



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111391** (13) **C2**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2014 06481**

(22) Дата подання заявки: **11.06.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **25.04.2016**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **27.10.2014, Бюл.№ 20**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.04.2016, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Коць Сергій Ярославович (UA),  
Воробей Надія Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І  
ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ,  
вул. Васильківська, 31/17, м. Київ-22, 03022  
(UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

Воробей Н. А. и др. Фізіологічні особливості  
розвитку люцерни за інокуляції змішаними  
культурами азотфіксуючих  
мікроорганізмів //Физиология и биохимия  
культурных растений. – 2009. – Т.41, №4. –  
С.344-352

Воробей Н. А., Коць С. Я. Азотфіксуюча  
активність і ріст вегетативних органів  
люцерни за сумісної інокуляції активним і  
неактивним штамми *Sinorhizobium meliloti*  
//Физиология и биохимия культурных  
растений. – 2009. – Т.41, №2. – С.162-167  
SU 549454, 05.03.1977  
UA 55432 U, 10.12.2010  
UA 50851 C2, 15.11.2002

**(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ SINORHIZOBIUM MELILOTI ІМВ В-7411 ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО  
ДОБРИВА ПІД ЛЮЦЕРНУ**

(57) Реферат:

Винахід стосується штаму бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti*, який депоновано в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під реєстраційним номером В-7411, для одержання бактеріального добрива під люцерну.

UA 111391 C2



Винахід належить до мікробіологічних засобів підвищення урожайності бобових культур. Штам бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* AC08 можна використовувати у мікробіологічному виробництві препаратів як бактеріальну основу добрив під люцерну.

Актуальним завданням сьогодення в області симбіотичної азотфіксації є створення препаратів біологічної стимуляції росту, розвитку бобових рослин і посилення їх продуктивності за рахунок використання симбіотрофного азоту. Основою цих препаратів є високоактивні штами бульбочкових бактерій.

Оскільки аналітична селекція є найбільш вживаним (традиційним) методом отримання різних штамів бульбочкових бактерій із господарсько-цінними властивостями, вона не втратила практичного значення і в теперішній час. Вихідним матеріалом слугують ізоляти *Rhizobiaceae*, виділені з кореневих бульбочок рослин або безпосередньо з мікробних ценозів ґрунту. Нові штами бульбочкових бактерій ізолювані з природних ценозів нерідко поступаються за азотфіксувальною активністю та ефективністю виробничим. Виділити з біоценозів ризобії з азотфіксувальною активністю більшою за активність колекційних та виробничих штамів стає все важче. Втім суттєвою перевагою "природних" культур є пристосованість до ґрунтово-кліматичних умов тієї чи іншої географічної зони їх походження, стійкість до біотичних і абіотичних чинників. Це свідчить про те, що ці бактерії мають потенційно високу конкурентоздатність і екологічну пластичність (властивість швидко приживатись при інтродукції їх у відповідну екологічну нішу не впливаючи на структуру мікробної спільноти ґрунту). Особливо цінним є екологічна безпечність аналітично селекціонованих ризобій при інтродукції їх в природне середовище.

Впровадження у сільськогосподарське виробництво нових сортів люцерни, розширення посівів у регіонах, зниження азотфіксувальної активності з плином часу у бульбочкових бактерій зумовлює необхідність отримання нових високоефективних, конкурентоздатних штамів *Sinorhizobium meliloti*.

