



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95878 (13) C2
(51) МПК
A01N 63/02 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *BRADYRHIZOBIUM*

1

(21) а201013063

(22) 03.11.2010

(24) 12.09.2011

(46) 12.09.2011, Бюл.№ 17, 2011 р.

(72) ДРАГОВОЗ ІГОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, ЛЕОНОВА НАТАЛІЯ ОСИПІВНА, ІУТИНСЬКА ГАЛИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ЯВОРСЬКА ВІКТОРІЯ КАЗИМИРІВНА

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) Hardy R., Holsten R., Jackson E. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiology. - 1968. - Vol. 43, № 8. - P. 1185-1207 (23 стор.)

UA 39199 C2, 15.06.2001 (7 стор.)

Моргун В.В. и др.. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений 2009 Т.41. №3 С. 187-207 (21 стор.)

Майстренко Г.Г. и др. Сезонная динамика азотфиксирующей активности и ультраструктуры корневых клубеньков растений семейства Elaeagnaceae, Вестник ВОГиС, 2009, Том 13, №4 (7 стор.)

Волкогон та ін. Баланс ІОК та зеатину в рослинах сої за інокуляції насіння різними штамми й мутантами *Bradyrhizobium japonicum* // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т.41. №5. С. 408-416 (9 стор.)

2

(57) 1. Спосіб визначення біологічної активності бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* за результатами визначення біохімічного показника, який **відрізняється** тим, що він передбачає вирощування досліджуваних штамів на стандартному поживному середовищі, відокремлення культурального середовища від біомаси мікроорганізмів та визначення біохімічного показника, яким є питоме продукування фітогормонів класу цитокінінів у культуральне середовище.

2. Спосіб згідно з пунктом 1, який **відрізняється** тим, що здійснюють визначення питомого продукування у культуральне середовище цитокініну зеатину, при цьому питоме продукування зеатину на рівні > 60,0 мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму.

3. Спосіб згідно з пунктом 1, який **відрізняється** тим, що здійснюють визначення питомого продукування у культуральне середовище цитокініну зеатинрибозиду, при цьому питоме продукування зеатинрибозиду на рівні > 200,0 мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму.

4. Спосіб згідно з пунктом 1, який **відрізняється** тим, що здійснюють визначення питомого продукування у культуральне середовище цитокініну ізопентеніладеніну, при цьому питоме продукування ізопентеніладеніну на рівні > 0,5 мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму, за відсутності синтезу ізопентеніладеніну штам визначають як неактивний або малоактивний.

Винахід належить до сільськогосподарської мікробіології, зокрема до способу визначення біологічної активності штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium*, та може використовуватися для прогнозування ефективності бобово-ризобіального симбіозу при створенні біологічних препаратів на основі ґрунтових мікроорганізмів. Такий спосіб дозволить здійснювати надійний відбір активних штамів мікроорганізмів для створення максимально ефективних препаратів для підвищення врожайності рослин з мінімальними затра-

тами.

Як відомо, одним із сучасних напрямків розвитку екологічного землеробства є впровадження мікробних препаратів, які сприяють інтенсифікації сільськогосподарського виробництва та збереженню родючості ґрунтів. Застосування у рослинництві мікробних препаратів, створених на основі ґрунтових мікроорганізмів, які стимулюють ріст і розвиток рослин, є одним із важливих агроприйомів підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, зокрема зернобобових та зернових.

(13) C2

(11) 95878

(19) UA

Перспективними є дослідження, які направлені на створення високопродуктивних агрофітоценозів шляхом розробки ефективної симбіотичної системи рослина-мікроорганізми. В умовах сучасного землеробства для підвищення симбіотичного потенціалу мікробно-рослинних систем актуальним є створення композиційних препаратів на основі високоефективних штамів ґрунтових мікроорганізмів, які мають широкий спектр біологічної активності. При цьому підвищення врожайності сільськогосподарських культур у значній мірі залежить від їх забезпеченості елементами мінерального живлення, передусім - азотом. Джерелом екологічно чистого азоту у ґрунті є мікроорганізми, що здатні до фіксації молекулярного атмосферного азоту. З цієї точки зору актуальним є створення препаратів, які містять високоефективні штами азотфіксуючих мікроорганізмів та можуть забезпечити суттєве підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин.

