



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81577 (13) C2
(51) МПК (2006)
C05F 11/08 (2006.01)
C12N 1/20
C12R 1/41 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEAE M₁ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД ГОРОХ

1	2
(21) a200611360	SU 698968, 25.11.1979
(22) 30.10.2006	SU 979307, 07.12.1982
(24) 10.01.2008	SU 1789523 A1, 23.01.1993
(72) КОЦЬ СЕРГІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ, UA, МАНДРОВСЬКА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, UA, КРУГОВА ОЛЕНА ДМИТРІВНА, UA	(57) Штам бактерій Rhizobium leguminosarum bv. viceae M ₁ , депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України як Rhizobium leguminosarum bv. viceae IMB B-7195, для одержання бактеріального добрива під горох.
(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ, UA	
(56) UA 21012 A, 27.02.1998	
UA 3325 C1, 27.12.1994	

Винахід відноситься до сільського господарства, зокрема мікробіологічних засобів підвищення врожаю бобових культур і являє собою новий штам Rhizobium leguminosarum bv. viceae M₁, який може бути використаний для виготовлення бактеріальних добрив під горох.

Сучасні технології вирощування гороху передбачають обробку насіння препаратами, які містять активні виробничі штами бульбочкових бактерій. Але горох у багатьох випадках слабо відгукується на інокуляцію бактеріальними препаратами, виготовленими на основі промислових штамів. Це пов'язано з багатьма причинами, однією з яких є існування у ґрунті великої кількості спонтанних висококонкурентних, але малоактивних штамів, які створюють конкуренцію виробничим. У зв'язку з цим, у багатьох лабораторіях світу проводяться роботи із генно-інженерного конструювання штамів ризобій з підвищеним рівнем симбіотичної азотфіксації, які б у польових умовах могли протистояти аборигенним.

Відоме використання симбіотичних азотфіксаторів для виробництва бактеріальних добрив, які підвищували урожай гороху [Авторское свид. СССР №698968, 1978, C05F 11/08; Держпатент України №3325, 1994, Бюл. №6.]. В Україні довгий час для виробництва бактеріальних добрив під горох використовують штам Rhizobium leguminosarum bv. viceae 245a (ВНДІСГМ, Росія).

Авторами даного винаходу в якості прототипу обрано штам Rhizobium leguminosarum bv. viceae 263 [Патент України на винахід 21012 A 07.10.97, C05F 11/08], одержаний методом аналітичної селекції. Цей активний штам в залежності від ґрунтових і кліматичних умов іноді формує симбіоз низької ефективності.

Задачею винаходу є створення нового штаму бульбочкових бактерій гороху, який відповідає сучасним умовам виготовлення бактеріальних добрив: має високу азотфіксувальну активність і суттєво підвищує врожай гороху в порівнянні з відомими штамми.

Поставлена задача вирішується завдяки запропонованому штаму Rhizobium leguminosarum bv. viceae M₁.

Штам M₁ був отриманий у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України генетико-селекційним методом із використанням транспозону Tn5, з активного штаму Rhizobium leguminosarum bv. viceae 2636. Штам ідентифіковано за визначником бактерій Бергі, 1980, М.: Мир, с. 495. Штам M₁ зберігається в колекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України і депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України як Rhizobium leguminosarum bv. viceae IMB B-7195.

Морфолого-культуральні властивості.

Штам характеризується наступними

(13) C2
(11) 81577
(19) UA

культурально-морфологічними ознаками: культура бактерій не спороносна, грам-негативна, рухлива. Розмір клітин 0,8-2,3 мкм. Клітини мають палочковидну форму, пігмент не продукують. Культура швидко росла.

Штам M_1 росте на таких поживних середовищах: бобовому агарі Мазе (г/л: горох - 100,0; сахароза - 20,0; агар - 15,0; pH середовища 6,8-7,6), мінеральному (г/л: K_2HPO_4 - 1,0; KH_2PO_4 - 1,0; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,01; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25; $CaCd_2 \cdot 6H_2O$ - 0,1; KNO_3 - 0,6; маніт - 10,0; агар - 15,0; pH - 7,2.) На 3-ю добу росту штрихом утворює білувато-кремові колонії діаметром 0,1-0,3 см, помірно опуклі, напівпрозорі, з рівними краями. Температура інкубації 27-28°C.

