

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Казахстан

² Институт микробиологии НАН Азербайджана, г. Баку, Азербайджан

*iesmirnova@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУРЫ СОИ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.03

Аннотация

Важной проблем аграрного сектора, требующей решения, является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для животноводства. Для решения этих задач необходимо увеличение производства высокобелковых бобовых культур и, прежде всего, сои. Для повышения урожайности сои применяют клубеньковые бактерии. Эти бактерии являются симбионтами, поставляющими растениям биологический азот, и тем самым, улучшая их азотное питание. Целью данного исследования было выделение клубеньковых бактерий, получение чистых культур, изучение их основных биологических свойств, отбор наиболее активных штаммов, перспективных для выращивания культуры сои. Из клубеньков растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана, было выделено 24 чистые культуры бактерий. Проведено изучение их основных культурально-морфологических и биохимических свойств, исследована нодулирующая и азотфиксирующая способности. В результате отобрано четыре высокоэффективных штамма клубеньковых бактерий, перспективных для выращивания культуры сои.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, соя, нодуляция, азотфиксация, высокоэффективные штаммы

Важной проблемой аграрного сектора является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для животноводства. Для решения этих задач необходимо увеличение производства высокобелковых зернобобовых культур и, прежде всего, сои [1]. Высокое содержание в зерне сои белка (до 45-48%) и масла (до 25 %) определяют её широкое применение [2-4]. Однако урожайность сои в Казахстане по сравнению с другими странами низкая. Так, если средняя урожайность сои в Бразилии и США составляет 3,3 т/га, в Канаде - 2,6 т/га, то в России - 1,4-1,6 т/га, а в Казахстане - не превышает 1,1-1,2 т/га [5]. Исходя из этого, поиск путей повышения урожайности этой культуры является весьма актуальным.

Для повышения урожайности сои применяются минеральные и биологические удобрения, но упор делается на биоудобрения. В состав биологических удобрений, как правило, входят симбиотические азотфиксирующие бактерии. Эти бактерии обитают в клубеньках на корнях сои, способны извлекать азот из воздуха и преобразуют его в форму, которую могут использовать растения. Одной из проблем низкой урожайности сои в Казахстане является то, что для повышения урожайности сои применяют, в основном, биопрепараты импортного происхождения, которые часто оказываются малоэффективными. Это обусловлено их низкой приживаемостью на корнях сои и не приспособленностью к почвенно-климатическим условиям. Целью данного исследования было выделение клубеньковых бактерий, получение чистых культур, изучение их основных биологических свойств, отбор наиболее активных штаммов, перспективных для выращивания культуры сои.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили бактерии, выделенные из клубеньков на корнях растений сои (*Glycine max* (L.) Merr.), собранных в Алматинской области Казахстана - основном регионе выращивания сои. Для выделения ризобий были отобраны здоровые и мощные растения сои с хорошо развитой коневой системой и многочисленными

клубеньками на корнях. От корня пинцетом отделяли крупные, розовые клубеньки и переносили в чашку Петри, где их разрезали скальпелем на части. Для выделения клубеньковых бактерий использовали питательную среду Мазе следующего состава, г/л: K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4$ - 0,3; сахароза - 10,0; отвар из 100 г гороха, pH 6,8-7,0. Небольшое количество содержимого клубенька переносили в 100 мкл стерильной воды, затем - на поверхность агаризованной среды Мазе в чашке Петри, размазывали шпателем и инкубировали при 25°C.

Для изучения способности образовывать клубеньки на корнях сои (нодуляция) бактерии выращивали на жидкой питательной среде Мазе при 180 об/мин, 28°C в течение 5 суток. В опытах использовали сою сорта «Эврика». Перед посевом семена обрабатывали суспензией бактерий с титром клеток 1×10^8 кл/мл в течение двух часов при комнатной температуре [6]. Затем семена высевали в вегетационные сосуды объемом 500 мл (три растения на сосуд). Для питания проростков применяли стерильный раствор Кноппа следующего состава, г/л: $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 1,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.25, KH_2PO_4 - 0.25, KCl - 0.12, $FeCl_3 \times 6 H_2O$ - 0.004, вода - 1000 мл. Все эксперименты были выполнены в пяти повторностях. Подсчет количества и средней массы клубеньков проводили после 30-и дней выращивания.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 B” (США) с пламенно-ионизационным детектором [7,8].