Протягом багатьох років в Україні для виробництва бактеріальних добрив під люцерну використовується штам *S. meliloti* 425a, отриманий методом аналітичної селекції (А.с. СРСР № 549454, C05F 11/08, 25.05.77). Впродовж останніх років методом гібридизації та при застосуванні транспозонового мутагенезу отримані конкурентоспроможні ефективні у симбіозі з різними сортами люцерни штами *S. meliloti*: M4 (пат. України № 13298, 28.02.97, бюл. № 1 і M12 (пат. України № 50851, 15.11. 2002, бюл. № 11) та T17 (пат. України на корисну модель № 55432, 10.12.2010, бюл. № 23). Зокрема, інокуляція насіння штамом M12 *S. meliloti* забезпечувала надбавку урожаю зеленої маси люцерни від 24 до 36 ц/га (8,1-14,5 %), а насіння від 0,20 до 0,21 ц/га (15,4-22,7 %) порівняно із застосуванням виробничого штаму 425a залежно від ґрунтово-кліматичних умов вирощування згаданої культури. Використання штаму T17 у формі рідкого бактеріального препарату для інокуляції посівного матеріалу збільшує азотфіксувальну активність люцерни в 1,3-5,3 разів і забезпечує підвищення урожайності надземної маси на 9,6-15,5 % (16,9-48,2 ц/га) порівняно із застосуванням штамів 425a (аналітична селекція) і M12 (отриманий методом гібридизації) у залежності від сорту люцерни і ґрунтово-кліматичних умов її вирощування.

Задачею винаходу є одержання нового конкурентоздатного штаму бульбочкових бактерій люцерни адаптованого до ґрунтово-кліматичних умов Полісся України з високою азотфіксувальною активністю і вірулентністю, який би дозволяв підсилити процес симбіотичної азотфіксації у районованих сортах люцерни, підвищити їх продуктивність і покращити якість надземної маси.

Спосіб отримання штаму. Культура бульбочкових бактерій *S. meliloti* AC08 виділена із корневих бульбочок люцерни природних ценозів Полісся України (Житомирська область, Коростенський район, червень, 2008 р., Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). Виділення бульбочкових бактерій із корневих бульбочок люцерни (ізоляція) здійснена згідно з методичними рекомендаціями ВНДІСГМ РАСГН [Методы исследований клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии - Л., 1981. - 48 с].

Штам ідентифіковано за визначником Бергі (Краткий определитель Берги. - М.: Мир, 1980. - 495 с.) і депоновано в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під реєстраційним номером IMBV-7411.

Культурально-морфологічні особливості штаму: мікроаерофіл, температурний діапазон росту: 20-28 °С. Оптимальна температура росту -27 °С. Діапазон рН 6,2-7,2. Оптимальна рН - 7,0. Культура бактерій швидко росла, не спороносна, грамнегативна, клітини мають форму дрібних паличок. Палички рухливі, мають перитрихальні джгутики. Бактерії пігмент не продукують. Розмір клітин дводобової культури 0,5×1,2 мкм. У молодому віці палички рухливі.

На 4-5 добу на бобовому агарі колонії слизисті сірувато-молочного кольору, легко знімаються з поверхні агару, на 5-7 день продукують багато слизу. При старінні клітини утворюють бактеріоди вильчатої форми.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Молоко з лакмусом пептонізує, желатину не розріднює, клітковину не використовує. Відношення до вуглеводів - культура активно засвоює з утворенням кислоти арабінозу, сахарозу, мальтозу і фруктозу. Слабше цукроспирти - маніт і сорбіт. Полісахариди - крохмаль, глікоген не гідролізує. Відношення до джерел азоту - культура росте на середовищах з азотнокислими і амонійними солями. Ознаки штаму стійкі.

Діагностичними особливостями культури є ріст на середовищах 79, МДА, МДА +  $\text{KNO}_3$  (150 мМоль/л), здатність утворювати бульбочки на коренях інокульованих рослин люцерни за присутності у субстраті вирощування 1 н мінерального азоту за Гельрігелем (1 норма відповідає 708 мг  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  на 1 кг піску). Культура росте на м'ясопептонному агарі, на м'ясопептонному бульйоні при цьому ріст характеризується помутнінням середовища, колір якого не змінюється.

