

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно - к микробиологическим средствам повышения урожая бобовых культур и представляет собой новый штамм *Rh.lupini* 387 а, предназначенный для промышленного изготовления бактериального препарата клубеньковых бактерий - ризо-торфина под люпин.

Известен штамм *R.lupini* 372 - активный симбиотический азотфиксатор, однако он имеет низкую конкурентоспособность -50% против 84% у штамма 363 а [Кожемяков А.П., Доросинский Л.М. Эффективность использования препаратов азотфиксирующих микроорганизмов в сельском хозяйстве. - В сб.:Труды ВНИИСХМ. Л., 1989, т. 59, с.5-13].

Известен штамм *R.lupini* 371 а, использование которого для инокуляции семян люпина способствует повышению урожая зеленой массы на 8,4-14,3 ц/га и зерна на 0,3-1,0 ц/га, что соответствует 2,3-5,2% и 2,0-4,4% по сравнению с урожаем, полученным при использовании шт. 363 а [Авт.св. № 640988, кл. С 05 F 11/08, 1979].

Наиболее близким по симбиотическим и технологическим признакам к предлагаемому штамму является штамм *R.lupini* 363а, который с 1981 года является производственным штаммом. Инокуляция семян люпина этим штаммом увеличивает урожай зеленой массы по сравнению с неинокулированным контролем на 46,9 ц/га, то есть на 15,7% повышает урожай зерна на 2,1 ц/га и содержание протеина - на 2,9%, что составляет 128 кг/га [Берестецкий О.А., Доросинский Л.М., Кожемяков А.П. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в Географической сети опытов. // Известия АН СССР, Сер. биол., 1987, № 1, с. 670-679]. Данный штамм выбран авторами в качестве прототипа.

Недостатком известного штамма является неспособность образовывать клубеньки при пониженных плюсовых температурах, недостаточно высокая азотфиксирующая активность и низкая эффективность при бактериализации семян люпина этим штаммом.

Задачей изобретения является создание бактериального удобрения под люпин на основе нового штамма клубеньковых бактерий *R.lupini* 387а, который имеет высокую азотфиксирующую активность и образует клубеньки при пониженных плюсовых температурах, что позволяет продлить период активной азотфиксации, увеличить урожай люпина за счет экологически чистого симбиотического питания.

Штамм *R.lupini* № 387 а получен в отделе симбиотической азотфиксации Института физиологии растений и генетики АН Украины в 1986 г. методом экспериментальной селекции при использовании низких положительных температур как селектирующего фактора.

Полученный нами штамм клубеньковых бактерий люпина депонирован в национальной коллекции клубеньковых бактерий Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии под номером 387 а в группе азотфиксирующих микроорганизмов.

Штамм клубеньковых бактерий люпина 387 а характеризуется следующими культурально-морфологическими признаками.

Культура бактерий неспороносная, граммотрицательная, подвижная, перитрихи, имеет форму мелких палочек размером 0,5х1,0 мкм.

На маннитно-дрожжевом агаре (МДА) г/л-дрожжевой экстракт - 1, маннит - 10, агар 15-20,  $K_2HPO_4$  - 0,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2, NaCl - 0,1, дистиллированная вода - 1,0 л, pH 7,0) при посеве штрихом на 10 сутки колонии имеют круглую форму, выпуклые, блестящие, беловатые, слизистые, размер 3-5 мм.

На жидкой среде Норриса (на 1 л:  $K_2HPO_4$  - 0,5 мг,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,8 г, NaCl - 0,2 г,  $FeCl_3$  - 0,1 г, маннит 10 г, дрожжевой экстракт -1,0 г) используют арабинозу, глюкозу и маннит, но не вызывают брожения мальтозы и сахарозы.

На бобовом агаре (г/л - фасоль белая -100,0, NaCl - 1,0, сахароза - 20, агар - 20,  $H_2O$  - 1 л, pH 4 6,8-7,0) штрих обильный, блестящий. Колонии на 8-10 день достигают 3 мм, круглые по форме, гладкие блестящие с ровным краем. На 12-14 день колонии увеличиваются до 8-10 мм, образуя большое количество слизи.

На синтетической среде 79 (г/л -  $K_2HPO_4$  - 0,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2, NaCl - 0,1,  $CaCO_3$  ~ следы, маннит - 10, pH 4 7,2, агар -17,0, дистиллированная вода до 1 л) штрих обильный белый, блестящий. Колонии круглые, белые, выпуклые, блестящие на 10-12-й день - растут. На МПА и МПБ не растут.

Физиолого-биохимические признаки: аэроб. Температурный диапазон 8-28°C. Оптимальная температура роста 18-26°C. Оптимум pH - 6,8-7,2. Желатину не разжижают. Молоко с лакмусом подщелачивают, но не пептонизируют, Нитраты редуцируют до нитритов, используют соли аммония и мочевины. Сероводород не выделяют. На среде Норриса окисляют почти все сахара: арабинозу, глюкозу, маннит, лактозу, галактозу, сорбит, но не сбраживают мальтозу и сахарозу.