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства ризобий изучали по стандартным методикам [9].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [10].

Результаты и обсуждение

Выделение бактерий проводили из клубеньков на корнях сои, собранной на полях Алматинской области Казахстана. Для выделения ризобий были отобраны растения с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. В общей сложности было собрано 67 растений сои.

В лабораторных условиях из клубеньков на корнях сои было проведено выделение ризобий на питательной агаризованной среде Мазе. Засеянные чашки Петри инкубировали в термостате при 25°C. Появление колоний на 1-2-е сутки свидетельствовало о загрязнении культуры. Быстрорастущие ризобии появлялись на 3-4, медленно растущие - на 7-9 сутки (рисунок 1).

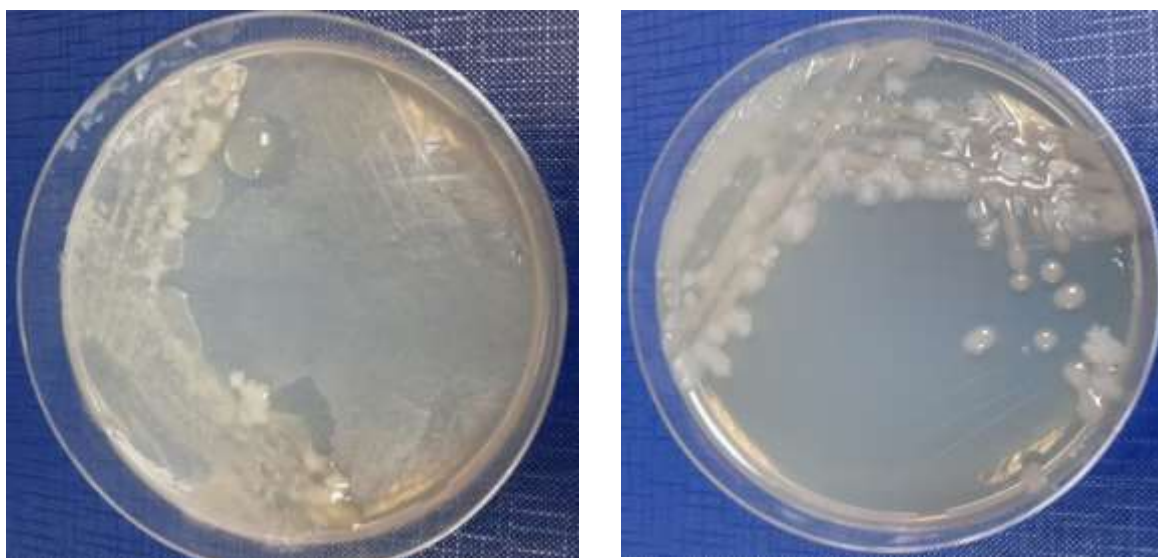


Рисунок 1 - Выделение клубеньковых бактерий на агаризованной среде Мазе

Чистоту культур клубеньковых бактерий проверяли визуально и под микроскопом. Микроскопический контроль проводился с препаратами живых и фиксированных окрашенных клеток с помощью светового микроскопа. В результате проведенной работы было выделено 24 чистые культуры клубеньковых бактерий.

Исследование культурально-морфологических свойств бактерий показало, что при росте на питательной среде Мазе бактерии образовывали бесцветные или молочно-белые слизистые колонии. Исследование морфологии ризобий показало, что все выделенные культуры были граммотрицательные, не образовывали спор и имели палочковидную форму клеток. При просмотре под микроскопом препаратов живых клеток бактерий отмечали их высокую подвижность. Установлено, что клетки бактерий мелкие, полиморфные и с течением времени принимают округлую форму. На фиксированных окрашенных препаратах четко просматривалась зернистость внутреннего содержания клеток клубеньковых бактерий.

Исследование основных физиолого-биохимических свойств бактерий показало, что выделенные бактерии относятся к аэробам, не растут на мясопептонных средах и других белковых субстратах животного происхождения, рост на безазотистой среде Эшби слабый. Установлено, что штаммы бактерий слабо утилизируют сахара, желатину не разжижают и крахмал не разлагают. По основным культурально-морфологическим и биохимическим свойствам бактерии отнесены к двум родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*.