Для довгострокового зберігання штаму M_1 використовується середовище 79 (г/л: K_2HPO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,1; $CaCO_3$ - сліди, дріжджовий екстракт - 2, казамінові кислоти або лактальбумін - 0,5; маніт - 10; pH середовища - 7,2-7,4; стерилізація при 0,8-1,0 атм. 30 хв., t° культивування - 28°C. Пересів через 2-3 місяці. При розсіві штрихом на 3-ю добу з'являються однотипні, слизисті, білуваті колонії до 0,4 см у діаметрі.

Фізіолого-біохімічні властивості.

Симбіонт. Макросимбіонт - бобова рослина горох (*Pisum sativum* L.). Відношення до кисню: аероб.

Температурний діапазон росту: 20-30°C. Діапазон pH 6,8-7,6. Оптимальна pH - 7,3.

Джерелами вуглецю для штаму M_1 можуть бути моно-, ди-, трисахариди та сахароспирти. З моносахаридів штам добре використовує арабінозу, глюкозу, ксиліозу та рамнозу. Штам M_1 асимілює дисахариди лактозу, мальтозу, сахарозу, трисахарид - рафінозу та сахароспирти маніт і сорбіт. Штам не засвоює сорбозу, інозитол, декстрин.

Поряд із засвоєнням азоту атмосфери штам M_1 може використовувати амонійний та нітратний азот, пептонізувати молоко.

Пропонований штам крохмалю не гідролізує, не виділяє сірководень, не росте на м'ясо-пептонному агарі, не розріджує желатину.

Генетичні особливості штаму.

Протроф. Стійкий до ряду антибіотиків. На відміну від прототипу - штаму 2636 він набув здатність стійкості до канаміцину в дозі 200 мкг/мл і стрептоміцину 600 мкг/мл. Штам не патогенний (Заключення Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ щодо патогенних властивостей штаму за результатами дослідження вірулентності від 27.06.06.).

Симбіотичні властивості штаму.

Оцінку симбіотичних властивостей штаму M_1 - азотфіксувальної активності та ефективності симбіозу проводили в умовах вегетаційних та польових дослідів у 2003-2006 роках.

Приклад

Веgetаційні досліді проводили на промитому річковому піску, (суміш Гельрігеля з 0,25 нормою азоту). Використовували 8 кг посудини Вагнера. Насіння гороху сорту Дамір2 стерилізували 70% етанолом, промивали дистильованою водою та

інокулювали бульбочковими бактеріями з розрахунку не менше $1,0 \cdot 10^9$ клітин на 1 мл суспензії.

Стерильне насіння витримували в суспензії бактерій протягом 2 год. і висівали у посудини. Абсолютним контролем були неінокульовані рослини. У досліді визначали азотфіксувальну активність за редукцією ацетилену в етилен, масу рослин, кількість бульбочок і урожай насіння на посудину.

Польові досліді проводили у 2004-2006 рр. у дослідному господарстві Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (сmt. Глеваха, Васильківського району, Київської області) на світло-сірих опідзолених легко-суглинистих ґрунтах, pH 6,0-6,7, вмістом гумусу 1,6-1,7%, азоту - 13,6 мг/кг, P_2O_5 - 36,6 мг/кг, K_2O - 134 мг/кг. Посів гороху у польових дослідіх проводили у другій декаді квітня, облікова площа ділянки 5 м², повторність досліді - 4-кратна. Посів рендомізований. Азотні добрива не вносили.

За даними вегетаційних дослідіх 2003-2004 рр. (табл. 1) штам M_1 утворював ефективний симбіоз із рослинами гороху, активно фіксував атмосферний азот і перевищував штам-прототип у фазу бутонізації у середньому в 1,4 рази. За відношенням до спонтанної інокуляції його азотфіксувальна активність була вищою у 3,1-3,4 рази. Новий штам бульбочкових бактерій гороху M_1 підвищував урожай зерна на 29% до контролю і на 21% до штаму-прототипу 2636.

