительных культур.

В результате проведенных исследований установлено, что все 36 образцов накопительных культур, полученных из ризопланы *Ipotoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L., характеризуются азотфиксирующей активностью (табл. 1,2).

Таблица 1

**Нитрогеназная активность накопительных культур из ризопланы *Iritomea aquatica* L.,
культивируемых на среде Федорова-Калининской с сахарозой
или с малатом (наномоль $C_2H_4/ч$)**

Номер образца	На среде Федорова-Калининской с сахарозой	Номер образца	На среде Федорова-Калининской с малатом
1	1,15	10	0,15
2	0,92	11	0,29
3	0,87	12	0,05
4	13,00 (A)	13	1,24
5	19,21 (B)	14	0,41
6	13,75 (C)	15	0,32
7	12,32 (D)	16	0,91
8	1,06	17	1,04
9	0,92	18	0,87

*Примечание: буквы А, В, С, D обозначают накопительные культуры, обладающие самой высокой нитрогеназной активностью.

Таблица 2

**Нитрогеназная активность накопительных культур из ризопланы *Brassica integrifolia* L.,
на среде Федорова-Калининской с сахарозой или с малатом (наномоль $C_2H_4/ч$)**

Номер образца	На среде Федорова-Калининской с сахарозой	Номер образца	На среде Федорова-Калининской с малатом
1	0,71	10	0,82
2	0,59	11	1,11
3	0,69	12	0,95
4	0,70	13	0,92
5	0,56	14	0,81
6	0,50	15	1,11
7	9,01 (E)	16	0,96
8	10,29 (F)	17	0,77
9	10,31 (J)	18	0,96

*Примечание: буквы Е, F, J обозначают накопительные культуры, для которых характерна самая высокая нитрогеназная активность.

Самая высокая нитрогеназная активность среди полученных накопительных культур была выявлена на среде Федорова-Калининской с сахарозой. Она достигла 19,21 наномоль $C_2H_4/ч$. На среде Федорова-Калининской с малатом уровень нитрогеназной активности был заметно ниже (самое высокое значение составило только 1,24 наномоль $C_2H_4/ч$). В целом, образцы из ризопланы *Ipomoea aquatica* L. характеризуются более высоким уровнем азотфиксирующей активности, чем из ризопланы *Brassica integrifolia* L.

Нитрогеназная активность чистых культур, выделенных из накопительных культур, которые показали наиболее высокую азотфиксирующую активность.

Из накопительных культур, имеющих самую высокую нитрогеназную активность (А-Ж), было выделено 227 чистых культур на двух средах: DAS и Эшби. Затем из культур, выделенных из каждой накопительной культуры, мы отобрали изоляты, которые имеют самую высокую активность азотфиксации по сравнению с другими.

В результате проведенных наблюдений над накопительной культурой А, полученной из ризопланы *Ipomoea aquatica* L., было выделено 47 чистых культур, из которых наибольшей нитрогеназной активностью обладает изолят А20 (29,37 наномоль $C_2H_4/ч$).

В последующих опытах с накопительной культурой В, полученной из ризопланы *Ipomoea aquatica* L., выделили 32 чистых культуры, большинство из которых обладали очень низкой нитрогеназной активностью, кроме двух изолятов: В30 имел 19,44 наномоль $C_2H_4/ч$ и изолят В31 имел 27,81 наномоль $C_2H_4/ч$.

Существенное число изолятов, имеющих достаточно высокую нитрогеназную активность, было выделено из накопительной культуры С, полученной из ризопланы растений *Ipomoea aquatica* L. (рис. 1). Всего из накопительной культуры С выделили 47 чистых культур, среди которых 8 имеют нитрогеназную активность больше, чем 40 наномоль $C_2H_4/ч$. Азотфиксирующая активность изолята С7 достигла 44,24; С12 — 42,7; С13 — 43,2; С19 — 42,57; С22 — 42,87; С31 — 42,65; С37 — 43,9; С43 — 41,95 наномоль $C_2H_4/ч$.