Генетические особенности: прототроф, стойкий к ряду антибиотиков - стрептомицину, карбеницилину, канамицину.

Штамм 387 а идентифицирован по определителю Берги (1974), как штамм *Rhizobium lupini*.

В отличие от штамма-прототипа *R.lupini* № а может расти на маннитнодрожжевом агаре при пониженных плюсовых температурах - 8-10°C, образовывать клубеньки на 6-10 дней раньше, чем штамм прототип, а также имеет более высокую азотфиксирующую способность и эффективность (увеличивает урожай зеленой массы на 19,7%, зерна - на 14,8% и содержание белка - на 2-4%).

Предлагаемый штамм *R.lupini* 387 а испытан межведомственной комиссией в Географической сети опытов и на протяжении всего этого времени сохраняет культурально-морфологические, физиолого-биохимические и симбиотические признаки.

Пример 1. Исходным материалом для получения штамма № 387а служил активный штамм клубеньковых бактерий люпина 363а. Клубеньковые бактерии адаптировали к пониженным плюсовым температурам (10-15°C) путем высева на МДА в течение 21-го дня и проводили 3-4 таких пассажа. Из выросшей культуры готовили водную суспензию (1 млрд в 1 мл) рассевали на питательную среду в чашки Петри и помещали в холодильную камеру. Посевы инкубировали 17-21 дней при температуре 8-10°C. Было проведено последовательно 10 таких пассажей с последующим инкубированием в тех же условиях. Затем отбирали максимальные по величине колонии, которые размножали и в дальнейшем использовали для проверки симбиотических свойств при инокуляции семян люпина,

Температурный режим, время инкубирования и количество пассажей подобрали экспериментально, как наиболее эффективные для получения клубеньковых бактерий, растущих при пониженных плюсовых температурах.

Для дальнейшей работы был отобран клон предлагаемого штамма 387 а.

Пример 2. Эффективность предлагаемого штамма проверяли в течение 1987 -1990 гг. в условиях вегетационных опытов, которые проводили на речном промытом песке или почве (луговой чернозем) с добавлением смеси Гельригеля с 0,2 нормами азота. В опытах использовали сосуды Вагнера емкостью 11 кг. Семена люпина с. Копыловский перед посевом стерилизовали 80% этиловым спиртом, затем промывали стерильной водой и инокулировали стандартным и предлагаемым штаммами. Опыты проводили в 6-кратной повторности. Семена контрольных (прототип) и опытных предлагаемый штамм растений инокулировали 1 млрд суспензий клеток клубеньковых бактерий, приготовленной путем смыва 21-суточной культуры ризобий стерильной водой по общепринятой методике. Стерильные семена выдерживали в суспензии в течение 2-х часов и высевали в вегетационные сосуды. В опытах изучали симбиотическую азотфиксацию, которую определяли по редукции ацетилена в этилен, массу растений, (Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation : laboratory and field evaluation.-Pland Physiol., 1968, 43, № 8, p. 1185-1207) время образования клубеньков при температуре 8\* 10°C и урожай семян люпина на сосуд. Опыты проводили в камере ВКШ при температуре выращивания 8г15°C (8°C -ночью и 15°C - днем) и в вегетационном домике. Абсолютным контролем служили не инокулированные растения.

Из табл. 2 и 3 видно, что предлагаемый штамм 387а отличается от штамма-прототипа более ранним образованием клубеньков, повышенной азотфиксацией и эффективностью. При инокуляции предлагаемым штаммом клубеньки на корнях люпина образовались на 5-9 дней раньше, чем при обработке штаммом-прототипом. В связи с более ранним образованием и функционированием клубеньков происходит увеличение активной азотфиксации. Более того, азотфиксирующая активность клубеньков люпина при инокуляции предлагаемым штаммом в 1,7-2 раза выше, чем у штамма-прототипа. В связи с этим, при инокуляции предлагаемым штаммом урожай зерна и зеленой массы увеличивается соответственно на 16% и 13% против штамма-прототипа.

Пример 3. Эффективность предлагаемого штамма и штамма-прототипа проверяли в полевых условиях в течение 1988-1992 гг.

Для этого предлагаемый штамм № 387 а выращивали на питательной среде МДА при 8-10°C в пробирках в течение 18-21 суток, затем смывали стерильной водой с агара и готовили густую суспензию, которой засеивали матрасы с МДА (объем 1,5 л), инкубировали 8-10 дней при температуре 26°C. После инкубации культуру смывали 50 мл стерильной воды и вводили инокулят шприцом в стерильный торф (200 г/га) и хорошо перемешивали. Приготовленный таким образом ризоторфин помещали в термостат при температуре 26°C на 3- дней. После термостатирования проверяли титр ризобий, который составил 3 -10<sup>8</sup> клеток на 1 г торфа и инокулировали семена люпина. Для этого, гектарную норму семян увлажняли (1-2% от веса семян), равномерно перемешивали с ризоторфином, приготовленным на предлагаемом и коммерческом (363а) штамме, который служил прототипом, подсушивали семена в тени и высевали в почву.

