

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно к микробиологическим средствам повышения урожая бобовых культур и представляет собой новый штамм *Rh.leguminosarum* № 263 б, предназначенный для промышленного изготовления бактериального препарата клубеньковых бактерий - ризоторфина под горох.

Известен штамм *Rh.leguminosarum* 250 б как активный симбиотический азотфиксатор, однако он обладает низкой эффективностью [Авт.св. СССР № 979307, кл. С 05 F11 /08,1982].

Известен штамм *Rh.leguminosarum* 250 а [Авт.св. СССР № 489750, кл. С 05 F 11/08, 1975], выбранный авторами в качестве прототипа, который увеличивает урожай зерна гороха на 1 ц/га и содержание белка на 0,4%. Недостатком известного штамма является неспособность образовывать клубеньки при пониженных плюсовых температурах, низкая активность и часто отсутствие эффекта от обработки семян гороха этим штаммом.

Задачей изобретения является создание бактериального удобрения под горох на основе нового штамма клубеньковых бактерий *Rh.leguminosarum* Kfe 263 б, который имеет высокую азотфиксирующую активность и образует клубеньки при пониженных плюсовых температурах, что позволяет продлить период активной азотфиксации, увеличить урожай гороха за счет экологически чистого симбиотрофного питания.

Штамм *Rh.leguminosarum* 263 б получен в 1986 г. в отделе симбиотической азотфиксации ИФРГ АН Украины методом экспериментальной селекции при использовании низких положительных температур, как селектирующего фактора. Полученный нами штамм депонирован в национальной Коллекции клубеньковых бактерий Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии под номером 263 б в группе азотфиксирующих микроорганизмов.

Штамм клубеньковых бактерий IMg 263 б характеризуется следующими культурально-морфологическими признаками: культура бактерий - неспороносная, грамотрицательная, подвижная. Размер клеток 0,8-2,5 мкм. Клетки имеют палочковидную форму, перетрихи. На бобовом агаре Мазе (г/л - горох -100,0, NaCl -1,0, сахара - 20,0, агар - 18, вода до 1 л, pH 6,8-7,0) на 3 сутки роста штрихом образует блестящие беловатые колонии диаметром 0,1-0,3 см. При температуре инкубации 27°C культура образует интенсивный рост и интенсивную внеклеточную бесцветную пол-исахаридную слизь.

На маннитно-дрожжевом агаре (г/л -дрожжевой экстракт * 1,0, маннит 10,0 KJHPO₄, - 0,5, M 04-0,2, NaCl - 0,1, агар 15-18, вода дистиллированная 1 л, pH 7,0) культура образует однотипные круглые, спизистые, выпуклые, беловатые колонии размером до 0,4 см. Температура инкубации 27°C.

В отличие от штамма-прототипа культура клубеньковых бактерий № 263 б может расти на питательной среде при пониженных плюсовых температурах 8-10°C, образовывать клубеньки на 5. дней раньше, чем штамм-прототип, а также имеет более высокую азотфиксирующую активность и эффективность. Физиолого-биохимические признаки. Аэроб, температурный диапазон роста 8-28°C, оптимальная температура 18-27°C роста. Оптимум pH - 7,0-7,2. Желатину не разжижает. Молоко с лакмусом не пепто-низирует, подщелачивает. Использует соли аммония и нитраты, редуцирует нитраты в нитриты. Сероводород не выделяет. На жидкой среде Норриса окисляет ряд Сахаров: мальтозу, глюкозу, галактозу, маннит, сахарозу, фруктозу, подкисляет среду. На мясо-пептонном агаре и бульоне не растет.

Генетические особенности - протроф, устойчивый к ряду антибиотиков (налидиксо-вая кислота, неомицин, стрептомицин). Штамм 263б идентифицирован по определителю Берге (1974) как штамм *Rhizobium leguminosarum*. Предлагаемый нами штамм клубеньковых бактерий гороха 263б получен в 1986 г. в отделе симбиотической азотфиксации Института физиологии растений и генетики АН Украины, испытан в Географической сети опытов и на протяжении всего времени он сохраняет морфологические, культурально-биохимические и симбиотические свойства.