Из накопительной культуры D, полученной из ризопланы *Ipomoea aquatic* L., выделили 21 чистую культуру, из которых был отобран один изолят, нитрогеназная активность которого достигла 2,58 наномоль $C_2H_4/ч$.

Изучение нитрогеназной активности изолятов, выделенных из накопительной культуры Е, полученной из ризопланы *Brassica integrifolia* L., показало, что среди 31 чистой культуры наивысшую активность проявил изолят Е17 (4,13 наномоль $C_2H_4/ч$) и изолят Е30 (2,96 наномоль $C_2H_4/ч$).

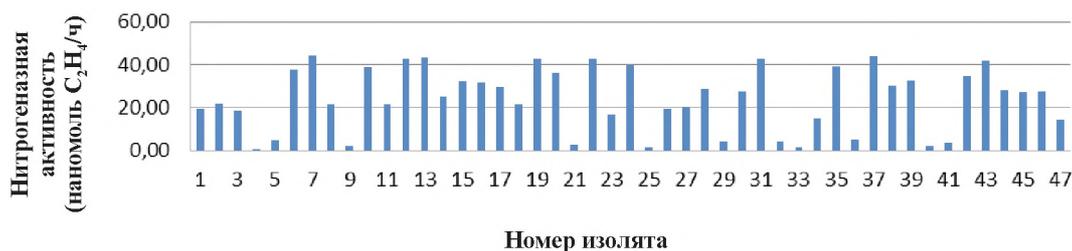


Рис. 1. Нитрогеназная активность изолятов, выделенных на среде Федорова-Калининской с сахарозой из накопительной культуры С, полученной из ризопланы *Ipomoea aquatica* L.

Определение нитрогеназной активности 30 чистых культур, выделенных из накопительной культуры F, полученной из ризопланы *Brassica integrifolia* L., показало, что наибольшей активностью обладает изолят F12 (8,99 наномоль $C_2H_4/ч$) (рис. 2).

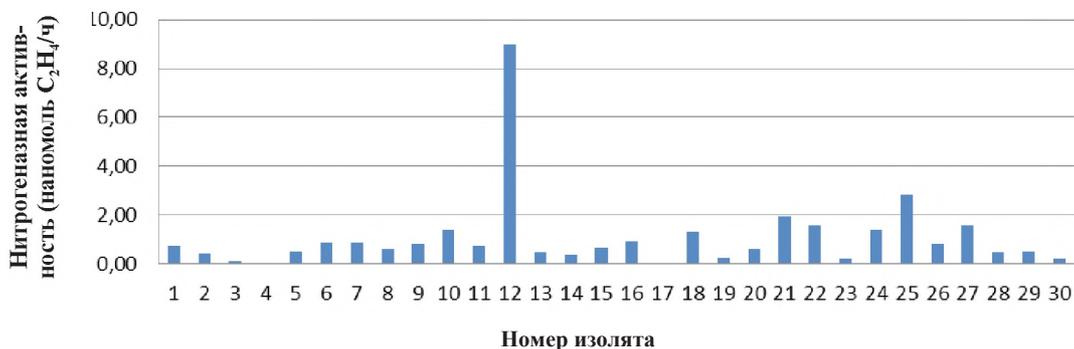


Рис. 2. Нитрогеназная активность изолятов, выделенных на среде Федорова-Калининской с сахарозой из накопительной культуры F, полученной из ризопланы *Brassica integrifolia* L.

Исследование нитрогеназной активности 40 изолятов, выделенных из накопительной культуры J, полученной из ризопланы *Brassica integrifolia* L., показало, что активность изолята J26 достигла 2,41, а у изолята J35 — была равна 2,27 наномоль $C_2H_4/ч$. Эти два изолята имеют самую высокую азотфиксирующую активность.

Таким образом, для дальнейшей работы были отобраны 17 штаммов, которые имеют самую высокую активность азотфиксации: A20, B30, B31, C7, C12, C13, C19, C22, C31, C37, C43, D2, E17, E30, F12, J26, J35. Эти изоляты были использованы для изучения способности к активизации роста растений.

