

Винахід відноситься до мікробіологічних засобів підвищення урожаю бобових культур і призначений для виробництва бактеріального добрива під люпин.

В зв'язку з скороченням на Україні масштабів застосування мінеральних азотних добрив і суттєвими перевагами біологічного азоту у порівнянні з мінеральним азотом в екологічному і економічному плані, актуальним завданням є розширення виробництва і використання препаратів азотфіксуючих бактерій. Для їх створення необхідні нові активні та ефективні штами.

Серед азотфіксуючих бактерій найбільш важливе сільськогосподарське значення мають бульбочкові бактерії, які здійснюють фіксацію молекулярного азоту в симбіозі з бобовими рослинами.

Відомо використання симбіотичних азотфіксаторів для виробництва бактеріального препарату (ризоторфіну), який підвищує урожай різних видів бобових культур (зернобобових і багаторічних бобових трав) [1 - 3]. Його виготовляють на основі різних штамів бульбочкових бактерій.

Відомо застосування для виробництва ризоторфіну під люпин штам *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 367a [4]. Однак цей штам характеризується недостатньою азотфіксуючою активністю і ефективністю.

Відомий також виробничий штам *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 363a, який використовується для виготовлення ризоторфіну [5], але цей штам поступається новому штамму за своєю здатністю підвищувати урожай зеленої маси і вміст протеїну.

В основу винаходу поставлена задача одержання бактеріального добрива на основі штамму бактерій *Bradyrhizobium* sp. для інокуляції насіння люпину, яке підвищує урожай зеленої маси і насіння і вміст білку в урожаї цієї культури.

Поставлена задача вирішується тим, що штам *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 1629 для одержання бактеріального добрива під люпин, яким обробляється насіння цієї культури перед посівом, є активним симбіотичним азотфіксатором, який стабільно забезпечує підвищення урожаю зеленої маси і насіння люпину жовтого і білого в урожаї цієї культури в різних ґрунтово-кліматичних зонах.

Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 1629 одержано методом аналітичної селекції. Виділено з бульбочок люпину жовтого, нової гібридної лінії №4071, створеної селекціонерами Чернігівського НВО "Еліта". Люпин жовтий вирощували на дерново-підзолистому ґрунті (гумус - 0,9 - 1,2%, P_2O_5 - 7-12 мг, K_2O - 6-9 мг на 100г ґрунту, рН_{сол.} - 4,9-5,2).

При використанні запропонованого штамму *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 1629 підвищується урожай зеленої маси люпину в середньому на 30ц/га, вміст загального азоту - на 5%, накопичення протеїну - на 1,2ц/га, додатковий збір протеїну - на 40% у порівнянні з штамом *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 363a.

Новий штам виявляє більш високу ефективність у порівнянні з штамом 367a і забезпечує в польових і виробничих дослідах збільшення урожаю зеленої маси люпину на 29,0 -

42,0ц/га (17 - 35%) насіння на 2,4 - 5,9ц/га (15,7 - 30,2%), вмісту білку на 2 - 9%.

Штам бактерій *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) депоновано у Всеросійській колекції бульбочкових бактерій ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (реєстраційний номер 1629) і зберігається також в колекції штамів азотфіксуючих бактерій лабораторії біологічного азоту ІСГМ УААН.

Штам 1629 бульбочкових бактерій люпину вирощували в лабораторних умовах на щільному поживному середовищі такого складу, г:

K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,5; $MgSO_4$ - 0,2;

$NaCl$ - 0,2; $CaSO_4$ - 0,1; $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ - сліди, маніт - 20,0, агар-агар - 20,0, відвар насіння люпину - 100,0, вода водопровідна - до 1000,0 рН 7,0 - 7,2. Режим стерилізації - при 0,5атм 20хв. Для приготування відвару люпину 50г пророщеного сухого насіння білого (бізакалоїдного) люпину заливали 1л водопровідної води і кип'ятили протягом 30хв.

Культурально-морфологічні ознаки штамму.