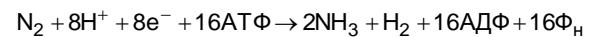
Найбільший внесок у біологічну фіксацію азоту здійснюють бульбочкові бактерії (ризобії). Ризобії є грамнегативними бактеріями, які утворюють бульбочки з рослинами родини бобових. Здатна до фіксації азоту бульбочка складається з (1) інфікованої бактеріями тканини, (2) провідної тканини, завдяки якій здійснюється постачання вуглеводів та відбувається відтік продуктів азотфіксації, (3) меристеми, за рахунок якої йде ріст бульбочки.

Бульбочкові бактерії витрачають 3-4 г вуглеводів на 1 г азоту, у той час, як вільноіснуючі азотфіксуючі мікроорганізми витрачають 50-100 г вуглеводів на 1 г азоту. Це пов'язано з тим, що у вільноіснуючих азотфіксаторів фіксація азоту відбувається у процесі їх росту, тому велика кількість енергії витрачається на цей ріст. Крім того, для створення сприятливих умов для активності ферменту нітрогенази, що бере участь у фіксації азоту, для зниження парціального тиску кисню посилюється дихання, що також пов'язано із втратою енергії. Такі витрати енергії відсутні у бульбочкових бактерій, оскільки фіксація азоту відбувається у бактероїдах (клітинах, що припинили свій ріст), а всередині бульбочок створюються сприятливі умови для активності нітрогенази, у тому числі знижений вміст кисню. Є також суттєвим той факт, що азот, який фіксується бульбочковими бактеріями на 90-95 % передається бобовим рослинам. Бобові рослини, отримуючи трансформований азот від бульбочкових бактерій, не мають залежності або мають слабку залежність від забезпечення ґрунту мінеральним азотом, і тому можуть вирощуватися разом з іншими рослинами на ґрунтах, збіднених на доступні форми азоту. В залежності від виду та умов існування вони накопичують за рік від 10 до 40 кг зв'язаного азоту на гектар.

Слід зазначити, що біологічна активність штамів мікроорганізмів-азотфіксаторів є характеристикою, яка безпосередньо пов'язана з продуктивністю рослин. Тому визначення біологічної активності є дуже важливим для можливості застосування якомога більш ефективних штамів з метою одержання високих врожаїв бобових культур. Для характеристики біологічної активності штамів бульбочкових бактерій, зокрема роду *Bradyrhizobium*,

можуть використовуватися такі показники, як вірулентність штаму, нодуляційна здатність, симбіотична ефективність (маса бульбочок, маса надземної частини та коренів, продуктивність та якість зерна), проте ці показники не завжди об'єктивно відображають характеристику певних штамів. Так, немає прямої кореляції між високою вірулентністю певних штамів роду *Bradyrhizobium* та продуктивністю рослин.

Найбільш об'єктивним показником біологічної ефективності штаму ризобій є його висока нітрогеназна активність у симбіозі. Нітрогеназа є ферментом, який синтезується у бактероїдах та є каталізатором фіксації азоту:



Цей фермент складається з комплексу двох білків та вимагає для свого функціонування анаеробних умов. Аміак, що утворився в результаті здійснення процесу фіксації азоту, використовується для синтезу первинних амінокислот, перш за все, глутамінової, аспарагінової кислот та їх амінів. Нітрогеназа характеризується низькою субстратною специфічністю, тобто має здатність відновлювати широкий спектр сполук, наприклад перетворювати ацетилен на етилен. Вказана реакція використовується для визначення нітрогеназної активності ацетиленовим методом. При цьому ацетилен відновлюється тільки до етилену, який піддається кількісному визначенню за допомогою газової хроматографії (Hardy R., Holsten R., Jackson E. et al. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiology*. - 1968. - Vol. 43, № 8. - P. 1185-1207). Для цього наважку бульбочок (100 мг вологої маси), утворення яких індукували при інокуляції досліджуваним штамом, поміщають у флакони на 15 мл з вакуумним затвором, в які додають ацетилен - 10 % до загального об'єму. Інкубацію проводять в термостаті при температурі 30 °C протягом 1 години. Реакцію зупиняють шляхом введення 1 мл 5 % трихлороцтової кислоти. Етилен, що утворився, визначають за допомогою методу газової хроматографії на хроматографі "Хром 5". Як газ-випитиснювач використовують гелій, витрата 35 мл/хв. Повторність вимірювань 8-10-кратна. При цьому біологічну активність виражають у нмолях етилену, що утворився на 1 г вологої маси бульбочок за 1 годину інкубації. Описаний спосіб вибраний як прототип запропонованого винаходу. Він забезпечує отримання об'єктивного показника біологічної активності штамів бульбочкових бактерій, де як біохімічний маркер використовують активність ферменту нітрогенази. Проте зазначений спосіб має ряд недоліків, зокрема:

- вимірюється потенційна, а не фактична азотфіксуюча активність, а відтак це не є прямим показником активності ферменту нітрогенази та кількості засвоєного амонію;

- висока (інколи до 60 %) розбіжність аналітичних повторностей в межах аналізу одного варіанту досліду, що передбачає набір великого масиву даних;

- якість вимірювання ацетилену

відновлювальної активності істотно залежить від підготовки зразків до аналізу (час підготовки зразків, температура та термін інкубації, тощо).

Задачею винаходу є підвищення надійності оцінки біологічної активності при одночасному спрощенні способу.

Вирішення вказаної задачі забезпечується за рахунок того, що спосіб визначення біологічної активності штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* згідно із запропонованим винаходом передбачає культивування досліджуваних штамів на стандартному поживному середовищі, відокремлення культурального середовища від біомаси мікроорганізмів та визначення питомого продукування цитокінінів, зокрема зеатину або зеатинрибозиду, або ізопентеніладеніну у культуральне середовище, при цьому високоефективні штами характеризуються більш високою здатністю до синтезу зазначених цитокінінів у порівнянні із неефективними та малоефективними.

Більш конкретно, спосіб передбачає культивування досліджуваних штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* на стандартному поживному середовищі, відокремлення культурального середовища від біомаси мікроорганізмів та визначення питомого продукування цитокініну зеатину у культуральне середовище, при цьому питома продукування зеатину на рівні $> 60,0$ мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму.

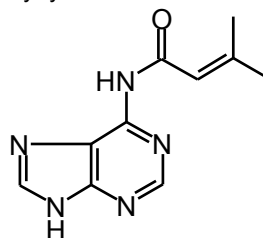
Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу спосіб передбачає культивування досліджуваних штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* на стандартному поживному середовищі, відокремлення культурального середовища від біомаси мікроорганізмів та визначення питомого продукування цитокініну зеатинрибозиду у культуральне середовище, при цьому питома продукування зеатинрибозиду на рівні $> 200,0$ мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму.

Згідно з ще одним варіантом здійснення винаходу спосіб передбачає культивування досліджуваних штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium* на стандартному поживному середовищі, відокремлення культурального середовища від біомаси мікроорганізмів та визначення питомого продукування цитокініну ізопентеніладеніну у культуральне середовище, при цьому питома продукування ізопентеніладеніну на рівні $> 0,5$ мкг/г абсолютно сухої біомаси свідчить про високу біологічну активність штаму, за відсутності синтезу ізопентеніладеніну штам визначають як неактивний або малоактивний.

