

Корисна модель відноситься до сільського господарства до мікробіологічних засобів підвищення продуктивності конюшини, а саме до нових штамів *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* для виготовлення бактеріальних добрив під згадану культуру.

У нашій країні конюшина червона у районах із помірним і вологим кліматом є основною багаторічною бобовою культурою. Підвищення урожайності конюшини може бути здійснено завдяки підсиленню у неї процесу біологічної азотфіксації шляхом обробки насіння селекційними штамми бульбочкових бактерій, здатних формувати високоактивний симбіоз із цією рослиною. У виробничих умовах основою азотфіксуючих бактеріальних препаратів здебільшого є виробничі штамми бульбочкових бактерій, перелік яких за комплементарністю до певних сортів обмежений або навіть недостатній.

Відомий штам бактерій *Rhizobium trifolii* 1360 виділений із бульбочок конюшини лугової [Авторське свідоцтво SU 1555320 A1 5C 05F 11/08, С 12N 1/20, 1983 Вежайський філіал Литовського н.-д. Інституту землеробства. А.Б. Лапинскас], що використовується для отримання нітрагіну під конюшину лугову і збільшує її врожай на 12,6 %.

Серед штамів, що використовуються у країнах Західної Європи, відомий штам МЕТІ 1163 [ГДР, економічний патент N 247142 A01C1/06, A 01 N63/00, С 12 R1/41], який підвищує врожай сухої маси і сирого протеїну без додаткового внесення азотного добрива, а також штам для інокуляції білої конюшини *Rhizobium trifolii* ZJMeT11255 (ГДР економічний патент N266256 A01 C1/06), який без додаткових добрив підвищує вихід сухої маси і підвищує вміст азоту в рослині у вегетаційних і польових умовах.

Протягом багатьох років для виробництва нітрагін у Україні використовуються штамми *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 3446 і 340 (ІНМІ АН Білорусі), 348а (ВНДІСГМ, Росія), які сприяють збільшенню урожайності конюшини червоної. Недоліком їх є те, що на ряді районованих в Україні сортів конюшини їх азотфіксувальна активність недостатньо висока і не завжди стабільна. Найближчим до пропонованого штаму є *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 348а (ВШЦСГМ, Росія), отриманий у результаті аналітичної селекції. При бактеризації штамом 348а *R. leguminosarum* bv. *trifolii* конюшини районованих сортів Дарунок і Кумач виявилось, що згаданий штам проявляє слабку вірулентність, що позначається у подальшому на ефективності утворених симбіотичних систем конюшини. У результаті це призводить до зниження ефективності і отримання нестабільного урожаю конюшини.

Поряд із селекцією, спрямованою на генетичну комплементарність симбіопартнерів, доцільно проводити добір штамів бульбочкових бактерій, які б утворювали високоефективні симбіотичні системи із ширшим колом районованих сортів та були б пристосованими до екологічних умов довкілля.

Задачею корисної моделі є одержання штаму бульбочкових бактерій конюшини з високою азотфіксувальною активністю і вірулентністю, який би дозволяв підсилити процес симбіотичної азотфіксації у декількох районованих сортів конюшини, підвищити їх продуктивність і покращити якість надземної маси.

Ця задача вирішується завдяки запропонованому штаму *Rhizobiwn leguminosarum* bv. *trifolii* BN9. Новий штам отриманий методом гібридизації: у результаті мікродової кон'югації між штамом-донором *Escherichia coli* JC 5466 і штамом-реципієнтом *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* B<sub>1</sub> (1000)NN. У результаті ступеневого відбору за підвищеними симбіотичними показниками з-поміж інших кон'югантів був відібраний штам BN9. Особливістю штаму є те, що після зберігання протягом 10 років в умовах музейної колекції він зберігає стабільність за генетичними маркерами (стійкість до антибіотиків), високу вірулентність і азотфіксувальну активність.