Культура також добре культивується на середовищах наступного складу:

манітно-дріжджовий агар: (МДА) (г/л:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{NaCl}$ -0,1; маніт - 10,0; дріжджовий екстракт - 1,0; агар - 15,0-20,0; дист. вода, pH - 7,0);

синтетичне мінеральне середовище 79: (г/л:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{NaCl}$ -0,1;  $\text{CaCO}_3$  - сліди; казамінокислоти (або гідролізат лактоальбуміну) - 0,1 % (1 г), маніт - 10,0; агар - 17,0; дист. вода) - колонії білі, випуклі, блискучі;

бобовий агар: (1 л бобового відвару (г/л: горох - 100 г гороху на 1 л водопровідної води), сахароза - 20 г; агар - 15-18 г;  $\text{NaCl}$ -1 г). У 1 л води кип'ятити 100 г гороху 30 хв., настояти 20 хв. Відвар відцідити, розчинити добавки. Стерилізувати при 1 атм 30 хв., pH 6,8-7,2;

середовище ТУ (г/л): триптон - 5,0; дріжджовий екстракт - 3,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,94.

Генетичні особливості: прототроф, стійкий до 150 мМоль/л мінерального азоту у формі  $\text{KNO}_3$ . Штам непатогенний, нетоксичний. Бактерії *S. meliloti* AC08 здатні фіксувати атмосферний азот і забезпечувати ним рослини, що є суттєвим джерелом азотного живлення люцерни. Запропонований штам AC08 проявляє високий рівень азотфіксувальної активності у симбіозі з районованими в Україні сортами люцерни Ярославна (селекції Інституту землеробства Південного регіону НААН України), Зарниця (селекції Селекційно-генетичного інституту НААН) та перевищує за цим показником виробничий штам 425a *S. meliloti*. Сорти люцерни Ярославна та Зарниця є сортами сінокісного і кормового спрямування та рекомендовані для посіву у Степу, Лісостепу та Поліссі України).

У лабораторних дослідках межу стійкості штаму AC08 до мінерального азоту оцінювали за інтенсивністю росту та кількістю колоній на середовищі МДА, збагаченого  $\text{KNO}_3$  в чашках Петрі після вирощування протягом 5-7 діб при + 28 °C за різних способів посіву культури: а) посів штрихом бактеріальною петлею, б) за використання методу граничних розведень [Методы исследования клубеньковых бактерий / Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии - Л., 1981. - 48 с.]. Встановлено, що мінеральний азот у формі  $\text{KNO}_3$  у концентраціях більше за 100 мМоль/л середовища пригнічував ріст і розвиток бульбочкових бактерій штамів 425a та Т17 *S. meliloti*. У той же час відмічено наявність бактеріальних колоній на поверхні мінерального середовища МДА+ $\text{KNO}_3$  (100-200 мМоль/л), що свідчить про здатність до репродукції штаму *S. meliloti* AC08 за даних умов.

Таблица 1

Кількість колонієутворюючих одиниць ( $\text{КУО} \cdot 10^9$ ) за впливу різних концентрацій  $\text{KNO}_3$  на ріст бульбочкових бактерій *S. meliloti*

Штам-інокулянт	Концентрація $\text{KNO}_3$ , мМоль/л середовища							
	0	15	30	50	75	100	150	200
425a (виробничий)	174,2	117,70	102,4	11,0	10,0	0	0	0
Т17 (базовий)	145,5	139,2	128,2	123,5	98,2	54,2	0	0
AC08 (запропонований)	132,2	130,4	118,7	63,0	83,0	48,0	32,0	6,0

Високі концентрації азоту в середовищі вирощування бактерій, чинять вплив на біохімічні, фізіологічні процеси, які протікають у бактеріальній клітині, що в кінцевому результаті призводить до порушення нормальної репродуктивної діяльності бактерій, результатом чого є помітне зниження кількості клітин, які виживають на середовищах із вмістом іонів  $\text{NO}_3$ . Проте

той факт, що бульбочкові бактерії люцерни AC08 витримують у чистій культурі більш високі концентрації азоту порівняно із штамми T17 і 425а не викликає сумніву.