При посіві штрихом на люпиновому агарі, зазначеного складу, ріст слизистий, що обумовлено продукуванням екзополісахаридів, щільний, білого кольору. На чашках Петрі колонії на 9 - 10 добу росту круглої форми, дрібні (2 - 3мм в діаметрі), компактні, край їх рівний, поверхня опукла, гладка.

Клітини рухомі (перитрихи), мають форму паличок, злепка зігнутих, розміром 0,5 - 0,8 × 2,2 - 2,8мкм. При старінні культури клітини стають поліморфними, втрачають рухомість.

На МПА і МПБ штам не росте. На молоці з лакмусом реакція середовища лужна, на поверхні молока слизиста зона відсутня.

Бактерія неспороносна. За Грамом не забарвлюється.

Фізіолого-біохімічні ознаки штамму *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 1629.

Аероб. Метаболізм дихальний. Оптимальна температура росту 26 - 28°, оптимум рН 6,8 - 7,2.

Відношення до джерел вуглецю. Як джерела вуглецевого живлення використовує глюкозу, арабінозу, фруктозу, сахарозу, манніт з підкисленням середовища, при використанні сорбіту, мальтози, лактози, рафінози реакція середовища - слабо лужна. Крохмаль і целюлозу не гідролізує.

Відношення до джерел азоту. Штам росте на середовищах з мінеральним азотом (амонійними солями, нітратами і органічними азотвмісними речовинами - сечовиною і амінокислотами (аспарагіном, аланіном, пістидіном, глутаміновою кислотою). Казеїн і желатин не гідролізує. Не потребує присутності в середовищах вітамінів групи В. Температурний оптимум 26 - 28°C. Межі рН 6,0 - 7,7, оптимальні значення рН 6,8 - 7,2.

Штам ідентифіковано за Визначником Бергі. Належить до повільноростучих бульбочкових бактерій, зокрема до роду *Bradyrhizobium*. Утворює бульбочки на коренях люпину.

Зазначені ознаки штамму стійкі. Патогенних властивостей не має. Пересівали штам один раз в 6 місяців на середовище з люпиновим відваром і зберігали на тому ж середовищі при 4 - 6°C.

Ефективність штамму *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 1629 у порівнянні з відомим штамом 363a вивчали у вегетаційних і польових дослідах Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Ефективність нового штаму у порівнянні з відомим штамом 367а визначали також у польових дослідках наукових установ Географічної мережі дослідів по селекції азотфіксуючих мікроорганізмів і у виробничому досліді на базі Чернігівського НВО "Еліта". Препарат на основі зазначених штамів було виготовлено на експериментальному підприємстві Всеросійського НДІ сільськогосподарської мікробіології і на експериментальному обладнанні ІСГМ УААН.

Вироблення ризоторфіну включало такі основні етапи: одержання рідкої посівної культури, одержання рідкої робочої культури, інокуляція торфу.

Для одержання рідкої посівної культури було використано поживне середовище такого складу, %: гороховий відвар - 10,0, цукор - 0,05, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 0,05, $MgSO_4 \times 7H_2O$ (харчовий) - 1,0, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1, KH_2PO_4 - 0,02, $CaCO_3$ (стерильний) - 0,03, вода водопровідна до 100. Режим стерилізації - 1,0атм 30хв, рН - 6,5 - 6,8.

Середовище зазначеного складу розливали по 200мл в колби об'ємом на 750мл і засівали культурою бактерій, яку вирощували у пробірках на агаризованому середовищі з відваром насіння люпину (на кожну колбу - змив клітин бактерій з однієї пробірки).

Посівну культуру вирощували в колбах на кругових качалках (180 - 200об/хв) при температурі 25 - 26°. Титр посівної культури знаходився в межах 5 - 8млрд клітин в 1мл середовища.

Посівну культуру використовували для одержання рідкої робочої культури.

Рідку робочу культуру було одержано шляхом засіву посівною культурою середовища такого складу, %: кукурудзяний екстракт - 1,0, меласа - 2,0, пекарські дріжджі - 0,05, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1, KH_2PO_4 - 0,025, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 0,025, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,02, $CaCO_3$ - 0,02, вода водопровідна - до 100,0, рН - 6,5 - 6,8. Кількість посівної культури - 3 - 5% від об'єму середовища, але не менше, ніж 200млн клітин на 1мл середовища.