Известно, что не все клубеньковые бактерии способны образовывать клубеньки на корнях растений сои. В этой связи, было проведено изучение способности выделенных бактерий к нодуляции и фиксации азота воздуха. Наличие этих свойств у бактерий является основанием для их дальнейшего использования при разработке биоудобрения для культуры сои. В таблице представлены результаты семи штаммов, показавших наиболее высокие результаты.

Таблица - Нодулирующая способность и нитрогеназная активность штаммов ризобий

Штаммы	Количество клубеньков на растение, шт.	Сухой вес клубеньков, мг/растение	Нитрогеназная активность, $\mu\text{моль C}_2\text{H}_4/\text{мл/ч}$
Контроль	0	0	-
МА-1	12,8 $\pm$ 0,1	128,3 $\pm$ 1,3	3,87 $\pm$ 0,02
Н-2	14,6 $\pm$ 0,2	130,2 $\pm$ 1,2	2,32 $\pm$ 0,01
Н-3	12,1 $\pm$ 0,1	142,2 $\pm$ 1,0	5,25 $\pm$ 0,02
Н-4	17,8 $\pm$ 0,2	147,5 $\pm$ 1,2	6,65 $\pm$ 0,01
Н-6	18,2 $\pm$ 0,2	153,2 $\pm$ 2,2	6,71 $\pm$ 0,01
Н-7	18,4 $\pm$ 0,1	158,5 $\pm$ 2,1	6,74 $\pm$ 0,01
Н-8	17,3 $\pm$ 0,1	148,4 $\pm$ 2,0	6,34 $\pm$ 0,02
Примечание: $p < 0,05$			

Из данных таблицы следует, что штаммы ризобий активно образовывали клубеньки на корнях сои и фиксировали азот воздуха. Отмечено, что во всех вариантах опыта клубеньки были розовыми, что свидетельствует об активной фиксации азота атмосферы, так как розовый цвет клубеньков свидетельствует о наличии леггемоглобина, который контролирует поток кислорода к бактериям. Также показано, что по истечении 30 суток роста сои в вариантах со штаммами МА-1, Н-2, Н-3 количество клубеньков на одно растение составляло 12-14 штук, а в вариантах со штаммами Н-4, Н-6, Н-7, Н-8 оно было большим и в среднем составляло 17-18 штук на растение. Отмечено, что в этих вариантах клубеньки были более крупными и темно-розовыми. Появление клубеньков в этих вариантах было на 12,5% раньше, чем в вариантах со штаммами МА-1, Н-2, Н-3. Также установлено, что азотфиксирующая активность менялась в зависимости от штамма бактерий. Показано, что

азотфиксирующая активность штаммов Н-4, Н-6, Н-7, Н-8 была выше, чем у штаммов МА-1, Н-2, Н-3 (таблица 1).

Заключение

Таким образом, проведено выделение бактерий из клубеньков растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана. Для выделения бактерий было собрано 67 растений сои с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. В лабораторных условиях из клубеньков сои на питательной среде Мазе были выделены бактерии, проведена их очистка и получены 24 чистые культуры. Изучены их основные культурально-морфологические и биохимические свойства и показано, что бактерии относятся к двум родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*. Проведено исследование способности штаммов бактерий образовывать клубеньки на корнях сои и изучена их азотфиксирующая активность. По результатам исследований отобрано четыре наиболее активных штамма бактерий (Н-4, Н-6, Н-7 и Н-8). Установлено, что в вариантах опытов с этими штаммами, клубеньки на корнях сои были более крупными и темно-розовыми, что свидетельствует о высоком содержании леггемоглобина, который контролирует приток кислорода к бактериям. Также отмечено, что появление клубеньков на корнях сои в этих вариантах было на 12,5% раньше, чем в других вариантах. Таким образом, отобрано четыре высокоэффективных штамма клубеньковых бактерий, перспективных для создания биоудобрения для выращивания культуры сои.

Выделенные штаммы бактерий адаптированы к почвенно-климатическим условиям юго-восточного региона Казахстана и обладают высокой приживаемостью на корнях местных сортов сои, что позволит при использовании биоудобрения избежать конкуренции с почвенной микрофлорой.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP09259080.