Пример 1. Исходным материалом для получения штамма служил активный штамм клубеньковых бактерий гороха 250а. Клубеньковые бактерии предварительно адаптировали к пониженным температурам путем высева на бобовый агар с течение 12 дней и проводили 3-4 пассажа. Из выросшей культуры готовили водную суспензию - 1 млрд клеток/мл, рассевали на питательную среду бобовый агар в чашки Петри и помещали в холодильную камеру. Посев инкубировали 12-15 дней при температуре 8-10°C. Было проведено последовательно 10 пассажей с последующим инкубированием в тех же условиях, затем отбирали максимальные по величине колонии, которые размножали и в дальнейшем использовали для проверки их симбиотических свойств при инокуляции семян гороха. Температурный режим, время инкубации и количество пассажей подбирали экспериментально, как наиболее эффективные для получения клубеньковых бактерий, растущих при пониженных плюсовых температурах. Для дальнейшей работы был отобран клон предлагаемого штамма.

Пример 2. Эффективность предлагаемого штамма № 263б проверяли в условиях вегетационных опытов в течение 1987-1990 гг. Вегетационные опыты проводили на речном мытом песке со смесью Гельригеля. Азот вносили в количестве 0,2 нормы. Использовали сосуды Вагнера объемом 11 кг. Семена гороха сорта Смарагд перед посевом стерилизовали 70% спиртом, промывали стерильной водой, потом инокулировали штаммом-стандартом и предлагаемым штаммом. Опыты проводили в 8-кратной по-вторности. Семена контрольных и опытных растений инокулировали суспензией клеток клубеньковых бактерий с титром 1 млрд/мл, приготовленных путем смыва 18-суточной культуры ризобий стерильной водопроводной водой по общепринятой методике. Стерильные семена выдерживали в суспензии бактерий в течение 2-х часов и высевали в сосуды при температуре 8-15°C. Абсолютным контролем служили неинокулированные растения. Опыты проводили в камере ВКШ в вегетационном домике. В опытах изучали симбиотическую азотфиксацию, которую определяли по редукции ацетилена в этилен (Hardy R.W.F. Holstein R.D. Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation.-Plant Physiology. 1968,43, № 8, p. 1185-1207) массу растений, время образования клубеньков при температуре 8-10°C и урожай семян гороха на сосуд.

Из данных табл. 1 и 2 видно, что предлагаемый штамм клубеньковых бактерий № 263б отличается от штамма-прототипа более ранним образованием клубеньков, повышенной азотфиксирующей активностью и

эффективностью. При инокуляции предлагаемым штаммом клубеньки на корнях гороха образовались на 5-6 дней раньше, чем при обработке штаммом-прототипом. В связи с более ранним образованием и функционированием клубеньков происходит увеличение периода активной азотфиксации. Более того, азотфиксирующая активность клубеньков гороха в варианте с инокуляцией предлагаемым штаммом в 1,5-2 раза выше, чем штаммом-прототипом. Как следует из данных таблиц инокуляция семян штаммом № 2636 увеличивает урожай зерна на 21% и зеленой массы на 8%.