Определение способности отобранных изолятов к активизации роста растений.

В настоящее время доказано, что положительное влияние азотфиксирующих бактерий на продуктивность растений может быть обусловлено не только улучшением азотного питания, но и синтезом диазотрофами растактивирующих веществ, а также подавлением роста фитопатогенных микроорганизмов [3]. Растения и ризосферные бактерии «обмениваются» химическими веществами — «сигналами», которые позволяют им вступать в мутуалистические взаимоотношения. Среди таких веществ, образуемых ризобактериями, имеются стимуляторы роста растений — гормоны роста растений, в частности — ауксин (индолил-3-уксусная кислота — ИУК). Активными продуцентами ИУК являются бактерии *Aeromonas veronii*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum*, *Pantoea ananas*, *Vibria fluvialis*, *Vibrio furnissii*, а также типичные почвенные бактерии, представители родов *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* и некоторые другие [7].

Как показывают наши результаты, большинство полученных штаммов способны к активации роста растений. При достаточно высоком разведении (1:100, 1:1000) бактериальной культуры наблюдалась существенная стимуляция роста как корней (от 110% до 149%), так и стеблей (от 110 до 139%) проростков кресс-салата (рис. 3-6). При разведении 1:10, все варианты показывают значения, близкие к контролю.

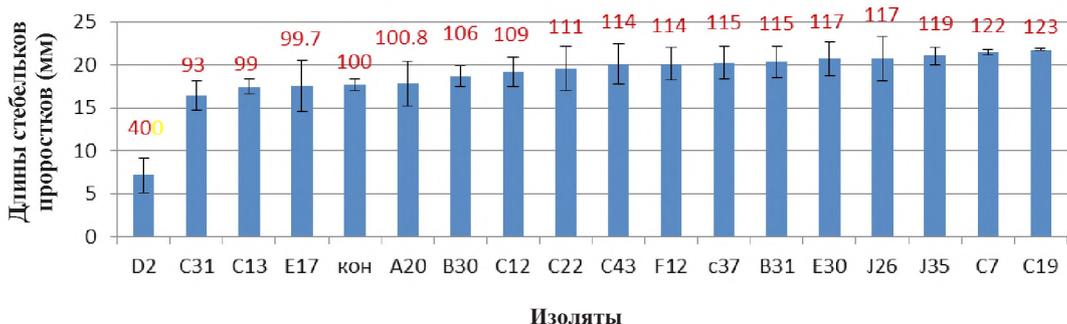


Рис. 3. Длина стебельков проростков кресс-салата после замачивания семян в разведении 1:100 суточной культуры разных изолятов в течение 30 мин и инкубации при 25°C через 72 ч (над столбиками указано процентное отношение величины к контролю)



Рис. 4. Длина корешков проростков кресс-салата после замачивания семян в разведении 1:100 суточных культур разных изолятов в течение 30 мин и инкубации при 25°C через 72 ч (над столбиками указано процентное отношение величины к контролю)



Рис. 5. Длина стебельков проростков кресс-салата после замачивания семян в разведении 1:1000 суточной культуры разных изолятов в течение 30 мин и инкубации при 25°C через 72 ч (над столбиками указано процентное отношение величины к контролю)