Литература:

- 1 Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M., Woźniak A. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems // International journal of plant production. 2020. vol. 14. P. 475-485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- 2 Wijewardana C., Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. Food Chemistry. 2019. vol. 278. P. 92-100. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.035.
- 3 Guan X., Zhong X., Lu Y., Du X., Jia R., Li H., Zhang M. Changes of soybean protein during tofu processing. Foods. 2021. Vol. 10. P. 1594. <https://doi.org/10.3390/foods10071594>.
- 4 de Waroux Y.P., Garrett R.D., Graesser J., Nolte C., White C., Lambinad E.F. The restructuring of South American soy and beef production and trade under changing environmental regulations. World Development. 2019. vol. 121. P. 188-202. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.05.034>.
- 5 Global Market Analysis, FAS, USDA. World Agricultural Production. Washington: FAS, 2021. 42 p. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>.
- 6 Ying Liu, Xiaopeng Li, Xiaohao Li, Kaizhe Liu, Gangshun Rao, Yingbin Xue. Optimization of aseptic germination system of seeds in soybean (*Glycine max* L.). Journal of Physics. 2020. ID 1637. e012077. doi: 10.1088/1742-6596/1637/1/012077.
- 7 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. Methods X. 2018. Vol. 5. P. 909-914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- 8 Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. Indian Journal of Biotechnology. 2015. Vol. 14. P. 221-227.
- 9 Ившина И.Б. Большой практикум «Микробиология». СПб.: Проспект Науки, 2019. 112 с.
- 10 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Hotline-Telecom, 2016. 288 с.

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ЖШС «Микробиология и вирусология ГОО», Алматы қ., Қазақстан

² Әзербайжан Ұлттық ғылым академиясының Микробиология институты, Баку, Әзірбайжан
*iesmirnova@mail.ru

СОЯ ДАҚЫЛДАРЫН ПЕРСПЕКТИВТІ ӨСІРУ ҮШІН ТҮЙНЕК БАКТЕРИЯЛАРДЫ БӨЛІП АЛУ

Түйін

Аграрлық сектордың шешуді қажет ететін маңызды мәселесі – адам тамақтанатын ақуыздың жетіспеуі және малға жем-шөптің тапшылығы. Бұл мәселелерді шешу үшін ақуызы жоғары бұршақ дақылдарын және ең алдымен соя дақылдарын өндіруді арттыру қажет. Сояны өсіру кезінде оның өнімін арттыру үшін түйнек бактериялар қолданылады. Бұл бактериялар симбионттар болып табылады, олар өсімдіктерді биологиялық азотпен қамтамасыз етеді және сол арқылы олардың азотпен қоректенуін жақсартады. Бұл зерттеудің мақсаты түйінді бактерияларды бөліп алу, таза дақылдарды алу, олардың негізгі биологиялық қасиеттерін зерттеу және соя өсіруге перспективті ең белсенді штамдарды таңдау болды. Қазақстанның Алматы облысының егіс алқаптарынан жиналған соя өсімдіктерінің түйіндерінен бактериялардың 24 таза штамдары бөлініп алынды. Олардың негізгі культуралық-морфологиялық және биохимиялық қасиеттері зерттелді, олардың нодулдік және азотты бекіту қабілеттері зерттелді. Нәтижесінде соя өсіру үшін перспективті төрт тиімділігі жоғары түйнек бактерия штамдары таңдалды.

Кілтті сөздер: түйнек бактериялар, соя, нодуляция, азотфиксация, тиімділігі жоғары штамдар

IRSTI 34.27.17

I.E. SMIRNOVA^{1*}, Sh.A. BABAEVA², E.R. FAYZULINA¹,
L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOV¹

¹ LLC “Research and Production Center for Microbiology and Virology”, Almaty

² Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan
*iesmirnova@mail.ru

ISOLATION OF RHIZOBIA, PROMISING FOR SOYBEAN PRODUCTIVITY

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.03

Summary

An important problem of the agricultural sector that needs to be addressed is the lack of protein in human nutrition and fodder for livestock. To solve these problems, it is necessary to increase the production of high-protein legumes and, above all, soybeans. When growing soybeans, nodule bacteria are used to increase its yield. These bacteria are symbionts, they fix nitrogen, and thus improve the nitrogen nutrition of plants. The purpose of this study was to isolate rhizobia, obtain pure cultures, study their basic biological properties, and select the most active strains that are promising for soybean cultivation. From nodules of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan, 24 pure cultures of rhizobia were isolated. Their basic cultural-morphological and biochemical properties were studied, their nodulation and nitrogen-fixing abilities were studied. As a result, four highly effective strains of rhizobia were selected that are promising for growing soybeans.

