



УКРАЇНА

(19) UA (H) 13298 (13) CI

(51) C 05 F 11/08; C 12 N  
1/20ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ RHIZOBIUM MELILOTI ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД ЛЮЦЕРНУ

1

(20)95320611, 15.09.93

(21)4855995/SU

\* " \*

(22)01.08.90

(24) 28.02.97

(46)28.02.97. Бюл. № 1

(56) 1. Авторское свидетельство СССР  
ГМ= 549454, кл. C 05 F 11 /08, 25.05.77.2. Авторское свидетельство СССР ISfe  
1543915 н.п., кл. C 05 F 11/01. 16.11.87  
(прототип).(72) Старченков Юхим Полікарпович, Нічик  
Майя Михайлівна, Петерсон Олена Володи  
мирівна, Яковець Лідія Михайлівна, Воро  
бей Надія Анатольевна, Коць Сергій  
Ярославович(73) Інститут фізіології рослин і генетики Ака  
демії наук України (UA)(57) Штамм бактерій Rhizobium meliloti  
ВНИИСХМ-4 для отримання бактеріально-  
го добрива під люцерну.

Изобретение относится к сельскому хозяйству, а именно к микробиологическим средствам повышения урожая бобовых культур и представляет собой новый штамм Rhizobium meliloti 4 предназначенный для промышленного изготовления бактериального препарата клубеньковых бактерий - ризоторфина для люцерны.

Известен штамм Rhizobium meliloti 425a [1]. По средним данным за 2 года испытаний в полевых условиях эффективность штамма составила 65,4 ц/га сена, прибавка урожая - 14,5%.

Недостатком известного штамма является невысокая азотфиксирующая активность, низкая эффективность и нестабильность урожая люцерны при бактерилизации этим штаммом.

Наиболее близким к заявляемому штамму является штамм Rhizobium meliloti 1755 [2].

Культурально-морфологические признаки штамма:

Штамм клубеньковых бактерий Rhizobium meliloti 1755 растет на питательных средах: бобовый агар.

Штрих обильный, блестящий. Величина колоний на 2-3 сутки до 1 мм, круглые по форме, гладкие, блестящие, беловато-серого цвета, слизи немного. К 15 суткам величина колоний увеличивается до 5 мм в диаметре, некоторые колонии начинают растекаться. Величина клеток 3-суточной культуры на боковом агаре - 0,8-1,5 x 0,5 - 0,7 мк. Палочки в молодом возрасте подвижные. Бактериоидные формы ветвистые. Грамотрицательные. Культура быстрорастущая. На мясо-пептонном агаре бактерии растут, но слабо, имеют скудный штрих с кремоватым оттенком. Край колоний гладкие. Штамм хорошо растет на жидких средах с кукурузным экстрактом, и мелассой. Физиолого-биохимические признаки: Аэроб. Оптимум температуры и pH среды для роста штамма 26-28°C и 6,8 - 7,2 соответственно. Штамм растет также на среде Эшби и крахмалоаммиачном агаре. Молоко с лакмусом не пептонизирует. Желатину не разжимает. Относится к источникам углерода: усваивает сахарозу, глюкозу, лактозу, манозу, мальтозу. Крахмал не гидролизует. Относится к источникам азота -

C  
>

00

O

использует азотокислотные и аммонийные соли, аспрагин. Признаки устойчивые. Штамм не патогенен.

Штамм *Rhizobium meliloti* 1755 по сравнению со штаммом 425а более эффективен: урожай люцерны повышает на 5,8 - 8,5%, накопление сырого протеина выше в 1,2-1,4 раза, усвоение азота воздуха протекает в 4 раза активнее при инокуляции растений этим штаммом по сравнению с 425а. Одновременно улучшаются кормовые достоинства укосной массы за счет большего накопления каротиноидов (на 6,7 - 21,1%), Урожай зеленой массы люцерны штамм увеличивал на 26 - 50 ц/га, сбор протеина - на 1,9 - 9,3 ц/га в мелких и крупных опытах, а в производственных условиях <sup>TM</sup> на 20 - 50 ц/га.

