



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51890 (13) C2

(51) 7 C05F11/08,
C12N1/20/(C12N1/20,C12R1:41)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ RHIZOBIUM SP. (GALEGA) ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД КОЗЛЯТНИК

1

2

(21) 2001053073

(22) 04.05.2001

(24) 15.11.2004

(46) 15.11.2004, Бюл. № 11, 2004 р.

(72) Маліченко Світлана Марківна, Коць Сергій Ярославович, Титова Людмила В'ячеславівна, Бутницький Іван Миколайович, Заболотна Віра Петрівна

(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
НАН УКРАЇНИ

(56) SU A1 1669148 11.12.1989

SU A1 1427821, 1984

(57) Штам бактерій Rhizobium sp. (Galega) MC-1 для одержання бактеріального добрива під козлятник.

Винахід відноситься до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до мікробіологічних засобів підвищення урожайності бобових культур і стосується нового штамму бактерій Rhizobium sp.(Galega) MC-1 для виготовлення бактеріальних добрив під козлятник.

Одним із шляхів підвищення продуктивності тваринництва є застосування нових високоефективних і малозатратних в процесі вирощування видів бобових рослин. Такою рослиною для України може бути козлятник східний (Galega orientalis Lam.). Це нова і малопоширена багаторічна кормовосилосна рослина, яка в рік посіву укорінюється, у наступний рік вегетації відростає значно раніше інших бобових багаторічних культур і не припиняє своєї вегетації аж до замерзання ґрунту. Перший урожай вегетативної маси козлятника формує в рік посіву, а в наступні роки може давати два-три уроки. Порівняно з традиційними кормовими культурами (люцерна, еспарцет, конюшина) в зеленій масі козлятника східного міститься більше кормових одиниць, перетравного протеїну і вітамінів.

Відомо, що одним з резервів підвищення продуктивності бобових культур, в тому числі і козлятника, може бути підсилення у них процесу біологічної азотфіксації шляхом обробки насіння селекційними штаммами бульбочкових бактерій. Козлятник східний - нова для України культура, тому в ґрунті відсутні активні штамми бульбочкових бактерій, здатних формувати високоактивний симбіоз з цією рослиною. Протягом багатьох років під

козлятник використовували штам Rhizobium galegae CIAM 0703 (зберігається у Колекції культур бульбочкових бактерій Всеросійського дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології, С.-Петербург-Пушкін). Недоліком цього штамму є те, що при бактеризації ним насіння козлятника спостерігається не досить висока азотфіксуюча активність симбіотичного апарату і урожайність цієї кормової культури.

Задачею винаходу є одержання нового штамму бульбочкових бактерій козлятника з вищою азотфіксуючою активністю, який дозволяв би підсилити процес симбіотичної азотфіксації, підвищити продуктивність і покращити якість фітомаси цієї культури.

Ця задача вирішується завдяки запропонованому штамму Rhizobium sp. (Galega)MC-1.

Штам MC-1 був виділений з бульбочок рослин козлятника, вирощуваного на чорноземі Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка Національної академії наук України.

Спосіб отримання штамму є загальновідомим (наприклад він описаний „Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценки их эффективности. - 1979. - Ленинград. - 22с.)

Штам ідентифіковано за визначником бактерій Бергі, 1980, М.: " Мир". С.495.

Штам Rhizobium sp. (Galega) MC-1 зберігається в колекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (м. Київ) під №159.

(13) C2

(11) 51890

(19) UA

Морфолого - культуральні властивості.

Штам характеризується наступними культурально - морфологічними ознаками: культура бактерій не спороносна, грам-негативна, клітини мають форму дрібних паличок, розміром 0,8-2,0мкм, палички рухливі. Бактерії пігмент не продукують. Культура швидкоросла.

Штам МС-1 росте на наступних поживних середовищах:

1. Гороховий агар, г/л: горох - 100,0; сахароза - 20,0; агар-агар - 16,0; рН середовища 6,8-7,0.

2. Манірно - дріжджовий агар (МДА), г/л: маніт-10,0; K_2HPO_4 -0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2; $NaCl$ -0,1; дріжджовий екстракт - 1,0; агар-агар - 16,0; рН середовища 6,6-7,2.

При розсіві штрихом на МДА колонії з'являються на 3-4 добу, мають округлу форму, випуклі, білі, однотипні, слизисті, 1-2мм в діаметрі.

Фізіолого - біохімічні властивості.

Симбіонт. Макросимбіонт - бобова рослина козлятник (*Galega orientalis* Lam.).

Відношення до кисню - аероб, але здатний рости при зниженому вмісті кисню.

Температурний діапазон росту: 20-30°C. Оптимальна температура росту: 28°C. Діапазон рН 6,5-7,4. Оптимальна рН-7,2.

В якості джерела вуглецю штам МС-1 може використовувати глюкозу, сахарозу, маніт, ксилузу, мальтозу, рамнозу, сорбіт, арабінозу, лактозу, галактозу.

Поряд із засвоєнням азоту атмосфери може використовувати амонійний та нітратний азот. Відновлює нітрати до нітритів.

Інші характерні фізіологічні особливості.

Желатину не розріджує.