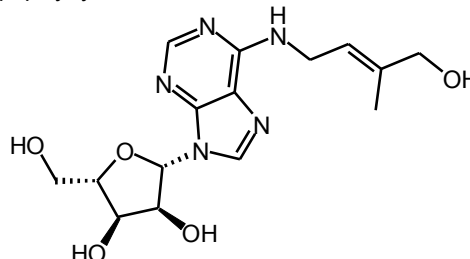
Цитокініни, наявність/кількість яких у культуральному середовищі, отриманому в результаті культивування досліджуваних бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium*, використовують як критерій віднесення досліджуваного штаму до високоактивного або малоактивного, або неактивного, являють собою N-похідні аденіну, до складу яких входять гідроксильований або негідроксильований залишок ізопентенілу. Фізіологічними ефектами цитокінінів є наступні: стимуляція клітинного поділу, індукція процесів морфогенезу в культурі тка-

нин *in vitro*, стимуляція росту бокових бруньок, розпускання листя в результаті збільшення розміру клітин, гальмування старіння листя; регуляція відкривання продихів на листках рослин; стимуляція біосинтезу білка та хлоропластогенезу. Співвідношення ауксинів та цитокінінів є ключовим фактором ділення клітин та диференціації тканин рослин. Мікроорганізми здатні синтезувати кінетин, зеатин, зеатинрибозид ізопентеніладенін, ізопентеніладенозин, рибозильований та деякі інші цитокініни (наприклад, такі як феніл сечовинного типу). Вважають, що в рослинах цитокініни можуть знаходитися як у вільному, так і зв'язаному (у вигляді рибозидів або глюкозидів) стані, біологічна активність яких, в останньому випадку дуже низька або повністю відсутня. Саме таким чином регулюється активність цитокінінів.

Зеатин є першим з виділених (з кукурудзи) природних цитокінінів та має наступну структурну формулу:

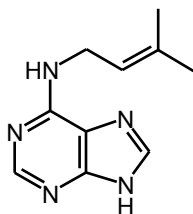


Рибозильований зеатин (зеатинрибозид) є ін-активованою формою цитокінінів, фізіологічна активність якої дуже низька або повністю відсутня. Проте при взаємодії бульбочкових бактерій з рослиною-хазяїном зеатинрибозид відіграє вирішальну роль як транспортна форма зеатину. Синтез цієї форми цитокінінів в процесі симбіотичних стосунків з мікроорганізмами дозволяє рослині отримувати готову транспортну форму, яка транспортується висхідним током до надземної частини рослини, там піддається трансформації (відщеплення глюкози або рибози) і включається в регуляцію метаболізму клітин, змінюючи пул фізіологічно активних цитокінінів у рослинних тканинах та підсилюючи певні ланки метаболізму. Таким чином, чим вище здатність ризосферних бактерій до синтезу рибозильованих форм цитокінінів, тим вище рівень їх спеціалізованої адаптації до рослини-хазяїна. Зеатинрибозид має наступну структурну формулу:



Ізопентеніладенін (ІПА) є похідним аденіну, що характеризується високою цитокініновою активністю. Як було продемонстровано у даному винаході, для високоактивних штамів характерна здатність до синтезу саме цієї додаткової фізіологічно активної форми цитокінінів. ІПА має наступну структу-

рну формулу:



Зазначені вище цитокиніни (зеатин, зеатинрибозид та ізопентеніладенін) та їх кількості використовували як маркери для визначення біологічної активності штамів бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium*. Визначення фітогормонів проводили у культуральних середовищах досліджуваних мікроорганізмів. Основні класи фітогормонів з культуральних середовищ виділяли шляхом їх перерозподілу у двох не змішуваних між собою фазах. Подальше концентрування та очищення екстрактів проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Якісне та кількісне визначення можна проводити за допомогою різних способів, зокрема, паперової хроматографії в різних системах розчинників (наприклад *n*-бутанол - оцтова кислота - вода (4:1:1) або *n*-бутанол - NH_4OH - вода (3:1:1)), при цьому ідентифікацію цитокинінів на хроматограмах проводять відповідно до поглинання в ультрафіолетовому світлі при 260-275 нм. Для кількісного визначення цитокинінів можна використовувати інфрачервону спектрофотометрію, мас-спектрометрію, метод газової хроматографії цитокинінів. У своїх дослідженнях для якісного та кількісного визначення цитокинінів ми використовували спектроденситометричну тонкошарову хроматографію (Савинський С.В., Кофман І.Ш., Кофанов В.І., Стасевська І.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. - 1987. - т. 19, №2. - С. 210-215).