Полевые опыты проводили в хозяйствах, расположенных в зоне лесостепи Украины (с. Глеваха, Васильковского района Киевской области, 1988 г.), Полесья (Волинская область, Любашивский район) и Прикарпатья (Львовской области, Ивано-Франковской области). Абсолютным контролем был вариант без инокуляции.

Полевые опыты проводили в 4-х кратной повторности, учетная площадь делянки - 4-6 м<sup>2</sup>, в производственном опыте - 2 га. Растения люпина желтого с. Союз и Припятский высевали в севообороте после сахарной свеклы. Удобрения и пестициды не вносили.

В полевом опыте 1988 г. с люпином с. Союз выявлено увеличение нитрогеназной активности клубеньков люпина при инокуляции предлагаемым штаммом 387а на 2 мкМ С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub> г/час против штамма-прототипа, что способствует повышению урожая зеленой массы на 38% против абсолютного контроля, и на 19,7% - по сравнению со штаммом-прототипом (табл. 3).

В производственном опыте (Волинская область, Любашивский район, 1990 г.) на учетных опытных делянках (2 га) фенологические наблюдения свидетельствовали о том, что растения люпина с. Припятский всходят дружнее, зацветают на 4-7 дней раньше, бобики наливаются и созревают дружнее, чем при инокуляции штаммом-прототипом. Масса клубеньков при обработке предлагаемым штаммом в 2,2-1,5 раз больше чем при инокуляции штаммом-прототипом. В связи с более ранним образованием и функционированием клубеньков происходит увеличение периода активной азотфиксации до 85-90 дней. Это способствует увеличению урожая семян люпина сорта Припятский на 34% против абсолютного контроля и на 19% по сравнению со штаммом-прототипом (табл. А).

Предлагаемый штамм 387а испытывался в течение 3-х лет в Географической сети при ВМИИСХМ. Штамм Rhizobium lupini 387а рекомендован Межведомственной комиссией Географической сети опытов для использования в качестве перспективного производственного штамма.

Сравнительная эффективность штамма Rh lupini 387 а в вегетационном опыте. сорт Союз 1988 г

Таблица 1

Схема опыта	Урожай зерна на сосуд г			Средний урожай, г	Прибавка к контролю		Прибавка к штамму-стандарту		Азотфиксирующая активность мкМ C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> г/час	Время образования клубеньков при 8-12°C, сутки после всходов
	1	2	3		г	%	г	%		
Контроль	2.60	3.39	3.10	3.03±0.23					2.39±0.31	-
Штамм-прототип (Rh lupini 363a)	4.30	4.90	2.95	4.05±0.58					7.31±1.48	14
Предлагаемый штамм (Rh lupini 387a)	3.90	5.1	5.10	4.70±0.40	1.67	55.1	0.65	16.04	12.43±1.09	9

Сравнительная эффективность штамма Rh lupini № 387 а в вегетационном опыте. сорт Союз 1989 г (фаза 3-4 пары листьев)

Таблица 2

Схема опыта	Урожай зерна на сосуд, г			Средний урожай, г	Прибавка урожая к контролю		Прибавка урожая к штамму-стандарту		Азотфиксирующая активность мкМ C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> г <sup>-1</sup> час <sup>-1</sup>	Время образования клубеньков при 8-12°C, сутки после всходов
	1	2	3		г	%	г	%		
Контроль	8.0	13.0	9.0	10.0±1.5					0.0	-
Штамм-прототип (Rh lupini 363a)	10.5	15.0	10.5	12.0±1.5					5.76±0.56	14
Предлагаемый штамм (Rh lupini 387a)	15.5	12.3	13.2	13.66±1.34	3.66	36	1.6	13	14.6±3.5	5

Сравнительная эффективность штамма Rhizobium lupini 387a сорта Союз. 1989 г

Таблица 3

Схема опыта	Урожай зеленой массы ц/га			Средний урожай, г	Прибавка урожая к контролю		Прибавка урожая к штамму-стандарту		Азотфиксирующая активность мкМ C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> г/час
	1	2	3		ц/га	%	ц/га	%	
Контроль	420.0	450.0	425.0	431.7					4.98±0.48
Штамм-прототип (Rh lupini 363a)	530.0	500.0	470.0	500.0					6.04±1.08
Предлагаемый штамм (Rh lupini 387a)	600.0	622.0	574.0	598.7	167.0	38.7	98.7	19.7	6.07±0.60

НСР<sub>05</sub>

44.09

Таблица 4

Урожай семян люпина сорта Припятский в условиях производственного опыта (Волинская область, Любашинский район, 1990 г.)

Вариант	Масса семян по повторностям			Средний уро- жай, ц/га	Прибавка урожая семян			
					К контролю		К штамму-прототипу	
	1	2	3		ц/га	%	ц/га	%
Контроль	13,0	13,8	12,8	13,2		-		-
Штамм-прототип (Rh.lupini 363a)	13,8	15,0	13,6	14,1	0,9	13,6		-
Предлагаемый штамм (Rh.lupini 387a)	16,6	16,9	15,1	16,2	3,0	34,8	2,1	19,0