Штам *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 депонований у колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України (м. Київ) та зберігається під реєстраційним номером 1MB B-7196. Штам характеризується наступними фізіолого-біохімічними ознаками: культура бактерій швидко росте, не спороносна, грам-негативна. Клітини мають форму дрібних паличок розміром 0,7-1,0x2,5-3,0 мкм, палички рухливі. Бактерії пігмент не продукують. Колонії помірно-випуклі, слизисті, напівпрозорі з часом розростаються на поверхні агаризованого середовища. Запропонований штам є мікроаерофілом. Температурний діапазон росту: 20-28°C. Оптимальна температура росту - 27°C. Діапазон pH 6,5-7,4. Оптимальна pH-7,2. Генетичні особливості: прототроф, стійкий до ряду антибіотиків (стрептоміцину сульфат - 250 мкг/мл, канаміцину сульфат - 25 мкг/мл, тетрацикліну гідрохлорид - 15 мкг/мл). Штам непатогенний.

Штам ідентифікований за визначником Бергі, 1980, М.: "Мир". - С. 495.

Відношення до джерел азоту - культура бактерій *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 відновлює нітрати і нітрити, засвоює амонійні солі. Використовує казеїн та гідролізат лактальбуміну, має каталазу та уреазу активність (за своєю сечовину). Культура не розріджує желатину, не утворює сірководень (H<sub>2</sub>S), слабо пептонізує молоко.

Відношення до вуглеводів - культура засвоює сахарозу, L-арабінозу, D-арабінозу, рибозу, D-ксилозу, D-фруктозу, L-фруктозу, мальтозу, галактозу, ксилозу, мелібіозу, целобіозу, фруктозу, маніт із утворенням кислих продуктів і слабо - лактозу і глюкозу. Рафінозу, декстрин, сорбозу, L-ксилозу штам не засвоює. Полісахариди - крохмаль і глікоген не гідролізує. Із багатоатомних спиртів засвоює маніт. Не засвоює манітол, сорбітол, інозітол. Відмінним джерелом вуглецю для досліджуваного штаму є м'ясо. Не утворює індол, не росте на МПБ+6,5 % NaCl, має ріст на МПБ+2,5 % NaCl, добре росте на м'ясо-пептонному агарі (МПА), на середовищі Ешбі. Ріст на м'ясо-пептонному бульйоні при 27°C характеризується помутнінням середовища, колір якого не змінюється. Культура добре культивується на середовищах наступного складу: гороховий агар (г/л: горох - 100, сахароза - 20,0, NaCl - 1,0, агар - 15-18,0, pH 6,8-7,0. В 1 л води кип'ятити 100 г гороху протягом 30 хв, настояти 20 хв. Відвар відцідити, розчинити добавки. Стерилізувати при 1 атм 30 хв, pH 6,8-7,2. Манітно-дріжджовий агар (МДА) (г/л: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2, NaCl - 0,1, маніт - 10,0, дріжджовий екстракт - 1,0, агар - 15,0-17,0, диет. вода, pH - 7,0. Стерилізувати при 1 атм 30 хв, pH 6,8-7,2.

Синтетичне середовище 79 (г/л: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2, NaCl - 0,1, CaCO<sub>3</sub> - сліди, казаміноокислоти (або гідролізат лактальбуміну) - 0,1 % (1 г), маніт - 10,0, агар - 17,0, диет. вода - 1 літр). Стерилізувати при 0,75 атм 40 хв, pH 6,8-7,2. Має слабкий ріст на картопляному агарі.

Культура добре зберігається на манітно-дріжджовому агарі (МДА, pH 7,0) або середовищі 79 (pH 7,2) під мінеральним маслом при кімнатній температурі або у холодильнику при температурі 4-5°C на цих же середовищах без масла. Передівають 1-2 рази на рік, добавляють у середовище антибіотики - стрептоміцину сульфат - 250 мкг/мл, канаміцину сульфат - 25 мкг/мл, тетрацикліну гідрохлорид - 15 мкг/мл. Після 20 пересівів на середовищі 79 без антибіотиків штам *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 добре росте на цьому ж середовищі із додаванням антибіо-

тиків - стрептоміцину, канаміцину і тетрацикліну, утворює білуваті напівпрозорі колонії, які швидко продукують слиз.