Keywords: rhizobia, soybean, nodulation, nitrogen fixation, highly effective strains

An important problem of the agricultural sector is the lack of protein in human nutrition and the lack of fodder for livestock. To solve these problems, it is necessary to increase the production of high-protein leguminous crops and, above all, soybeans [1]. The high content of protein (up to 45-48%) and oil (up to 25%) in soybean grain determines its widespread use [2-4]. However,

soybean yields in Kazakhstan are low compared to other countries. So, if the average soybean yield in Brazil and the USA is 3.3 t/ha, in Canada - 2.6 t/ha, in Russia - 1.4-1.6 t/g, and in Kazakhstan - does not exceed 1.1-1.2 t/ha [5]. At the same time, soybean grain is characterized by low quality indicators. Based on this, the search for ways to increase the yield of this crop is very relevant.

To increase the yield of soybeans, mineral and biological fertilizers are used, but the emphasis is on biofertilizers. The composition of biological fertilizers, as a rule, includes symbiotic nitrogen-fixing bacteria. These bacteria live in soybean root nodules and are able to extract nitrogen from the air and convert it into a form that plants can use. One of the problems of low soybean yields in Kazakhstan is that to increase soybean yields, mainly biological preparations of imported origin are used, which often turn out to be ineffective. This is due to their low survival rate on soybean roots and their inability to adapt to soil and climatic conditions. The purpose of this study was to isolate nodule bacteria, obtain pure cultures, study their basic biological properties, and select the most active strains that are promising for growing soybeans.

Materials and methods of research

The objects of the study were bacteria isolated from nodules on the roots of soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.), collected in the Almaty region of Kazakhstan - the main region of soybean cultivation. For the isolation of rhizobia, healthy and powerful soybean plants with a well-developed root system and numerous nodules on the roots were selected. Large, pink nodules were separated from the root with tweezers and transferred to a Petri dish, where they were cut into pieces with a scalpel. To isolate nodule bacteria, a Maze nutrient medium was used, with the following composition, g/l: K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4$ - 0,3; sucrose - 10,0; decoction of 100 g of peas, pH 6,8-7,0. A small amount of nodule content was transferred into 100 μ l of sterile water, then onto the surface of Maze agar medium in a Petri dish, smeared with a spatula, and incubated at 25°C.

To study the ability to form nodules on soybean roots (nodulation), bacteria were grown on liquid Maze medium at 180 rpm, 28°C for 5 days. In the experiments, we used soybeans of the Evrika variety. Before sowing, the seeds were treated with a suspension of bacteria with a cell titer of 1×10^8 cells/ml for two hours at room temperature [6]. Then they were sown in 500 ml vegetation vessels (three plants per vessel). To feed the seedlings, a sterile Knopp solution was used, with the following composition, g/l: $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 1,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.25, KH_2PO_4 - 0.25, KCl - 0.12, $FeCl_3 \times 6 H_2O$ - 0.004, water - 1000 мл. All experiments were performed in five repetitions. The number and average weight of nodules were counted after 30 days of cultivation.

The nitrogenase activity of bacteria was determined by the acetylene method on an Agilent Technology 7890 B gas chromatograph (USA) with a flame ionization detector [7,8].

The cultural-morphological and physiological-biochemical properties of rhizobia were studied according to standard methods [9].

Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 10.0 software package [10].

Research results and discussion

Bacteria were isolated from nodules on soybean roots collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. For the isolation of rhizobia, plants with a well-developed root system and a large number of nodules on the roots were selected. A total of 67 soybean plants were collected.

Under laboratory conditions, rhizobia were isolated from nodules on soybean roots on a nutrient agar medium Maze. The seeded Petri dishes were incubated in a thermostat at 25°C. The appearance of colonies on the 1st-2nd day testified to the contamination of the culture. Fast-growing rhizobia appeared on days 3-4, slow-growing ones - on days 7-9 (Figure 1).