Азотфіксувальну активність штаму, що пропонується, визначали в мікрореґетаційних, вегетаційних і польових дослідках за редукцією ацетилену в етилен за методом Харді із співавт. (Hardy R.W.F., Holsten R.D, Jackson E.K., Burns R.C. 1968) на газовому хроматографі Agilent Technologies 6850 Network GC System із полум'яно-іонізаційним детектором.

Ефективність штаму AC08 *S. meliloti* перевіряли на люцерні сортів Ярославна та Зарниця в умовах вегетаційних (промийтий річковий пісок, збагачений сумішшю Гельрігеля із різними дозами азоту у формі  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,25, 0,75, 1,0 та 1,5 норми (1 норма відповідає 708 мг  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  на 1 кг піску за Гельрігелем) і польових дослідів (на чорноземі опідзоленому, середньосуглинковому, вміст гумусу 3,0 %, N-11,4,  $\text{P}_2\text{O}_5$ -10,4,  $\text{K}_2\text{O}$  - 8,1 мг/100 г ґрунту) у зоні Західного лісостепу України (Тернопільська обл.).

Передпосівну інокуляцію насіння проводили бактеріальною суспензією із титром  $10^9$  клітин /мл. Для її отримання запропонований штам AC08 вирощували на МДА при + 28 °С протягом 4 діб у пробірках. Культуру із поверхні агаризованого середовища змивали стерильною водою. Готували густу суспензію (50 мл), якою засівали качалочні колби із 350 мл середовища. Культивування проводили протягом 3-4 днів при +28 °С із використанням стаціонарної качалки, яка забезпечувала постійну аерацію середовища вирощування.

Посів люцерни в польових дослідках проводили у другій декаді квітня з шириною міжрядь 45 см і глибиною загортання насіння 1,5-2,0 см. Передпосівну обробку проводили за 1 годину до висіву насіння в ґрунт бактеріальною суспензією. Насіння висівали із розрахунку 15 кг/га.

Штам AC08 вивчали протягом 5 років за симбіотичними показниками, та відібрали за здатністю формувати активні азотфіксувальні бульбочки на коренях рослин. Показники штаму AC08 - кількість бульбочок та загальна їх маса на 1 рослині коливаються в межах відповідних показників штамів - виробничого 425а та T17, а в окремі фази розвитку люцерни їх перевищують (табл. 2).

Відмінною ознакою симбіозу люцерни та ризобій *S. meliloti* AC08 є більший рівень фіксації  $\text{N}_2$  протягом фаз стеблуння і повного цвітіння (формування генеративних органів) у порівнянні із бактеріями виробничого штаму 425а за рахунок інтенсивнішого утворення бульбочок у ці періоди вегетативного розвитку рослин (табл. 3).

Відомо, що оптимальною нормою мінерального азоту у субстраті вирощування бобових рослин, за якої активно формується симбіотичний апарат є 0,25 н за Гельрігелем. В умовах вегетаційного дослідку збільшення норми азоту в субстраті вирощування рослин пригнічує формування бульбочок та їх азотфіксувальну активність залежно від мікросимбіонта. Однак, при вирощуванні на піщаному субстраті з 0,75 н азоту рослин, інокульованих штамом AC08, у фазу бутонізація-цвітіння кількість кореневих бульбочок, їх маса та азотфіксувальна активність, була більшою відповідно в 1,4, 2,21 і 1,31 разу у порівнянні з аналогічними показниками штаму 425а. При вирощуванні рослин за 1,0 норми азоту за Гельрігелем вказані показники штаму AC08 домінували в 3,8, 1,76 і 2,07 разу відповідно проти симбіотичних показників штаму 425а (табл. 4). Таким чином, встановлена толерантність симбіотичної системи люцерни за участю ризобій AC08 до впливу азотних сполук у порівнянні із використанням виробничого штаму 425а *S. meliloti*.