Спосіб ілюструється наведеними нижче прикладами здійснення.

Приклад 1. Проведення якісного та кількісного визначення цитокинінів за допомогою спектроденситометричної тонкошарової хроматографії.

Якісне та кількісне визначення цитокинінів (зеатину, зеатинрибозиду та ізопентеніладеніну) проводили методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії. Для цього 300 мл культурального середовища бактерій роду *Bradyrhizobium*, отриманого після попереднього осадження біомаси даних мікроорганізмів центрифугуванням, залужували 0,1 н гідроксидом натрію до рН 8,0. До лужного культурального середовища додавали 300 мл воднонасиченого *n*-бутанолу. Системи ретельно перемішували в розподільчих лійках та відстоювали до повного розділення водної та органічної фаз. Процедура екстракції повторювали тричі. Органічну фазу використовували як джерело цитокинінів. Об'єднаний бутанольний екстракт випарювали на ротаційному вакуумному випарнику при +45 °С досуха. Сухий залишок повторно розчиняли в аліквоті 96° етанолу, ставили

на виморожування екзополімерних сполук при -24 °С на добу. 400-800 мкл етанольного екстракту наносили на хроматографічну пластинку розміром 15х15 см відповідно до вказаної методики (Савинський С.В., Кофман І.Ш., Кофанов В.І., Стасевська І.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. - 1987. - т. 19, № 2. - С. 210-215). Хроматографічну пластинку проявляли послідовно в таких системах розчинників: хлороформ, 12,5 % водний аміак та етилацетат - оцтова кислота (20:1).

Зони Rf, які відповідають стандартам цитокинінів, знімали з пластинки та піддавали елюції 96° етанолом при +4-6 °С протягом доби. Після попереднього центрифугування при 10000 г протягом 10 хв., аліквоти елюата переносили в мікропробірки та випарювали досуха при +35 °С. Сухий залишок повторно розчиняли в 5-15 мкл етанолу та кількісно наносили на хроматографічну пластинку з оксидом алюмінію (Merck, № 1.05550, UV₂₅₄). Пластинку проявляли в системі розчинників: хлороформ - оцтова кислота (19:1). Після хроматографічного розділення якісний та кількісний аналіз проводили з використанням спектроденситометру «Сорбфіл» (Російська Федерація).

Приклад 2. Визначення біологічної активності штамів бактерій роду *Bradyrhizobium* згідно із запропонованим способом

Проводили дослідження біологічної активності штамів у відповідності із запропонованим способом. Для досліду використовували різні штами бульбочкових бактерій сої роду *Bradyrhizobium* з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: *Bradyrhizobium japonicum* 1MB B-7242, *Bradyrhizobium japonicum* УКМ 1MB B-7205, *Bradyrhizobium japonicum* 1MB B-7031, *Bradyrhizobium japonicum* УКМ 1MB B-7167, а також штами *Bradyrhizobium japonicum* 6046 та *Bradyrhizobium japonicum* 21110, отримані з колекції Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології Російської академії сільськогосподарських наук (Санкт-Петербург, Пушкін). Як було виявлено в ході експерименту, досліджувані штами відрізнялися за своїми показниками щодо вмісту маркерних форм цитокинінів (зеатину, зеатинрибозиду та ізопентеніладеніну), а також за активністю азотфіксації в умовах симбіозу. При цьому було продемонстровано, що штами *B. japonicum* 1MB B-7031, *B. japonicum* 1MB B-7167, *B. japonicum* 1MB B-7205 та *B. japonicum* 1MB B-7242 за маркерним критерієм продукування зеатину у культуральне середовище (60,29; 311,05; 125,32 та 345,00 мкг/г абсолютно сухої біомаси, відповідно) були визначені як високоефективні. Штами *B. japonicum* 6046, та *B. japonicum* 21110 продемонстрували питоме продукування цитокинінів у культуральне середовище на рівні 15,39 та 22,02, що згідно з винаходом свідчить про те, що вони є неефективними стосовно фіксації азоту (дані представлені у Таблиці 1).