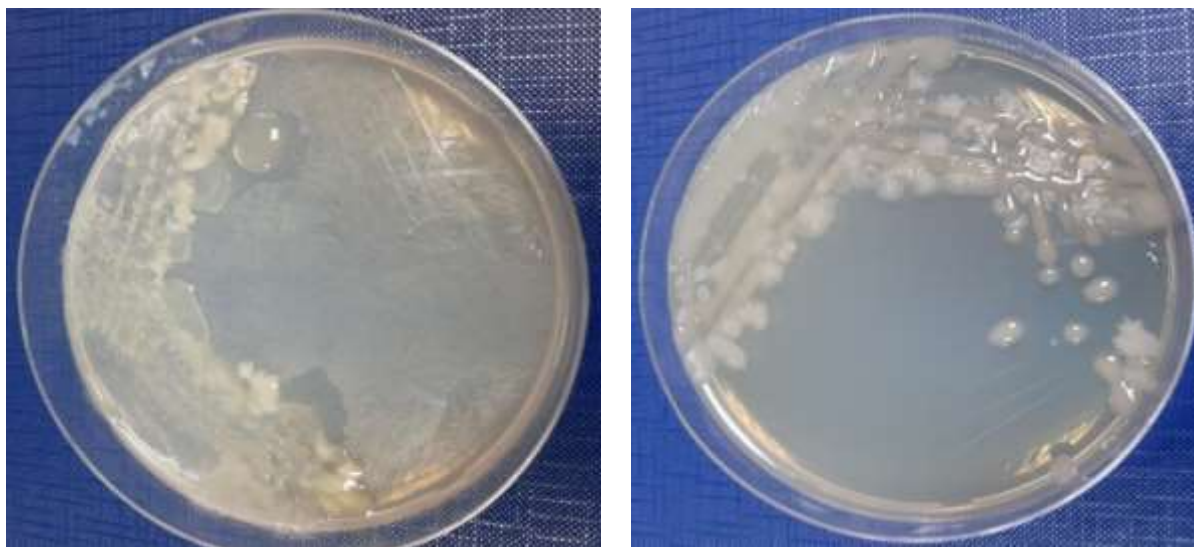


Figure 1 - Isolation of nodule bacteria on Maze agar medium

The purity of nodule bacteria cultures was checked visually and under a microscope. Microscopic control was carried out with preparations of live and fixed stained cells using a light microscope. As a result of the work carried out, 24 pure cultures of nodule bacteria were isolated.

The study of the cultural and morphological properties of bacteria showed that when growing on Maze's medium, the bacteria formed colorless or milky-white mucous colonies. A study of the morphology of rhizobia showed that all isolated cultures were gram-negative, did not form spores, and had a rod-shaped cell shape. When viewing preparations of living bacterial cells under a microscope, their high mobility was noted. It was found that bacterial cells were small, polymorphic, and over time the cells took on a rounded shape. On fixed stained preparations, the granularity of the internal content of nodule bacteria cells was clearly visible.

The study of the basic physiological and biochemical properties of bacteria showed that the isolated bacteria belong to aerobes, do not grow on meat-peptone media and other protein substrates of animal origin, growth on a nitrogen-free Ashby medium is weak. It has been established that bacterial strains poorly utilize sugars, do not liquefy gelatin, and do not decompose starch. According to the main cultural, morphological and biochemical properties, the bacteria were assigned to two genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*.

It is known that not all nodule bacteria are able to form nodules on the roots of soybean plants. In this regard, the ability of isolated bacteria to nodulation and fix air nitrogen was studied. The presence of these properties in bacteria is the basis for their further use in the development of biofertilizers for soybeans. Table presents the results of the seven strains that showed the highest results.

Table - Nodulation and nitrogenase activity of rhizobia strains

Strains	Number of nodules per plant, pcs.	Nodule dry weight, mg/plant	Nitrogenase activity, $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{ml/h}$
Control	0	0	-
MA-1	12,8 $\pm$ 0,1	128,3 $\pm$ 1,3	3,87 $\pm$ 0,02
H-2	14,6 $\pm$ 0,2	130,2 $\pm$ 1,2	2,32 $\pm$ 0,01
H-3	12,1 $\pm$ 0,1	142,2 $\pm$ 1,0	5,25 $\pm$ 0,02
H-4	17,8 $\pm$ 0,2	147,5 $\pm$ 1,2	6,65 $\pm$ 0,01
H-6	18,2 $\pm$ 0,2	153,2 $\pm$ 2,2	6,71 $\pm$ 0,01
H-7	18,4 $\pm$ 0,1	158,5 $\pm$ 2,1	6,74 $\pm$ 0,01
H-8	17,3 $\pm$ 0,1	148,4 $\pm$ 2,0	6,34 $\pm$ 0,02

Note: $p < 0,05$

Cont.