Задачей изобретения является получение нового штамма клубеньковых бактерий люцерны, обладающего высокой азотфиксирующей активностью и позволяющего стабильно повышать урожай люцерны, давать большие прибавки урожая при высоком содержании азота в почве.

Поставленная задача достигается тем, что штамм *Rhizobium meliloti* 4 получен с использованием генетико-селекционных приемов (путем межродовой конъюгации и многоступенчатого отбора) из штамма *Rhizobium meliloti* 425а - симбиотического азотфиксатора, используемого для производства бактериального удобрения ризоторфина под люцерну.

Полученный штамм бактерий *Rhizobium meliloti* 4 депонирован в коллекции микроорганизмов при научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии России под номером 4 (бывший Всесоюзный НИИ сельскохозяйственной микробиологии ВЛСХНИЛ) в группе азотфиксирующих микроорганизмов.

Штамм *Rhizobium meliloti* 4 характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками: культура бактерий - не споросная, граммотрицательная, клетки имеют палочковидную форму, размер палочек 0,5 - 1,2 мкм, палочки подвижны, имеют 2 - 6 перитрихальных жгутиков.

Культура аэробная, быстрорастущая, устойчива к антибиотикам; штамм не патогенен.

Культивируемая на бобовом агаре при температуре 26-27°C в течение 3-4 дн. Температурный диапазон роста 20 - 28°C. Оптимальная pH 7,2, диапазон pH 6,6 - 7,4.

Из бобовом и мясо-пептонном агаре и синтетических средах (среда Чапека) колонии круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, беловатые.

На мясо-пептонном бульоне рост бактерий характеризуется помутнением среды, цвет которой остается неизменным,

В отличие от штамма-аналога (базового штамма) культура *Rhizobium meliloti* 4 не разжижает желатину, не гидролизует крахмал. Слабо образует сероводород, обладает уреазной активностью, гидролизует казеин, подкисляет молоко с лакмусом.

Культура клубеньковых бактерий *Rhizobium meliloti* 4 восстанавливает нитраты.

На жидкой среде Норриса усваивает глюкозу, мальтозу, маннит, слабо усваивает сахарозу.

Культуру хранят на маннитно-дрожжевом агаре (МДА) (pH 7,0) или среде № 79 (pH 7,2) под минеральным маслом при комнатной температуре. Пересевуют один раз в год. Добавляют антибиотики - стрептомицин сульфат - 500 мкг/мл, капамици сульфат - 30 мкг/мл, тетрациклин - 20 мкг/мл.

После 15 пересевов на среде № 79 без антибиотиков штамм *Rhizobium meliloti* 4 хорошо растет на этой же среде с добавлением антибиотиков, т.е. устойчивость к антибиотикам является стабильным признаком. Предлагаемый штамм хорошо растет на среде № 79 с добавлением трех антибиотиков стрептомицина, канамицина и тетрациклина, образуя белые слизистые колонии. Изучение устойчивости предлагаемого штамма к антибиотикам в условиях симбиоза (стерильный микровегетационный опыт) показало, что все реизолаты из клубенька 30-дневных растений люцерны сорта Зайкевич сохраняют устойчивость к трем перечисленным выше антибиотикам.

Электрофоретическое разделение плазмидной ДНК показало, что в отличие от штамма-аналога предлагаемый штамм содержит кроме 2-х мегаплазмид дополнительную плазмиду с меньшей молекулярной массой.

Штамм *Rhizobium meliloti* 4 идентифицирован по определителю Берги, 1980, М.: "Мир".

Таким образом, штамм *Rhizobium meliloti* 4 отличается от штамма 425а физиолого-биохимическими и генетическими признаками, а также более высокой азотфиксирующей активностью и эффективностью (увеличивает урожай на 10-30%, табл. 1 - 4).

Предлагаемый штамм сохраняет морфологические, культурально-биохимические, генетические и симбиотические свойства в течение 5 лет.