Таблиця 1

Питоме продукування цитокинінів у культуральне середовище досліджуваними штамми бульбочкових бактерій роду *Bradyrhizobium*

Штами мікроорганізмів	Цитокиніни, мкг/г абсолютно сухої біомаси				Характеристика активності
	Зеатин	Зеатинрибозид	Ізопентеніладенін	Ізопентеніладенозин рибозильований	
<i>B. japonicum</i> 6046	15,39	108,83	-	17,38	неактивний
<i>B. japonicum</i> 21110	22,02	135,91	-	8,03	малоактивний
<i>B. japonicum</i> 1MB B-7031	60,29	672,55	4,94	ел.	високоактивний
<i>B. japonicum</i> 1MB B-7176	311,05	233,74	1,72	8,04	високоактивний
<i>B. japonicum</i> 1MB B-7205	125,32	342,47	9,30	5,48	високоактивний
<i>B. japonicum</i> 1MB B-7242	345,00	855,01	1,71	352,44	високоактивний

Аналогічні дані були отримані при застосуванні маркерного критерію питомого продукування зеатинрибозиду у культуральне середовище. При цьому штамми *B. japonicum* 1MB B-7031, *B. japonicum* 1MB B-7167, *B. japonicum* 1MB B-7205 та *B. japonicum* 1MB B-7242 також були класифіковані як високоефективні (дані представлені у Таблиці 1). Штами *B. japonicum* 6046, та *B. japonicum* 21110 за біохімічним критерієм продукування були віднесені до неактивних та малоактивних. (Таблиця 1).

Аналогічні дані також були отримані при застосуванні маркерного критерію питомого продукування ізопентеніладеніну у культуральне середовище. При цьому штамми *B. japonicum* 1MB B-7031, *B. japonicum* 1MB B-7167, *B. japonicum* 1MB B-7205 та *B. japonicum* 1MB B-7242 також були класифіковані як високоефективні (дані представлені у Таблиці 1). Що стосується штамів *B. japonicum* 6046, та *B. japonicum* 21110 то за вказаним біохімічним критерієм вони також були віднесені до неактивних та малоактивних (Таблиця 1).

Результати щодо біологічної активності штамів, отримані при використанні запропонованих у

даній заявці критеріїв (згідно із запропонованим способом), повністю співпадають з даними визначення біологічної ефективності зазначених штамів на основі продуктивності рослин сої, оброблених досліджуваними штамми, та їх нодуляційної здатності.

Приклад 3. Дослідження біологічної активності штамів у вегетаційних та польових дослідах

В експерименті досліджували ефективність бобово-ризобіального симбіозу при використанні штамів бактерій роду *Bradyrhizobium*, що відрізняються за своєю біологічною ефективністю: *B. japonicum* 1MB B-7031, *B. japonicum* 1MB B-7242 та *B. japonicum* 21110. У вегетаційних та польових дослідженнях використовували рослини сої сортів Київська 27 та Горлиця. Рослини інокулювали досліджуваними штамми та визначали біологічну ефективність штаму, використовуючи як критерій нодуляційну здатність (Таблиця 2) та продуктивність рослин сої (Таблиця 3 та Таблиця 4). Таким чином, перевіряли надійність запропонованого способу для визначення біологічної активності шляхом застосування бульбочкових бактерій.

Таблиця 2

Формування нодуляційного апарату у рослин сої сорту Київська 27 при обробці різними штамми ризобій сої (вегетаційний дослід)

Варіанти обробки насіння	Середня кількість бульбочок на 1 рослину, шт.	Маса бульбочок на 1 рослину, мг	Азотофіксувальна активність, мкмоль C ₂ H ₄ на 1 рослину за годину
Контроль (обробка стерильною водою)	5	32,4	2,5±0,16
<i>B. japonicum</i> 1MB B-7031	25	130,8	17,5±0,87
<i>B. japonicum</i> 21110	16	97,5	10,7±0,32

Вегетаційні досліді проводили у посудинах Вагнера об'ємом 8 кг на опідзоленому чорноземі. У ґрунт вносили основні поживні речовини N₃₀P₉₀K₉₀ у формі розчинів солей. Для інокуляції насіння сої використовували бактеріальні суспензії описаних вище штамів *B. japonicum*, які культивували на стандартних поживних середовищах для повільнорослих ризобій. Густина суспензії ризобій для

інокуляції насіння становила 10⁹ клітин/мл. Обробку проводили з розрахунку інокуляційного навантаження 2,5-3,5·10⁶ клітин на 1 насінину. Насіння контрольного варіанту замочували в стерильній водогінній воді.