Результати ефективності запропонованого штаму M_1 у польових дослідіх наведені в табл. 2-4. Штам, що пропонується, за ефективністю суттєво перевищує штам-прототип 2636 і виробничий штам 245а. Новий штам протягом усього періоду дослідіжень достовірно підвищував урожай зерна. За даними табл. 2 у польових умовах 2004 р. інокуляція штамом M_1 позитивно впливала на азотфіксувальну активність бульбочок та наростання надземної маси рослин гороху. Так, за азотфіксувальною активністю пропонований штам перевищував прототип 2636 майже у 2 рази, а за приростом надземної маси на 17,5%. Досліджуваний штам M_1 сприяв підвищенню урожаю зерна сорту Дамір 2 порівняно з контролем без інокуляції на 28,2%, і на 11% порівняно з штамом-прототипом (табл. 3), що становило 7,9 і 3,6 ц/га відповідно.

У польових дослідіх 2006 року штам M_1 із сортом гороху Камелот забезпечував збільшення урожаю зерна на 44,2% порівняно до контролю без інокуляції, на 15,0% порівняно зі штамом 2636 і на 17,4% порівняно зі виробничим штамом, що відповідно становило 12,2, 5,2 і 5,9 ц/га.

Показники ефективності симбіозу гороху з новим штамом M_1 у

Варіант	Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 / (росл. год)	Урожай за повторностями, г/посудину			
		1	2	3	4

1	Контроль	0,923±0,044	15,0	15,3	16,0	15,7	15,5±0,2				
2	Штам-прототип 2636	2,189±0,113	16,1	16,7	16,9	16,3	16,5±0,2				
3	Запропонований штам М ₁	3,102±0,141	19,7	19,9	20,1	20,3	20,0±0,1	4,5	29,0	3,5	21,2

Таблиця 2

Вплив штамів бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на азотфіксувальну активність бульбочок та приріст надземної маси рослин гороху у фазу бутонізації (польовий дослід, 2004 р.)

Варіант	Надземна маса за повторностями, г/рослину	Середнє	Приріст до контролю		Приріст до штаму 2636		Азотфіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ /(росл. год)
			г	%	г	%	
Контроль	28,3; 29,4; 29,8; 27,5; 28,1	28,6					0,83±0,04
Штам-прототип 2636	30,1; 34,8; 31,0; 31,9; 31,9	31,9					2,11±0,12
Запропонований штам М ₁	35,1; 39,9; 36,8; 38,3; 37,3	37,5	8,9	31,1	5,6	17,5	4,09±0,10
НІР ₀₅		2,1					

Таблиця 3

Вплив передпосівної інокуляції насіння штамом М₁ на урожай зерна гороху (польовий дослід 2004 р.)

Варіант	Урожай за повторностями, ц/га				Середній урожай, ц/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму 2636	
	1	2	3	4		ц/га	%	ц/га	%
Контроль	25,5	22,2	33,0	31,3	28,0±2,5				
Штам-прототип 2636	34,7	34,2	33,6	26,6	32,3±1,9				
Запропонований штам М ₁	35,9	36,2	36,5	35,0	35,9±0,3	7,9	28,2	3,6	11,1
НІР ₀₅					2,1				

Таблиця 4

Урожай зерна гороху сорту Камелот при інокуляції новим штамом М₁ (польовий дослід, 2006 р.)

Варіант	Урожай за повторностями,			ц/га	Середній урожай, ц/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму 245а		Надбавка до штаму 2636	
	1	2	3			ц/га	%	ц/га	%	ц/га	%
Контроль	28,3	27,3	27,2	27,6	27,6±0,3						
Виробничий штам 245а	30,6	33,5	33,9	37,7	33,9±1,5						
Штам-прототип 2636	34,3	37,2	32,0	35,0	34,6±1,1						
Запропонований штам М ₁	38,6	39,8	39,0	41,8	39,8±0,7	12,2	44,2	5,9	17,4	5,2	15,0
НІР ₀₅					2,2						

Таким чином, у результаті проведених вегетаційних і польових дослідів встановлено, що інокуляція новим штамом М₁ підвищує ефективність симбіотичної азотфіксації порівняно зі штамом-прототипом і виробничим, та позитивно впливає на збільшення врожаю зерна гороху. Культура є ефективним симбіонтом сортів гороху Дамір 2, Менгір, Камелот.