Пример Штамм *Rhizobium meliloti* 4 выращивали на питательной среде маннитно-дрожжевом агаре (МДА) при 27°C 3-4

дня в пробирках, затем смывали стерильной водой с агара и готовили густую суспензию, которой засеивали матрасы с МДА (объем -1,5 л). Состав среды МДА. г/л: дрожжевой экстракт - 1, маннит - 10, агар - 15-20, 5  $K_2HPO_4$ -0,5,  $MgSO_4$  - 7H<sub>2</sub>O-0,2. NaCl-0,1, дистиллированная вода до 1 л, pH - 7,0.

Инкубировали 3-4 дня при температуре 27°C. Готовили густую суспензию (50 мл), смывая культуру с агара стерильной водой. 10 В хорошо измельченный, перемешанный торф (200-300 г/га) вводили стерильной пипеткой или шприцем 50 мл суспензии и хорошо перемешивали. Приготовленный таким образом ризоторфин помещали в тер- 15 мостат на 3-5 дней при температуре 27°C. После термостатирования проверяли титр бактерий-в 1 г торфа должно быть не менее 1-1,5 млрд. клеток *Rhizobium meliloti* 4 - й инокулировали семена. Для этого гектар- 20 ную норму семян увлажняли (1-2% от веса семян) и равномерно перемешивали с ризоторфином, подсушивали в тени и высевали в почву.

Эффективность штамма *Rhizobium meliloti* 4 проверяли в микровегетационных (перлит, среда Красильникова-Кореняко) и вегетационных опытах на речном промытом песке и почве (смесь Гельригеля с 0,2 нормами азота), а также в полевых опытах на 30 темно-серой оподзоленной среднесуглинистой почве (Львовская обл., 1986-1989 гг.) и на серой оподзоленной (лесной) супесчаной почве (Киевская обл., 1988-1989 гг.). В этих почвах распространены довольно агрессив- 35 ные расы спонтанных форм клубеньковых бактерий люцерны.

Азотфиксирующую активность предлагаемого штамма определяли в микровегетационных и вегетационных опытах по 40 редукции ацетилена в этилен. Как видно из табл. 1 штамм *Rhizobium meliloti* 4 вступает в эффективный симбиоз с люцерной, активно фиксирует атмосферный азот и по ацетиленовосстанавливающей активности превосходит 45 штамм-стандарт в 1,0 раза, в результате чего повышается урожай зеленой массы растений на 15,8% по сравнению со штаммом-стандартом и увеличивается содержание общего азота в сене на 0,65% (фиг.).

На фиг. видно, что расстояния сорта Херсонская 7 инокулированную предлагаемым штаммом (сосуды 2, 4), крупные, образуют больше зеленой массы чем при инокуляции штаммом *Rhizobium meliloti* 425a (сосуды 3 и 5).

Результаты полевых опытов по изучению эффективности штамма в различных почвенно-климатических условиях приведены в табл. 2 и табл. 3. Из табл. 2 и 3 видно, что предлагаемый штамм по эффективности превосходит базовый штамм Новый штамм *Rhizobium meliloti* 4 на протяжении всего периода исследований достоверно повышает урожай зеленой массы люцерны в полевых условиях. В зависимости от почвенно-климатической зоны прибавка урожая зеленой массы при инокуляции предлагаемым штаммом составляет от 36 до 84 ц/га (10-30%) по сравнению со штаммом 425a (табл. 2 и 3). Растения, инокулированные штаммом *Rhizobium meliloti* 4 отличались также высоким содержанием общего азота (табл. 3).

Эффективность штамма *Rhizobium meliloti* 4 в 1986-1989 гг. изучали также при внесении в почву повышенных доз минерального азота (N60). Как видно из табл. 4, предлагаемый штамм повышает урожай сена и при внесении 60 кг/га минерального азота. В зависимости от сорта прибавка урожая составила 6-7 ц/га (9,5-13,7%) Инокуляция предлагаемым штаммом *Rhizobium meliloti* 4 увеличивала также содержание азота в сене люцерны и обеспечивала высокий сбор протеина (табл. 4).