Робочу культуру вирощували в бутелях об'ємом на 3л (об'єм середовища 1л) на кругових качалках (180 - 200об/хв) 3 - 4 доби при температурі 25 - 26°. Титр її складав 8 - 10млрд клітин в 1мл середовища.

Одержана описаним способом робоча культура бульбочкових бактерій люпину на основі нового штаму 1629, а також відомих штамів 363а і 367а була використана для інокуляції торфу.

Для виготовлення препарату використовували торф як субстрат і наповнювач. Його висушували до повітряно-сухого стану, просівали через сито з діаметром ячійок 5 - 15мм, потім подрібнювали так, щоб розмір часток не перевищував 0,1мм. Висока ступінь дисперсності торфу необхідна для утримання препарату на насінні. Розмолотий торф завантажували у змішувач, зволожували (35 - 40%), нейтралізували крейдою, ретельно перемішували, розфасовували у поліетиленові пакети по 400 - 800г і запаювали. Пакети з торфом стерилізували гама-опроміненням при дозі 2,5Мрад. Стерильний торф інокулювали культурою бульбочкових бактерій.

Кількість життєздатних і активних клітин в

ризоторфіні, який було виготовлено на основі нового штаму бульбочкових бактерій 1629 і відомих штамів 363а і 367а, складала 3 - 5млрд в 1г торфу. Препарат використовували для передпосівної інокуляції насіння. Умови інокуляції штамми 363а, 367а такі самі, як і для запропонованого штаму.

Приклади конкретного застосування штаму *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) 1629.

Приклад 1. Вегетаційний дослід було проведено в умовах теплиці в сосудах ємкістю 5л на чистому річному піску, в який вносили суміш мінеральних солей за Прянішніковим. Вологість піску підтримували на рівні 60% від повної вологоємності (ПВ). Висівали люпин білий, сорт Київський мутант.

В кожному сосуді вирощували по 5 рослин. Повторність дослідів - 5-разова.

Облік урожаю проводили в фазу бутонізації - початку цвітіння. Ефективність штаму визначали по урожаю сухої надземної маси.

Результати вегетаційного дослідів наведено в табл.1.

З табл.1 видно, що інокуляція насіння люпину новим штамом 1629 суттєво підвищила урожай зеленої маси (сухої речовини), а саме - на 41% у порівнянні з контролем (без інокуляції) і на 27% у порівнянні з стандартним штамом. Одночасно з цим при використанні нового штаму відбулося збільшення на 6% вмісту загального азоту в урожаї. При інокуляції люпину штамом 363а достовірно збільшений урожай отримано не було.

Приклад 2. Польовий дослід було проведено в 1987р. на чорноземі опідзоленому малогумусному легкосуглинистому Бобриницького сільськогосподарського Чернігівської області (гумус 2,6%, P_2O_5 - 20,4 мг, K_2O - 10,5 мг/100 г ґрунту, рН_{сол.} - 5,01).

Облікова площа ділянки 18м². Ділянки в досліді розміщували методом рендомізованих повторень. Повторність дослідів 4-разова, сорт люпин білий - Київський мутант.

При передпосівному обробітку ґрунту вносили фосфорно-калійні добрива з розрахунку 60кг/га діючої речовини.

Насіння люпину перед посівом обробляли ризоторфіном (водною суспензією препарату), який було виготовлено на основі стандартного штаму 363а і нового штаму 1629. Насіння контрольного варіанту (без інокуляції) обробляли водою. При інокуляції насіння стандартним штамом 363а дотримували ті ж умови, що і в варіанті з запропонованим штамом 1629.

Облік урожаю зеленої маси проводили у фазу бутонізації - початок цвітіння.

Дані про урожай зеленої маси люпину, вміст загального азоту і протеїну в урожаї представлені в табл.2.