Передпосівну інокуляцію насіння проводили бактеріальною суспензією із титром  $10^9$  клітин/мл. Для її отримання штам BN9 вирощували на манітно-дріжджовому агарі при 27°C протягом 3-4 діб у пробірках. Культуру із агару змивали стерильною водою, готували густу суспензію (50 мл), якою засівали качалочні колби із 350 мл середовища. Інкубацію проводили протягом 3-4 днів при температурі 27°C і постійній аерації середовища вирощування.

Для виготовлення препарату на твердому носії у пакети із перлітом (вермикулітом) (130 г/га) вводили стерильно 50мл суспензії бульбочкових бактерій штаму BN9 і поживні добавки (мелясу, кукурудзяний екстракт, глюкозу) добре перемішували. Приготовлене таким чином бактеріальне добриво витримували при кімнатній температурі (18-20°C) 10 діб. Після термостатування перевіряли титр бактерій - в 1 г бактеріального препарату на твердому носії (перліт, вермикуліт) повинно бути не менше 1-1,5 млрд. клітин *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 і проводили інокуляцію насіння. Для цього гектарну норму насіння зволожували (1-2 % води від маси насіння), рівномірно перемішували із бактеріальним препаратом, підсушували в тіні і висівали в ґрунт.

Інший спосіб передбачає обробку насіння конюшини водною витяжкою із бактеріального препарату на твердому носії. Для цього 250г препарату розводили у воді і фільтрували через марлю (грубі частинки перліту таким чином відділяли від основної суспензії). Отриману суспензію інокулювали гектарну норму насіння.

Ефективність штаму *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 випробовували на сортах конюшини Дарунок і Кумач у вегетаційних (на промитому річковому піску з додаванням мінерального середовища Гельрігеля із 0,2 нормами азоту), а також у польових умовах на темно-сірому опідзоленому (рН 5,3-5,7) ґрунті із вмістом гумусу 1,6-2,0% (Черкаська обл., 2003-2005 рр.) і на сірому лісовому супіщаному (рН 5,9-6,0, вміст гумусу 1,2-1,5%) ґрунті (Київська обл.) 2004-2006 рр.). У цих ґрунтах розповсюджені досить агресивні раси спонтанних форм бульбочкових бактерій конюшини. Посів конюшини проводили у другій декаді квітня з шириною міжрядь 45 см на глибину загортання насіння 1,5-2,0см. Передпосівну обробку проводили за 1 годину до висіву насіння в ґрунт бактеріальною суспензією або препаратом на твердому носії. Насіння висівали із розрахунку 15кг/га.

Азотфіксувальну активність кореневих бульбочок рослин конюшини першого та другого років вегетації визначали за відновленням ацетилену в етилен за методом Харді зі співавт. (1968) на газовому хроматографі "Chromatograph-504" із полум'яно-іонізаційним детектором. Корені із бульбочками клали у герметично закриті скляні флакони ємністю 75см<sup>3</sup>, через гумову мембрану до них вводили 10 % ацетилену від загального об'єму. Тривалість інкубації із ацетиленом - 1 година. Розділення газів проводили на колонці (0,40x130см) із Parapak N при температурі 80°C. Як газ носій використовували азот (50 мл в 1 хв.). Об'єм проби для аналізу - 0,5-1см<sup>3</sup>. Кількість етилену, що утворився із ацетилену під дією нітрогенази інкубованого зразка, виражали у молярних одиницях (наномольях (нмоль) або мікромолях (мкмоль) утвореного етилену на 1 рослину за 1 годину).

Визначення стабільності за плазмідними маркерами стійкості до антибіотиків штаму *R. leguminosarum* bv. *trifolii* BN9 в умовах симбіозу (вегетаційний дослід) показало, що реізоляти із бульбочок 30-денних рослин конюшини першого року вегетації мають задовільний ріст на селективному середовищі із заданими концентраціями канаміцину, тетрацикліну, стрептоміцину.