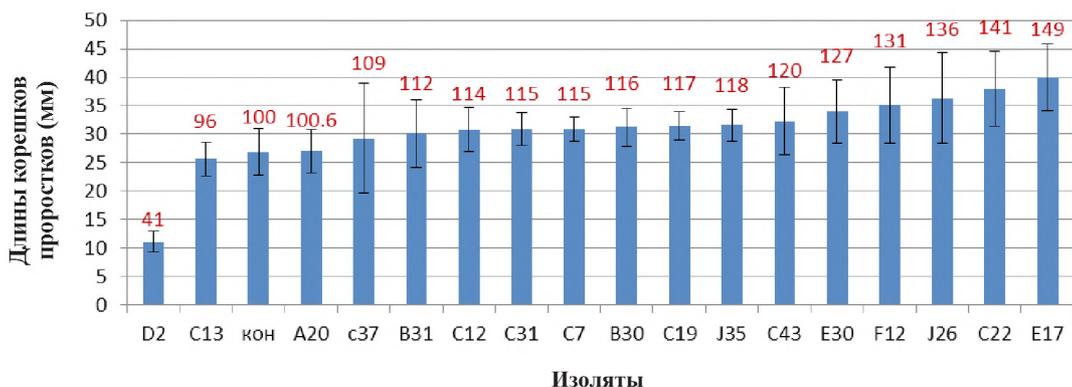


Рис. 6. Длины корешков проростков кресс-салата после замачивания семян в разведении 1:1000 суточной культуры разных изолятов в течение 30 мин и инкубации при 25°C через 72 ч (над столбиками указано процентное отношение величины к контролю)

Для проверки влияния полученных культур бактерий на растения в условиях модельного опыта мы отбирали изоляты, дававшие максимальный ростовой эффект. К этим изолятам относятся следующие: E17, C22 (максимальный ростовой эффект при концентрации 1:1000 на корешки — 141% и 149% от контроля); C43, F12 (максимальный эффект при концентрации 1:1000 на стебельки — 134% и 139% от контроля); J26 (максимальный эффект при концентрации 1:100 на корешки — 149% от контроля); C7, C19 (максимальный эффект при концентрации 1:100 на стебельки — 122% и 123% от контроля). Изоляты C7, C19, C22, C43 были выделены из ризопланы растений *Ipotoeet aquatica* L., а изоляты E17, F12, J26 — из ризопланы растений *Brassica integrifolia* L.

Влияние изолятов на растения огурца и разнолистной капусты в модельных опытах.

Поставленный нами модельный опыт с огурцом и разнолистной капустой позволил оценить способность разных изолятов к развитию в ризосфере растений и снабжению растений азотом. Морфологические показатели роста и развития растения дают визуальное представление о том, какие изоляты благоприятны для данного растения.

После 10 дней наблюдения, азотфиксирующая активность почти во всех сосудах с растениями огурца и разнолистной капусты, инокулированными исследуемыми изолятами, была низкой, и находилась на уровне предела обнаружения. Нитрогеназная активность могла быть измерена только после 20 дней опыта (рис. 7, 8). Также после завершения опыта измерялась азотфиксация на отобранных и отмытых корнях растений, помещенных в безазотную питательную среду Федорова-Калининской. Корреляции между активностью азотфиксации на растениях огурца и разнолистной капусты после 20 дней выращивания и на корнях этих растений после 40 дней выращивания не обнаружено.

На рисунке 7 показано, что в условиях модельного опыта инокуляция бактериями (субстрат стерилен, поэтому внесенные бактерии не конкурируют с бактериями в субстрате, а только с бактериями на семенах) оказала существенное воздействие