Як свідчать одержані результати, передпосівна інокуляція насіння люпину штамом 1629 бульбочкових бактерій значно підвищила урожай зеленої маси цієї культури: на 41% у порівнянні з контролем (без інокуляції) і на 24% у порівнянні з стандартним штамом. Крім того, як видно з табл.2, встановлено позитивний вплив передпосівної обробки насіння цим штамом на вміст загального азоту і накопичення протеїну в урожаї: загальний азот в рослинах контрольного варіанту становив 2,19%, у варіанті з стандартним штамом - 2,27%, а у варіанті зі штамом 1629 - 2,42%. При застосуванні нового штаму додатковий збір протеїну в урожаї

становив 3,5ц/га, тоді як при застосуванні штам-еталону - лише 1,1ц/га.

Приклад 3. Більш високу ефективність нового штам 1629 у порівнянні з стандартним штамом 363а було показано також в польовому досліді 1988р. Умови його проведення ті ж, що і в прикладі 2.

Як видно із табл.3, у варіанті з новим штамом урожай зеленої маси люпину був на 28,7ц/га або на 11% більше, ніж у варіанті з штамом 363а. Додатковий збір протеїну становив 1,1ц/га.

Приклад 4. Польовий дослід було проведено в 1989р. на дерново-підзолистому піщаному ґрунті дослідного господарства ІСГМ УААН (гумус - 0,6%, P_2O_5 - 20,8мг, K_2O - 13,8мг на 100г ґрунту, рНсол. - 6,2). Облікова площа ділянки 18м². Ділянки в досліді розміщували методом рендомізованих повторень. Повторність - 4-разова, сорт люпину білого - Київський мутант. При обробці ґрунту перед посівом вносили фосфорно-калійні добрива (60кг/га діючої речовини).

Як і в попередніх дослідях, насіння люпину в день посіву обробляли водною суспензією ризоторфіну, виготовленою з використанням стандартного штам 363а і нового штам 1629. Насіння контрольного варіанту (без інокуляції) обробляли водою. Облік урожаю зеленої маси люпину проводили у фазу бутонізації - початку цвітіння.

Одержані результати дослід (табл.4) свідчать про ефективність нового штам 1629: збільшення урожаю зеленої маси становило 24,7ц/га або 39% по відношенню до контролю (без інокуляції) і 14,4ц/га або 20% по відношенню до стандартного штам 363а. У варіанті дослід з новим штамом суттєво збільшився вміст загального азоту в урожаї (на 5%), накопичення протеїну (на 1,2ц/га) і додатковий його вихід (на 27%) у порівнянні з стандартним штамом.

Приклад 5. Поряд з вегетаційним і польовими дослідями було проведено виробниче випробування ефективності нового штам 1629 бульбочкових бактерій люпину на базі дослідного господарства Чернігівського НВО "Еліта" на посівах люпину жовтого новоствореного ранньостиглого фузаріозостійкого сорту Гай. Площа - 15га, ґрунт - дерново-середньопідзолистий. Люпин вирощували за інтенсивною технологією.

Результати виробничого випробування (табл.5) показали, що новий штам 1629 бульбочкових бактерій люпину в умовах 1993р. мав вищу ефективність порівняно з стандартним штамом 367а. Інокуляція посівного матеріалу люпину жовтого новим штамом сприяла підвищенню врожаю насіння на 2,4ц/га при врожаї на контролі (інокуляція насіння стандартним штамом 367а) 15,2ц/га. Вміст загального азоту в насінні люпину випробованого штам склав 6,71%, а контрольного - 6,43%. Поряд з підвищенням врожаю покращилася і якість насіння: вміст білку на випробованому варіанті становив 41,9%, а на контролі - 40,2%.

Запропонований штам 1629 було випробовано у порівнянні зі штамом 367а в польових дослідях наукових установ Географічної мережі дослідів з азотфіксуючими мікроорганізмами - (ВНДІСГМ) на протязі 1990 - 1992рр. При цьому було встановлено більш високу ефективність нового

штаму (табл.6 - 7).