It follows from the data in Table 1 that rhizobia strains actively formed nodules on soybean roots and fixed air nitrogen. It was noted that in all variants of the experiment, the nodules were pink, which indicates the active fixation of atmospheric nitrogen, since the pink color of the nodules indicates the presence of leghemoglobin, which controls the oxygen flow to the bacteria. It was also shown that after 30 days of soybean growth, in variants with strains MA-1, H-2, H-3, the number of nodules per plant was 12-14 pieces, and in variants with strains H-4, H-6, H-7, H-8 it was large and averaged 17-18 pieces per plant. It was noted that in these variants the nodules were larger and dark pink, and the appearance of nodules in these variants was 12.5% earlier than in the variants with strains MA-1, H-2, H-3. Also, it was found that nitrogen-fixing activity varied depending on the bacterial strain. It was shown that the nitrogen-fixing activity of strains H-4, H-6, H-7, H-8 was higher than that of strains MA-1, H-2, H-3 (table 1).

Conclusion

Thus, rhizobia were isolated from nodules of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. To isolate bacteria, 67 soybean plants with a well-developed root system and a large number of root nodules were collected. Under laboratory conditions, bacteria were isolated from soybean nodules on the Maze medium, they were purified, and 24 pure cultures were obtained. Their main cultural, morphological and biochemical properties have been studied and it has been shown that the bacteria belong to two genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. The ability of bacterial strains to form nodules on soybean roots was studied and their nitrogen-fixing activity was studied. According to the research results, four most active strains of bacteria (H-4, H-6, H-7 and H-8) were selected. It was found that in the variants of experiments with these strains, nodules on soybean roots were larger and dark pink, which indicates a high content of leghemoglobin, which controls the flow of oxygen to bacteria. It was also noted that the appearance of nodules on soybean roots in these variants was 12.5% earlier than in other variants. Thus, four highly effective strains of nodule bacteria were selected that are promising for growing soybeans.

Based on these strains, it is possible to create a biofertilizer. The isolated bacterial strains are adapted to the soil and climatic conditions of the southeastern region of Kazakhstan, and their use will allow avoiding competition with soil microflora. Also, the selected strains have a high survival rate on the roots of local soybean varieties.

The study was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of the grant project AP09259080.

References

- 1 Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M., Woźniak A. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems // International journal of plant production. 2020. vol. 14. P. 475-485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- 2 Wijewardana C, Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. Food Chemistry. 2019. vol. 278. P. 92-100. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.035.
- 3 Guan X., Zhong X., Lu Y., Du X., Jia R., Li H., Zhang M. Changes of soybean protein during tofu processing. Foods. 2021. Vol. 10. P. 1594. <https://doi.org/10.3390/foods10071594>.
- 4 de Waroux Y.P, Garrett R.D., Graesser J., Nolte C., White C, Lambinad E.F. The restructuring of South American soy and beef production and trade under changing environmental regulations. World Development. 2019. vol. 121. P. 188-202. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.05.034>.
- 5 Global Market Analysis, FAS, USDA. World Agricultural Production. Washington: FAS, 2021. 42 p. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>.
- 6 Ying Liu, Xiaopeng Li, Xiaohao Li, Kaizhe Liu, Gangshun Rao, Yingbin Xue. Optimization of aseptic germination system of seeds in soybean (*Glycine max* L.). Journal of Physics. 2020. ID 1637. e012077. doi: 10.1088/1742-6596/1637/1/012077.

- 7 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *Methods X*. 2018. Vol. 5. P. 909-914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- 8 Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. *Indian Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 14. R. 221-227.
- 9 Ivshina I.B. Bol'shoj praktikum «Mikrobiologiya». SPb.: Prospekt Nauki, 2019. 112 s.
- 10 Borovikov V.P. Populyarnoe vvedenie v sovremennyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA. M.: Hotline-Telecom, 2016. 288 c.