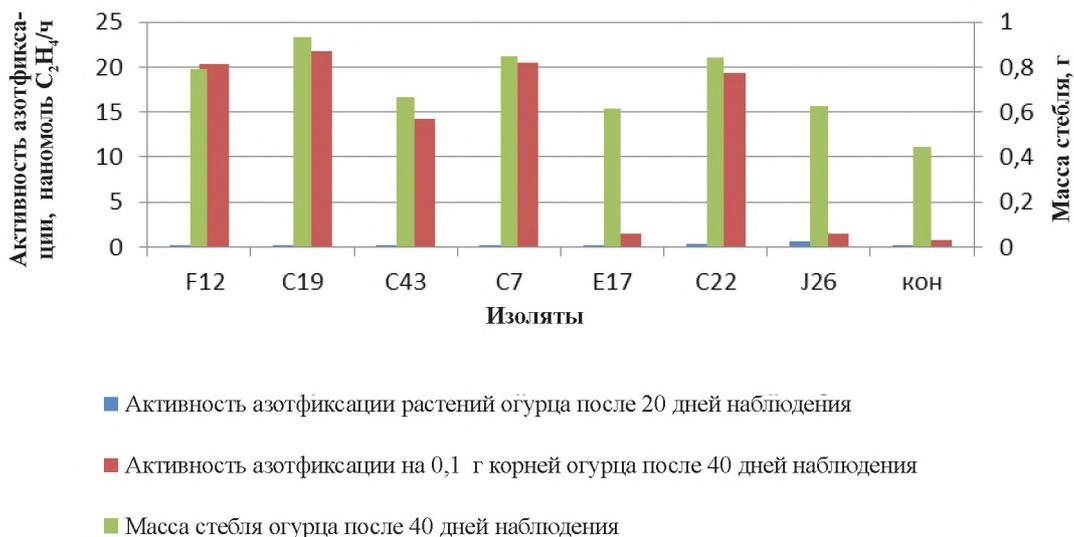


Рис. 7. Активность азотфиксации на растениях огурца

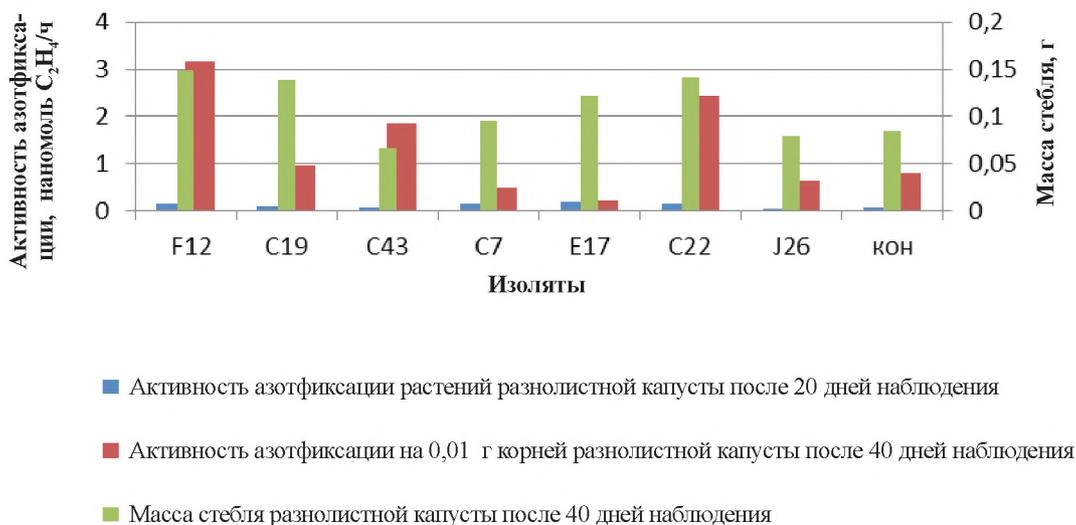


Рис. 8. Активность азотфиксации на растениях разнолистной капусты

на массу стеблей огурца. Для активности азотфиксации на растениях огурца после 20 дней выращивания не обнаружена корреляция с массой стебля огурца. Однако при увеличении азотфиксирующей способности на корнях огурца наблюдается увеличение массы стебля огурца (большой коэффициент корреляции $r=0,9$). В усло-

виях модельного опыта хорошее влияние на массу стебля огурца оказывала инокуляция следующими изолятами: С43 (150% от контроля), F12 (168% от контроля), С22 (179% от контроля), С7 (180% от контроля), С19 (186% от контроля). При инокуляции этими изолятами стимулирующий эффект заметен визуально. Данные изоляты были отобраны для дальнейших исследований, в частности вегетационного опыта с огурцом. Отмечено, что лучше всего влияют на массу стебля огурца изоляты, выделенные из ризопланы водяного шпината (за исключением изолята F12).

При увеличении азотфиксирующей активности на растениях после 20 дней выращивания наблюдается увеличение массы стебля (коэффициент корреляции $r=0,72$). Между активностью азотфиксации на корнях растений и массой стебля после 40 дней выращивания наблюдается слабая корреляция ($r=0,45$). Хорошее влияние на массу стебля оказали следующие изоляты: J26 (113% от контроля), E17 (146% от контроля), С19 (165% от контроля), С22 (167% от контроля), F12 (177% от контроля). Эти изоляты были выбраны для дальнейших вегетационных опытов с разнолистной капустой.