Пример 3. Эффективность предлагаемого штамма и штамма-прототипа в полевых условиях проверяли в течение 1988-1992 гг. Для этого предлагаемый № 2636 штамм выращивали на питательной среде (бобовый агар с сахарозой) при 8-10°C в пробирках в течение 12-14 суток, затем смывали стерильной водой с агара и готовили густую суспензию, которой засеивали матрасы с бобовым агаром (объем 1:5 л), инкубировали 3-5 суток при 26°C. После инкубации культуру смывали 50 мл стерильной воды и вводили инокулят шприцом в стерильный торф (200-300 г/га) и хорошо перемешивали. Приготовленный таким образом ризоторфин помещали в термостат при температуре 26°C на 3-5 суток. После инкубации проверяли титр клубеньковых бактерий, который составил 5×10^8 клеток на 1 г торфа и инокулировали семена гороха. Для этого гектарную норму семян увлажняли (1-2% от массы семян) и равномерно перемешивали с ризоторфином, приготовленным на предлагаемом штамме и производственном (штамм 250а -прототип), подсушивали в тени и высевали в почву. Абсолютным контролем был вариант без инокуляции. Полевые опыты проводили в хозяйствах, расположенных в зоне Лесостепи Украины (с. Зеленки Мироновского района на типичном черноземе, малогумусном 3,5%, рН 6,7 и с. Глеваха Васильковско-го района Киевской области), где преобладают светло-серые оподзоленные, легко-суглинистые почвы с рН 6,0-6,7, содержание гумуса 1,6-1,7%, азот 13,6мг/кг, P_2O_5 - 56,6 мг/кг, K_2O -134 мг/кг. Полевые опыты проводили в 4-х кратной повторности, площадь делянки 5 кв.м. Растения гороха сорта Смарагд, Неосыпающийся, богатырь чешский, Солара высевали в севообороте после сахарной свеклы, удобрений и пестициды не вносили.

В полевых условиях опытов 1988 г. сорт гороха Неосыпающийся выявлено увеличение нитрогеназной активности клубеньков при инокуляции предлагаемым штаммом № 2636 в 1,5-2 раза по сравнению со штаммом-прототипом, что способствует повышению урожая зерна на 22% по сравнению с абсолютным контролем и на 17% по сравнению со штаммом-прототипом (табл. 3).

Как свидетельствуют данные табл. 4 в полевых условиях 1992 г. инокуляция семян гороха сорта Солара способствует увеличению азотфиксирующей активности, увеличивает урожай зерна на 9,5 ц/га. Особенно следует отметить положительное влияние инокуляции предлагаемым штаммом № 2636 на содержание белка в зерне. Как следует из табл. 4 содержание белка увеличилось на 5,2% по сравнению с инокуляцией штаммом-прототипом и на 5,3% против неинокулированного контроля.

Таким образом, в результате многолетних исследований установлено, что в условиях Лесостепи Украины, предлагаемый штамм № 2636 на многих сортах гороха способствует увеличению периода активной азотфиксации за счет более раннего образования клубеньков (на 5-6 суток раньше), чем штамм-прототип при температуре 8-12°C). Инокуляция предлагаемым штаммом № 2636 способствует увеличению азотфиксации в 2 раза по сравнению с штаммом-прототипом. Предлагаемый штамм клубеньковых бактерий гороха имеет повышенную эффективность по сравнению с прототипом, положительно влияет на увеличение урожая зерна гороха, содержание белка в зерне. Это дает возможность получения экологически чистой продукции за счет симбиотрофного питания гороха атмосферным азотом без внесения минерального азота в почву. Предлагаемый штамм № 2636 испытывали в течение трех лет в Географической сети опытов при ВНИИСХМ.

По данным Географической сети опытов (табл. 5) видно, что из 14 опытов в 11 случаях прибавка урожая, которую обеспечивал предлагаемый штамм, выше чем прибавка урожая от испытанного производственного штамма № 250а.

Штамм *Rhizobium leguminosarum* № 2636 рекомендован Межведомственной комиссией Географической сети опытов для использования в качестве производственного штамма.