Із метою встановлення ефективності інокуляції люцерни штамом AC08 нами проведено два укоси зеленої маси люцерни: перший - у фазу початку цвітіння, другий - у цю ж фазу після відновлення вегетативного росту надземних органів після скошування. Із рослин, інокульованих аналітично-селекціонованими бульбочковими бактеріями AC08 за два укоси зібрали відповідно на 19,1, 10,0 та 16,9 % більше зеленої надземної маси у порівнянні з рослинами, інокульованими штамом 425а залежно від дози азоту в субстраті вирощування, що засвідчує ефективність функціонування симбіотичної системи люцерни - ризобії *S. meliloti* за даних умов (табл. 4)

Таблиця 2

Динаміка утворення бульбочок у люцерни за інокуляції бактеріями *S. meliloti* (вегетаційні дослідки, середні значення за 3 роки)

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, дні після появи сходів				
	стеблуння, 25-й	стеблуння, 32-й	бутонізація, 40-й	цвітіння, 50-й	повне цвітіння, 58-й
Без інокуляції	0	0	0	0	6,0±0,5

425a (виробничий)	3,6±0,6	3,5±0,8	10,2±1,9	24,0±1,7	87,3±7,2
T17 (базовий)	3,3±0,7	2,2±0,6	8,0±0,5	36,0±2,0	43,0±4,4
AC08 (запропонований)	6,7±0,5	7,5±0,4	27,3±2,0	27,5±2,2	81,7±2,4

Таблиця 3

Азотфіксувальна активність (мкмоль  $C_2H_4$  /(рослину·год.) люцерни сорту Ярославна за інокуляції бульбочковими бактеріями *S. meliloti* (вегетаційні досліді, середні значення за 3 роки)

Штам-інокулянт	Фаза розвитку рослин, дні після появи сходів					Сумарна за період визначень
	стеблуння, 25-й	стеблуння, 32-й	бутонізація, 40-й	цвітіння, 50-й	повне цвітіння, 58-й	
425a (виробничий)	0,61±0,02	0,95±0,03	2,76±0,78	7,80±0,88	7,28±0,92	18,45
T17 (базовий)	2,24±0,15	2,99±0,62	5,30±0,71	5,60±0,63	17,84±0,23	33,97
AC08 (запропонований)	3,39±0,14	4,47±0,15	3,96±0,98	2,23±0,29	10,11±0,47	24,16

Таблиця 4

Ефективність симбіозу люцерни сорту Ярославна, інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti*, за впливу підвищених доз мінерального азоту (вегетаційні досліді, фаза - бутонізація-цвітіння)

Штам-інокулянт	Норма азоту	Кількість бульбочок, шт	Маса бульбочок, г	Азотфіксувальна активність, мкмоль	Урожай зеленої маси, сумарний за 2 два укоси	
				$C_2H_4$ /рослину·год.)	г/посудину	прибавка до штаму 425a, %
425a(виробничий)	0,25	12,6±1,7	0,145±0,026	0,350±0,01	64,32±0,52	-
AC08 (запропонований)		17,0±1,5	0,219±0,023	0,380±0,04	76,61±0,28	19,1
425a(виробничий)	0,75	9,0±0,51	0,019±0,012	0,118±0,05	65,83±0,23	-
AC08 (запропонований)		12,7±1,5	0,042±0,017	0,155±0,019	72,43±0,63	10,0
425a (виробничий)	1,0	3,7±0,3	0,025±0,002	0,064±0,008	66,50±0,44	-
AC08 (запропонований)		14,3±0,1	0,044±0,001	0,133±0,003	77,76±0,38	16,9
HIP <sub>05</sub>					4,6	

- У період бутонізації-початку цвітіння у зеленій масі бобових трав, зокрема у люцерни, синтезується значний вміст сухої речовини та нагромаджується максимальна кількість білка. Особливе значення має вміст у білках рослин так званих незамінних амінокислот (валіну, лейцину, ізолейцину, треоніну, метіоніну, гістидину, лізину, триптофану й фенілаланіну), які не можуть синтезуватися в організмі людини і тварин. За оптимальних умов (0,25 н) у рослин, інокульованих штамом AC08 відмічено найбільший показник загального амінокислотного складу, який складав 16,31 мг/1 г сухої надземної маси рослин. Вміст незамінних амінокислот при цьому становив 5,97, що складало 36,6 % від загального вмісту амінокислот. Найбільше рослини накопичували у зеленій масі лейцину 1,42 мг/1 г зразка проти 1,05 за інокуляції штамом 425a (табл. 5)