Таким образом, для дальнейшей работы были отобраны следующие изоляты: С43, С7, С22, С19, F12 — для вегетационного опыта с огурцом, и J26, E17, С19, С22, F12 — для вегетационного опыта с разнолистной капустой.

Выводы

1. Впервые проведено исследование ризопланы тропических овощных культур *Ipomoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L., что позволило выделить 227 изолятов ассоциативных азотфиксирующих бактерий.

2. Установлено, что уровень нитрогеназной активности у изучаемых культур колеблется в широких пределах (от 0,02 до 44,24 наномоль $C_2H_4/ч$). Самая высокая азотфиксация выявлена у культур, выделенных из ризопланы *Ipomoea aquatica* L.

3. Определена ростактивирующая способность ряда микробных культур, выделенных из ризопланы *Ipomoea aquatica* L. и *Brassica integrifolia* L. Наиболее активно стимулировали рост кресс-салата изоляты С7, С19, С22, С43, выделенные из ризопланы *Ipomoea aquatica* L., и изоляты E17, F12, J26, выделенные из ризопланы *Brassica integrifolia* L. Эти наиболее активные изоляты были отобраны для модельных опытов с огурцом и разнолистной капустой.

4. В условиях модельного опыта (стерильный субстрат), инокуляция изолятами оказывает хорошее влияние на массу стебля растения. Максимальное влияние отмечено для С19 на огурце (186% от контроля) и F12 на разнолистной капусте (177% от контроля). Из всех 227 протестированных изолятов для дальнейшей работы наиболее перспективными представляются следующие: С43, С7, С22, С19, F12 — для вегетационного опыта с огурцом, и J26, E17, С19, С22, F12 — для вегетационного опыта с разнолистной капустой.

Библиографический список

1. Гродзинский Л.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1964. 37 с.

2. Диль С.Т. Исследование регенерации *in vitro* на семядольных эксплантах *Brassica integrifolia* // Тез. докл. 61-ой студенческой науч. конф. им. Н.И. Вавилова секции «Генетика, селекция и биотехнология». Москва, 2008. С. 21.

3. Емцев В. Т. Ассоциативный симбиоз почвенных diaзотрофных бактерий и овощных культур // Почвоведение, 1994. № 4. С. 74-78.
4. Завалин А.А., Чистотин М.Ф., Кожемяков А.П. Эффективность инокуляции зерновых культур *Agrobacterium radiobacter* в зависимости от азотного удобрения, почвенных и метеорологических условий // Агрохимия. 2001. № 2. С. 31-35.
5. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии. М.: МГУ 1991. 356 с.
6. Непирусова А.П., Егорова А.А., Захарчук Л.А. и др. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 575 с.
7. Тихонович Л.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэкологического будущего. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2009.
8. Умаров А.А. Ассоциативная азотфиксация. М.: МГУ, 1986. 133 с.
9. Ladha J.K. Abstract book of a workshop: Steps toward nitrogen fixation in rice. Los Bacos: Laguna, 1999. 128 p.
10. Larson R. Selective colonization of the rhizosphere of wheat by nitrogen-fixing bacteria // Ecol. Bull., 1978. Vol. 26. P. 331-341.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ASSOCIATIVE BACTERIA ISOLATED FROM THE ROOT SURFACE OF SUCH VEGETABLE CROPS AS *IPOMOEA AQUATICA* L. AND *BRASSICA INTEGRIFOLIA* L. GROWN IN VIETNAM

T.M. PHUNG¹, V.T. EMTSEV¹, L.A. POZDNYAKOV², O.V. SELITSKAYA¹

(¹ Russian Timiryazev State Agrarian University;

² Lomonosov Moscow State University)

By the first time cultures of associative nitrogen-fixing bacteria of root surface of tropical vegetable crops of northern Vietnam were isolated. The study of nitrogenase activity of resulting isolates showed that about 227 isolated cultures have this capability, and many cultures were characterized by a fairly high level of nitrogen fixation. It was revealed that many cultures of associative bacteria have growth-stimulating ability in relation to crop.