Результати впливу штаму BN9 на урожай зеленої маси конюшини сорту Дарунок в умовах вегетаційного досліді подані в таблиці 1. Рослини, інокульовані запропонованим штамом, за сумою двох укосів надземної маси переважали виробничий штам на 17,9 % (28,1 г/посудину). У результаті активної фіксації азоту, не лише підвищується урожай зеленої маси конюшини, а й покращується якість урожаю за рахунок збільшення вмісту в ньому азоту (табл. 1).

Результати ефективності застосування запропонованого штаму BN9 у якості штама-інокулянта конюшини у різних ґрунтово-кліматичних зонах наведені в таблицях 2-5. В умовах польового досліді (Черкаська обл.) конюшина сорту Дарунок, інокульована штамом BN9 у перший рік вегетації перевищувала штам-стандарт за азотфіксувальною активністю у 1,4 рази (табл. 2), у другий рік вегетації - у 1,5 раз (табл. 3). Інокуляція насіння конюшини сорту Кумач штамом BN9 сприяла зростанню азотфіксувальної активності у 9,2 рази (табл. 4) порівняно із спонтанною інокуляцією і у 1,4 - з обробкою штамом 348а.

Порівняно із виробничим штамом 348а, запропонований штам протягом всього періоду досліджень достовірно підвищував урожай зеленої маси конюшини сортів Кумач і Дарунок. Надбавка урожаю зеленої маси конюшини сорту Дарунок в перший рік вегетації при інокуляції новим штамом складала 31,7 ц/га (19,2 %) - за відношенням до контролю і 28,8 ц/га (17,2) - за відношенням до штаму-стандарту 348а (табл. 2). У другий рік вегетації ці величини становили відповідно 77,6 ц/га (26,0) і 51,9 ц/га (16,0 %) (табл. 3). Новий штам є високоефективним симбіопартнером і для конюшини сорту Кумач, що підтверджує приріст урожаю зеленої маси на 33,7 і 36,5 % (59,9 і 62,1 ц/га) за відношенням до контролю і на 16,3 та 16,6 % (33,3 і 33,1 ц/га) - за відношенням до рослин, інокульованих виробничим штамом 348а (табл. 4-5). Передпосівна обробка суспензією бульбочкових бактерій штаму BN9 сприяла більш ранньому (на 5 днів) проростанню насіння конюшини порівняно із рослинами обробленими виробничим штамом 348а *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Бактерії штаму 348а *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. використовуються у виробничих умовах для виготовлення бактеріального добрива, оскільки мають хороші технологічні властивості. Результати, наведені в таблиці 6, свідчать про те, що запропонований штам BN9 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* має високу технологічність і навіть перевищує штам-стандарт за основним технологічним параметром: інтенсивно розмножується на відповідних рідких середовищах і дає більш високий титр у препараті на твердому носії перліті (вермикуліті).

Таблиця 1.

Ефективність інокуляції і азотфіксувальна активність конюшини сорту Дарунок ("вегетаційний дослід, 2003 р.)

Штам-інокулянт	Середній урожай зеленої маси, г/посудину	Надбавка до штаму 348а	Азотфіксувальна активність, мкмоль	Вміст азоту у сухій надземній масі, %	Вміст білка, %
----------------	--	------------------------	------------------------------------	---------------------------------------	----------------

	I укіс	II укіс	Сума	г/посудину	%	яь C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (росли- ну·год)				
							I укіс	II укіс	I укіс	II укіс
Штам-стандарт R. leguminosarum bv. trifolii 348a	104,8±4,9	52,2±0,6	157,0	-	-	1,95±0,31	2,50±0,05	2,32±0,05	15,62	14,50
Вихідний штам R. leguminosarum bv. trifolii B <sub>1</sub> (1000)NN	114,4±9,54	46,6±2,2	161,0	4,0	2,6	2,22±0,11	2,70±0,03	2,30±0,03	16,87	14,37
Запропонований штам R. leguminosarum bv. trifolii BN9	126,30±3,02	58,4±0,7	185,1	28,1	17,9	3,06±0,07	3,15±0,03	,55±0,05	19,68	15,81
HIP <sub>0,5</sub>	18,2	4,52					0,13	0,11		

Таблиця 2.