Эффективность штамма *Rh.leguminosarum* № 2636 в вегетационном опыте, сорт

Варианты опыта	Азотфиксирующая активность мкМ C_2H_4 г/час, фаза- бутонизации	Зеленая масса на сосуд, г			Средний урожай, г/сосуд	Прибавка урожая	
		1	2	3		г	ролик
Контроль	Следы	19,1	18,4	19,8	19,1±0,4		
Штамм-прототип (<i>Rh.leguminosarum</i> 250а) (прототип)	2,3±0,3	22,2	23,3	24,7	23,4±0,7		
Штамм-прототип (<i>Rh.leguminosarum</i> 263а) предлагаемый	5,1±0,6	24,3	25,8	26,5	25,5±0,5	6,4	

Эффективность штамма *Rh.leguminosarum* № 2636 в вегетационном опыте, сорт

Варианты опыта. Повторность	Время образования клубеньков при 8–12°C сутки после всходов	Азотфиксирующая активность мкМ C_2H_4 г/час, фаза-бутиониз.	Урожай на сосуд, г			Средний урожай, г/сосуд	Прибавка урожая, г
			1	2	3		
Контроль	–	0,25±0,03	2,01	2,15	1,98	2,34±0,05	
Штамм-прототип (Rh.leguminosarum 250a)							
(прототип)	11	2,92±0,50	2,23	2,66	2,50	2,46±0,12	
Штамм-прототип (Rh.leguminosarum 263a)	6	4,20±0,52	2,81	3,2	2,95	2,98±0,57	0,94

Эффективность штамма *Rh.leguminosarum* № 263 б в полевом опыте, с. гороха Неос

Варианты опыта.	Азотфиксирующая активность мкМ C_2H_4 г/час, фаза-бутиониз.	Урожай по повторностям			Средний урожай, ц/га	Прибавка урожая, ц/га	
		1	2	3		ц/га	
Контроль	0,05±0,007	25,3	26,8	25,8	25,9±0,4		
Штамм-прототип (Rh.leguminosarum 250a)							
(прототип)	6,86±0,01	27,8	27,2	26,1	27,0±0,4		
Штамм-прототип (Rh.leguminosarum 263a)	4,20±0,02	31,5	32,3	31,8	31,8±0,2	5,9	

P – 1,2

HCP_{0,5} ц/га – 1,25

Эффективность штамма *Rh.leguminosarum* № 263 б в полевом опыте, сорта горох

Варианты опыта.	Фиксирующая активность, мкМ C_2H_4 г/час	Урожай по повторностям				Средний урожай, ц/га	Прибавка контролю, ц/га
		1	2	3	4		
Контроль	1,96±0,38	18,7	28,3	25,3	18,3	22,7	
Штамм-прототип (<i>Rh.leguminosarum</i> 250а)							
(прототип)	2,75±0,15	27,3	31,0	33,7	29,0	30,3	
Штамм-прототип (<i>Rh.leguminosarum</i> 263а)	3,18±0,45	34,5	40,2	32,3	33,7	35,2	12,5

НСР_{0,5} ц/га - 5,58

Т а б л и ц а 5

Испытания штамма *Rh.leguminosarum* 263б в географической сети опытов (1990-1991 г.)

Место опыта	Год	Урожай гороха в контроле, ц/га	Прибавка урожая гороха при использовании штаммов	
			250 а	263 б
1. Томский ГПИ	1990	24,8	+12,0	+29,0
2. Брянский СХИ	1990			
с. Труженик		27,4	+3,3	+2,7
с. Уладовский			+1,5	+2,5
с. Смарагд			+3,6	+4,9
3. Пензенский СХИ	1990	36,1	+5,2	+3,9
4. НПО "Подмосковье"	1991	14,1	-1,2	+5,7
5. Красноярский	1991	31,1	+3,5	+9,1
6. Луганское	1991			
НПО "Элита"		18,2	+0,5	+1,9
с. Труженик		14,2	-0,6	+1,9
с. Усач				
с. Детерминантный		15,6	+2,1	+1,7
7. НПО "Башкирское"	1991	9,7	+0,3	+1,1
8. Брянский СХИ	1991			
с. Смарагд		15,6		+14,0
с. Богатырь		21,5	+15,0	+24,0
с. Орловчанин		16,6	+18,0	+40,0