*The objects of the current research were associative bacteria of root surface of 2 types of vegetable crops, grown under conditions of northern Vietnam: water spinach (*Ipomoea aquatica*) and heterophyllous cabbage (*Brassica integrifolia*), both previously had not been studied in such research. Plant roots were washed in sterile water and placed in vials with Fedorova-Kalinin nitrogen-free medium [6] to cultivate enrichment bacterial cultures. Their nitrogen fixation activity was determined by acetylene method at the Department of Soil Biology, Moscow State University. Pure cultures of bacteria were isolated on media DAS [4] and Ashby [6] from selected enrichment cultures, which have shown a high level of nitrogenase activity. Isolated pure cultures which are characterized by the highest nitrogen-fixing activity were tested to determine the ability to synthesize of growth-stimulating substances in the experiment with the observation of effects of these isolates on the growth of watercress. After that, model experiment was carried out on cucumber (*Cucumis sativus*) and heterophyllous cabbage (*Brassica integrifolia*). Cultivation of plants was performed in a climatic chamber for 40 days on 5 g of vermiculite with 15 ml of Pryanishnikov mixture solution [1]; control was not inoculated, whereas the other variants were inoculated with isolates, characterized by highest nitrogen-fixing ability and by the ability to activate plant growth. Analyses include the nitrogen-fixing activity of cultures in association with living plants estimated by acetylene method on the 10th and 20th days of observation; the nitrogen-fixing activity on plant roots after 40 days of*

obsen'ation and the measurement of height and weight of plant stem after 40 days of observation. Statistical processing was carried out with program Statistica 5.5.

The level of nitrogen-fixing activity of the studied isolates oscillates over a wide range (from 0.02 to 44.24 nmol C₂H₄/h). The highest nitrogenase activity was detected for cultures isolated from root surface of *Ipomoea aquatica*. Growth-activating ability was determined for some microbial cultures isolated from root surface *Ipomoea aquatica* and *Brasica integrifolia*. Isolates from *Ipomoea aquatica* root surface C7, C19, C22, C43 stimulate the growth of watercress most actively, and among the ones from root surface of *Brasica integrifolia* the same effect had such isolates as E1 7, F12, J26. These the most active isolates were selected for the model experiments with cucumber and cabbage heterophyllous. In this experiment on sterile substrate, the inoculation with any isolate has a good effect on the weight of the inoculated plants stem. The biggest effect was described for C19 to cucumber (186% of control) and F12 to heterophyllous cabbage (177% of the control).

Totally, the following isolates were selected: C43, C7, C22, C19, F12 for a pot experiment with cucumber, and J26, E1 7, C19, C22, F12 for a pot experiment with heterophyllous cabbage.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, associative bacteria, *Ipomoea aquatica*, *Brasica integrifolia*, growth-stimulating substance, nitrogenase activity, ability for stimulating of plant growth.

Фунг Тхи Ми — асп. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: phungthimy87@gmail.com).

Емцев Всеволод Тихонович — д. б. н., проф. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

Селицкая Ольга Валентиновна — к. б. н., доц., зав. кафедрой микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: selitskayaolga@gmail.com).

Поздняков Лев Анатольевич — к. б. н., инженер кафедры биологии почвы факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы; e-mail: apl-223@mail.ru).

Phung Thi Mi — PhD student of the department of microbiology and immunology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; e-mail: phungthiimy87@gmail.com).

Emtsev Vsevolod Tikhonovich — Doctor of Biological Sciences, professor of the department of microbiology and immunology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49).

Selitskaya Olga Valentinovna — PhD in Biology, associate professor, head of the department of microbiology and immunology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; e-mail: selitskayaolga@gmail.com).

Pozdnyakov Lev Anatolievich — PhD in Biology, engineer of the department of soil biology, Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1, constr. 12, e-mail: apl-223@mail.m).