В результате проведенных исследований установлено, что предлагаемый штамм *Rhizobium meliloti* 4 по эффективности превосходит штамм-прототип *Rhizobium meliloti* 1755. Новый штамм характеризуется более высоким уровнем азотфиксирующей активности, увеличивает урожай зеленой массы и сена люцерны на 10-30% при одновременно высоком содержании сырого протеина в продукции. Предлагаемый штамм устойчив к повышению концентрации азота в почве и обеспечивает при этом большие прибавки урожая люцерны

Таблица 1

Урожай зеленой массы люцерны сорта Херсонская в вегетационном опыте, 1986 год

Варианты	Урожай по повторностям, г/сосуд					Средний	Прибавка к контролю		Азотфиксирующая активность, мкн* C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> раст. ч. <sup>1</sup>	Содержание азота в сене, %
	1	II	III	IV	V		Г/сосуд	о/о		
1. Без инокуляции (конт- роль)	85,4	86,3	86,2	85,7	85,2	85,8			0,95 ± 0,03	2,15
2. Базовый штамм Rhizobium mellotJ 425a	96,4	93,5	93,5	92,2	92,0	93,5	▪		3,94 ± 0,25	2,93
3. Предлагаемый штамм Rhizobium melloti 4	107,2	108,7	106,8	110,2	108,5	108,3	22,5	26,2	7,15 ± 0,40	3,58
НСР <sub>05</sub> , г/сосуд Р %						1,81 0,6				

то  
со

со

Т а б л и ц а 2

Урожай зеленой массы люцерны сорта Зайкович, 1988 г (опытное сельскохозяйственное производство АН УССР)

Варианты опыта	Урожай по повторностям, ц/га					Средний урожай, ц/га	Прибавка к контролю	
	I	II	N1	IV	V		ц/га	%
1. Контроль (спонтанная инокуляция)	316	344	322	339	328	330		
2. Базовый штамм <i>Rhizobium meliloti</i> 425a	327	334	309	347	334	330		
3. Предлагаемый штамм <i>Rhizobium meliloti</i> 4	358	358	368	385	359	366	36	10.9
НСР <sub>05</sub> , ц/га Р, %						13,5 1,2		

Т а б л и ц а 3

Урожайность зеленой массы люцерны сорта Зайкевича, 1988 г (Львовская обл.)

Варианты опыта	Урожай по повторностям, ц/га			Средний урожай, ц/га	Прибавка к контролю		Содержание азота в сене. %
	I	II	III		ц/га	%	
1. Контроль (спонтанная инокуляция)	289	288	282	286			3.04
2. Базовый штамм <i>Rhizobium meliloti</i> 425a	280	290	284	285			2.92
3. Предлагаемый штамм <i>Rhizobium meliloti</i> 4	367	380	360	369	83	29,0	3.08
НСР <sub>05</sub> , Ц/га Р, %				11.7 1			

Таблица 4

Влияние повышенных доз минерального азота (Нео кг/га) и инокуляции на урожай сена люцерны, 1988 г (Львовская обл )

Варианты опыта	Сорт Зайкевича				Сорт Ярославна			
	сред- ний уро- жай, ц/га	Прибавка к кон- тролю		сбор протеи- на, ц/га	сред- ний уро- жай, ц/га	Прибавка к кон- тролю		сбор протеи- на, ц/га
		ц/га	%			ц/га	%	
1. Контроль (спон- танная инокуляция)	60			11,8	51			9,4
2. Базовый штамм Rhizobium meliloti 425a	63			10,0	51			9,3
3. Предлагаемый штамм Rhizobium meliloti 4	69	9	15	11,1	58	7	13,7	10,9
НСР <sub>05</sub> , ц/га	2,6				2,1			
P, %	1,5				1,2			



Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор Н. Король

Замовлення 4108

Тираж  
Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Підписне

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101