Молоко з лакмусом не пептонізує, слабо підлужує (рН зміщує в слабо-лужну сторону).

Крохмаль не гідролізує. Не розкладає целюлозу.

Стимуляторів росту даний штам не потребує.

Ознаки штаму стійкі. Штам не патогенний.

Штам МС-1 зберігається на МДА (рН 7,0) або гороховому агарі вказаного складу при 4-5°C і пересівається один раз у 6 місяців.

Оцінку симбіотичних властивостей штаму МС-1 - азотфіксуючої активності та ефективності симбіозу проводили в умовах вегетаційних та польових дослідів.

Приклад. Штам *Rhizobium* sp. (*Galega*) МС-1 вирощували на поживному середовищі МДА при 27°C протягом 3-4 діб у пробірках, потім змивали

стерильною водою і готували суспензію.

Ефективність штаму МС-1 перевіряли у вегетаційних дослідах на промитому річковому піску (суміш Гельрігеля з 0,25 і 0,5 нормами азоту) та у польових дослідах на чорноземі опідзоленому на лесах (Тернопільська обл., 1999-2000р.р.). Перед посівом насіння скарифікували шляхом перетирання з чистим піском, після чого стерилізували 70%-ним етанолом, промивали дистильованою водою та інокулювали бульбочковими бактеріями з розрахунку не менше як $2,0 \cdot 10^4$ клітин на одну насінину.

Посів козлятника у польових дослідах проводили в першій декаді квітня з шириною міжрядь 45см та глибиною загортання насіння 1,5-2,0см. Насіння висівали з розрахунку 20кг/га.

Азотфіксуючу активність штаму визначали в інтактних бульбочках рослин першого та другого року вегетації за величиною ацетиленредуктазної активності.

Як видно з табл.1, штам МС-1 вступав в ефективний симбіоз з козлятником сорту Кавказький бранець, активно фіксував атмосферний азот і за азотфіксуючою активністю в умовах вегетаційного досліду перевищував штам-стандарт CIAM 0703 в 1,2-1,6 рази. Урожай зеленої маси козлятника зростав при цьому на 37-178,3% порівняно з контролем і на 15,6-18,2% - порівняно зі штамом-стандартом (в залежності від дози азоту).

Результати ефективності запропонованого штаму МС-1 в польових дослідах наведені в табл.2-4. Штам, що пропонується, за ефективністю суттєво перевищує базовий штам. Новий штам протягом всього періоду досліджень достовірно підвищував урожай зеленої маси козлятника. Надбавка урожаю зеленої маси в перший рік вегетації при інокуляції новим штамом складала 53,3ц/га(47,1%) - по відношенню до контролю і 15,3ц/га(10,1%) - по відношенню до штаму-стандарту (табл.2). У другий рік вегетації (табл.3) ці величини становили, відповідно, 120,0ц/га(18,6%) і 80,0ц/га(11,7%). Азотфіксуюча активність симбіотичного апарату у козлятника в перший рік вегетації перевищувала штам-стандарт в 1,4 рази (табл.2). Новий штам значно підвищував не лише урожай зеленої маси козлятника східного, але й урожай насіння. Надбавка урожаю насіння при інокуляції штамом, що пропонується, становила 0,44ц/га або 12,0% порівняно зі штамом - стандартом і 0,86ц/га або 26,4% - порівняно з контролем (табл.4).

Таблиця 1

Урожай зеленої маси козлятника сорту Кавказький бранець у вегетаційному досліді, 1999р.

| Варіант | Доза Азоту | Урожай по повторностях, г/посудину | | | | | | Середній урожай, г/посудину | Надбавка до контролю | | Надбавка до CIAM 0703 | | Азотфіксуюча активність, $МКМоль C_2H_4 \cdot рослг^{-1} \cdot год^{-1}$ |
|-------------|------------|------------------------------------|------|------|------|------|------|-----------------------------|----------------------|----|-----------------------|----|--|
| | | I | II | III | IV | V | VI | | г/посуд | % | г/посуд | % | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 1. Контроль | 0,25н. | 19,4 | 15,0 | 19,6 | 20,2 | 17,8 | 24,2 | $19,4 \pm 1,2$ | | | | | 0 |

Таблиця 4

Урожай насіння козлятника сорту Кавказький бранець
у польовому досліді, 2000р

| Варіант | Урожай по повторностях, ц/га | | | | | Середній урожай, ц/га | Надбавка до контролю | | Надбавка до CIAM 0703 | |
|------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------------------|----------------------|------|-----------------------|------|
| | I | II | III | IV | V | | ц/га | % | ц/га | % |
| 1. Контроль (спонтанна інокуляція) | 3,1 | 3,2 | 3,4 | 3,2 | 3,4 | 3,26±0,06 | | | | |
| 2. Базовий штам CIAM 0703 | 3,8 | 3,5 | 3,7 | 3,9 | 3,5 | 3,68±0,08 | | | | |
| 3. Запропонований штам МС-1 | 4,2 | 4,0 | 3,9 | 4,4 | 4,1 | 4,12±0,09 | 0,86 | 26,4 | 0,44 | 12,0 |
| НІР _{0,5} , ц/га | | | | | | 0,23 | | | | |