Урожай зеленої маси конюшини сорту Дарунок 1-го року вегетації, 2004 р. (Черкаська обл., польовий дослід).

Штам-інокулянт	Урожай за повтореннями, ц/га				Середній урожай, ц/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму-стандарту		Азотфіксувальна активність, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (росли- ну·год)
	I	II	III	IV		ц/га	%	ц/га	%	
Контроль (без інокуляції)	149,1	175,4	162,6	173,8	165,2±6,1					117,7±22,4
Виробничий штам 348a	163,6	194,0	164,0	150,2	168,0±9,3					363,4±38,1
Запропонований штам BN9	197,4	205,4	200,5	184,2	196,9±4,5	31,7	19,2	28,8	17,2	513,9±49,7
HIP <sub>0,5</sub>					28,0					

Таблиця 3.

Урожай зеленої маси конюшини сорту Дарунок 2-го року вегетації 2005 р. (Черкаська обл., польовий дослід).

Штам-інокулянт	Урожай за повтореннями, ц/га				Середній урожай, ц/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму-стандарту		Азотфіксувальна активність, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (росли- ну·год)
	I	II	III	IV		ц/га	%	ц/га	%	
Контроль (без інокуляції)	213,2	273,6	338,0	369,0	298,5±34,7					54,6±6,3
Виробничий штам 348a	324,0	310,0	346,8	316,0	324,2±8,1					304,8±36,1
Запропонований штам BN9	390,4	372,0	366,0	376,0	376,1±5,2	77,6	26,0	51,9	16,0	449,6±21,6
HIP <sub>0,5</sub>					66,4					

Таблиця 4.

Урожай зеленої маси та азотфіксувальна активність конюшини сорту Кумач 1-го року вегетації 2006 р. (Київська обл., польовий дослід).

Штам-інокулянт	Урожай за повтореннями, ц /га, 1 укіс				Середній урожай, ц/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму-стандарту		Азотфіксувальна активність, нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (росли- ну·год)
	I	II	III	IV		ц/га	%	ц/га	%	
Контроль (без інокуляції)	154,9	185,3	194,9	176,0	177,8±8,5					89,1±9,3
Виробничий штам 348a	213,0	210,0	192,2	202,0	204,4±4,7					595,6±57,3
Запропонований штам BN9	247,0	239,0	237,4	227,0	237,7±4,1	59,9	33,7	33,3	16,3	822,0±49,1
HIP <sub>0,5</sub>					19,5					

Таблиця 5.

Урожай зеленої маси сорту Кумач 1-го року вегетації 2006 р. (Київська обл.)

Штам-інокулянт	Урожай за повтореннями, ц/га, II укіс				Середній уро- жай, ц/га	Надбавка до ко- нтролю		Надбавка до штаму-стандарту	
	I	II	III	IV		ц/га	%	ц/га	%
Контроль (без іно- куляції)	180,0	155,0	170,0	175,0	170,0±5,4				
Виробничий штам 348a	198,0	224,0	172,0	202,0	199,0±10,7				
Запропонований штам BN9	238,0	211,0	234,5	245,0	232,1±7,4	62,1	36,5	33,1	16,6
НІР <sub>0,5</sub>					25,8				

Таблиця 6.

Збереження титру штамми 348a і BN9 *Rhizobium leguminosarum* bv.  
*trifolii* у бактеріальному препараті залежно від часу зберігання (млрд.клітин/1 г препарату)

Штами	Тривалість зберігання (доба)				
	Титр бактерій у препараті на перліті				
	Вихідний титр	10 діб	15 діб	30 діб	45 діб
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 348a	1,8±0,01	9,1±0,2	49,0±1,0	72,0±2,0	86,0±1,0
Транскон'югант BN9	3,3±0,2	16,2±1,0	52,5±1,5	100,0±5,5	122,5±7,5
Титр бактерій у препараті на вермикуліті					
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 348a	3,8±0,2	9,0±0,0	41,5±3,5	88,5±6,5	90,0±5,0
Транскон'югант BN9	4,8±0,5	13,6±1,1	61,0±1,0	112,5±3,5	119,5±0,5