Польові досліді проводили у Києво-Святошинському районі Київської області на темно-сірому опідзоленому легкосуглинковому ґрунті

на лесовидному суглинку, площа дослідних ділянок становила 12,5 м². Бактеризацію насіння проводили як описано вище. Азотні добрива не вносили, фосфорні та калійні добрива вносили з розрахунку 60 кг діючої речовини на гектар. Повторність експериментів - 5-ти кратна.

сили, фосфорні та калійні добрива вносили з розрахунку 60 кг діючої речовини на гектар. Повторність експериментів - 5-ти кратна.

Таблиця 3

Формування рослин сої і вміст білка у зеленій масі при обробці різними штамми ризобій сої (вегетаційний дослід)

Варіанти обробки насіння	Площа листової поверхні рослин, см ²	Вміст хлорофілів а+в, мг/л	Маса однієї сухої рослини, г	Вміст протеїну в зеленій масі, %
Контроль (обробка стерильною водою)	143,7±5,8	7,24±0,03	1,18	14,9±0,3
B. japonicum 1MB B-7031	175,2±12,3	7,80±0,05	1,27	17,5±0,5
B. japonicum 21110	159,0±9,6	7,58±0,03	1,25	15,8±0,6
HIP ₀₅			0,18	

Рослини досліджували у фазу бутонізації-початку цвітіння та у фазу стиглості бобів. У фазу бутонізації-початку цвітіння визначали наступні показники: нодуляційну та азотфіксувальну активності кореневих бульбочок. У фазу дозрівання

бобів визначали кількість урожаю та якість зерна. За показниками урожаю та вмісту протеїну у насінні сої для кожного варіанту розраховували збір сирого протеїну з 1 га.

Таблиця 4

Урожайність, біохімічні і санітарно-гігієнічні показники якості сої (сорт - Горлиця) при обробці B. japonicum 1MB B-7031 та B. japonicum 1MB B-7242

Варіанти обробки насіння	Урожай, ц/га	Вміст білку в зерні, %	Вміст нітратів, мг/кг	Збір протеїну, ц/га
Контроль (обробка стерильною водою)	22,0	36,1	94,5	7,94
B. japonicum 1MB B-7031	23,1	36,8	98,0	8,5
B. japonicum 1MB B-7242	23,7	36,9	106,7	8,74
HIP ₀₅	0,32	0,09	2,34	-

Як показали отримані результати, визначена у вегетаційних та польових дослідках біологічна ефективність штамів бульбочкових бактерій роду Bradyrhizobium співпадала з даними, отриманими згідно із запропонованим способом. Так, на основі аналізу продуктивності рослин сої штамми B. japonicum 1MB B-7031 та B. japonicum 1MB B-7242 були визначені як високоефективні, а штам B. japonicum 21110 виявилися неефективними за своєю біологічною, в т.ч. симбіотичною активністю. Ці дані повністю узгоджуються з тими, що отримані при використанні способу згідно з даним винаходом.

Таким чином, заявлений спосіб забезпечує

надійне визначення біологічної активності штамів бульбочкових бактерій роду Bradyrhizobium за біохімічним критерієм питомого продукування зеатину та/або зеатинрибозиду та/або ізопентеніладеніну у культуральне середовище при культивуванні цих штамів без необхідності проведення дослідів по вивченню ефективності симбіозу у вегетаційних та польових умовах, що вимагають тривалого періоду вирощування рослин та певних умов проведення лабораторних дослідів. Спосіб забезпечує швидке та надійне визначення доцільності використання штаму як інокулянта для обробки рослин сої.