Приклад 6. В польовому досліді Географічної мережі дослідів по вивченню ефективності бульбочкових бактерій в 1992р. при інокуляції люпину штамом 367а було одержано урожай зеленої маси 119,0ц/га, тоді як у варіанті з новим штамом 1629 - 161,0ц/га, тобто на 42,0ц/га або на 35,2% більше (табл.6). Одночасно з цим поліпшилась якість урожаю зерна, зокрема збільшився вміст білку.

Приклад 7. В польовому досліді з люпином в ідентичних умовах проведено порівняльне вивчення ефективності штамів 367а і 1629. Як видно з одержаних даних (табл.7), встановлено математично достовірне збільшення урожаю зерна у варіанті зі штамом 1629 у порівнянні з урожаем у варіанті зі штамом 367а.

Приклад 8. При використанні нового штам 1629 для інокуляції насіння люпину в ряді польових дослідів Географічної мережі дослідів з азотфіксуючими мікроорганізмами спостерігалось суттєве збільшення білку в урожаї. Так, наприклад, в польовому досліді 1991р. на дерново-підзолистому середньо-суглинистому ґрунті у варіанті з штамом-еталоном 367а вміст білку в урожаї зерна становив 36,7%, тоді як у варіанті з новим штамом 1629 - 40,2%, тобто на 9% більше. У відповідності з рішенням наради Міжвідомчої комісії Географічної мережі дослідів по селекції азотфіксуючих мікроорганізмів (Санкт-Петербург, ВНДІСГМ, 26 - 27 січня 1993р.) штам бульбочкових бактерій люпину 1629 (авторський номер 4071/40) селекції ІСГМ УААН за результатами конкурсних випробувань рекомендовано як перспективний виробничий штам.

Варіанти	Урожай сухої надземної маси, г/сосуд	до кон	
		г	
Контроль (без інокуляції)	2,7	-	
Стандартний штам 363а	3,0	0,3	
Новий штам 1629	3,8	1,1	

НCP₀₅ = 0,7 г

Варіанти	Уро- жай зеле- ної маси, ц/га	Збільшення урож		
		до контролю		до ста
		ц	%	ш
Контроль (без інокуляції)	229,5	-	-	-
Стандартний штам 363а	255,0	25,5	11	-
Новий штам 1629	283,7	54,2	23	28,7

НCP₀₅ = 27,7 ц/га

Варіанти	Уро- жай зеле- ної маси, ц/га	Збільш	
		до контролю	
		ц	%
Контроль (без інокуляції)	237,3	-	-
Стандартний штам 363а	270,2	32,9	14
Новий штам 1629	336,2	98,9	41

НCP₀₅ = 55 ц/га

Варіанти	Уро- жай зеле- ної маси, ц/га	Збільшення урож		
		до контролю		до ста
		ц	%	ш
Контроль (без інокуляції)	63,3	-	-	-
Стандартний штам 363а	73,6	10,3	16	-
Новий штам 1629	88,0	24,7	39	14,4

НCP₀₅ = 12,2

Варіанти	Врожай насіння, ц/га	Збільшення	
		ц/га	
Інокуляція насіння стандартним штамом 367а	15,2	-	
Інокуляція насіння новим штамом 1629	17,6	2,4	

Таблиця 6

Ефективність інокуляції люпину бульбочковими бактеріями
(за результатами конкурсних випробувань Географічної мережі дослідів
з азотфіксуючими мікроорганізмами, 1992 р.).

Варіанти дослідів	Урожай зеленої маси	Збільшення урожаю		Білок, %
		ц/га	%	
Штам – еталон 367а	119,0	–	–	43,9
Новий штам 1629	161,0	42,0	35,2	44,8

$HC_{P05} = 16,3$

Таблиця 7

Ефективність нового штаму 1629 бульбочкових бактерій люпину
в польовому досліді (Географічна мережа дослідів з азотфіксуючими
мікроорганізмами, 1992 р.)

Варіанти дослідів	Урожай зерна, ц/га	Збільшення урожаю	
		ц/га	%
Штам – еталон 367а	19,5	–	–
Новий штам 1629	25,4	5,9	30,2

$HC_{P05} = 0,7$