Таблиця 5

Вміст амінокислот у зеленій масі люцерни сорту Ярославна за інокуляції аналітично-селекціонованими бульбочковими бактеріями *S. meliloti*

Штам-інокулянт	Норма азоту	Вміст амінокислот мг/ в 1 г		
		загальний	незамінимі мг в 1 г	%
Без інокуляції	0,25	10,28	3,43	33,36
425а (виробничий)		11,75	4,03	34,30
T17 (базовий)		14,19	4,94	34,78
AC08 (запропонований)		16,31	5,97	36,61

- В умовах польового дослідження вивчена ефективність бобово-ризобіального симбіозу люцерни сорту Зарниця першого та другого року вегетації за штучної передпосівної інокуляції бактеріями AC08 у порівнянні із використанням штамів-інокулянтів 425а та T17 *S. meliloti* на фоні ризобіальної мікрофлори ґрунту. Показано, що в люцерни першого року вегетації, за інокуляції запропонованим штамом AC08, азотфіксація кореневих бульбочок була в 3,8 та 2,3 рази більшою порівняно з бульбочками неінокульованих рослин (спонтанна інокуляція місцевими расами ризобій) та утворених штамом 425 відповідно. У рослин другого року вегетації аналогічні показники були відповідно у 7,0, і 2,7 більшими, а також у 1,7 рази - у порівнянні з штамом T17 *S. meliloti* (табл. 6). Отже, інтенсивність фіксації  $N_2$  бульбочками утвореними штамом T17 у люцерни другого року вегетації мала тенденцію до зниження, а штучна бактеризація AC08 *S. meliloti* стабільно забезпечувала достатньо високий рівень азотфіксації, що обумовлюється фізіологічною активністю, пристосувальним потенціалом та конкурентоздатністю в умовах довкілля цих ризобій (табл. 6).

Таблиця 6

Азотфіксувальна активність бульбочок люцерни сорту Зарниця за інокуляції бактеріями *S. meliloti* (польовий дослід, Тернопільська обл., фаза бутонізація-початок цвітіння)

Штам-інокулянт	Азотфіксувальна активність, мкмоль $C_2H_4$ /(рослину·год.)	
	перший рік вегетації	другий рік вегетації
Без інокуляції	0,21±0,03	0,16±0,00
425а (виробничий)	0,35±0,08	0,42±0,01
T17 (базовий)	0,91±0,02	0,64±0,02
AC08 (запропонований)	0,81±0,02	1,12±0,13

- За результатами дослідів, проведених у ґрунтово-кліматичних умовах Тернопільської області, прибавка урожаю (сумарно за два укоси) зеленої маси люцерни сорту Зарниця становила 11,3 та 16,9 % порівняно із урожаем рослин при застосуванні виробничого штаму 425а та за спонтанної інокуляції (табл. 7)

Таблиця 7

Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями *S. meliloti* на продуктивність люцерни сорту Зарниця в ґрунтово-кліматичних умовах Полісся України (середні дані за 3 роки дослідження)

Штам-інокулянт	Урожай надземної маси, ц/га							
	I укіс		II укіс		Сумарний за II укоси			
	ц/га	% до контролю	ц/га	% до контролю	ц/га	прибавка до контролю		штаму 425а
Без інокуляції	194,0±2,5	100,0	67,2±7,8	100,0	261,2	-	100	-
425а (виробничий)	201,1±8,0	103,6	78,3±1,3	116,5	279,4	18,2	105,0	100
T17 (базовий)	234,9±7,2	121,1	78,1±1,5	116,2	313,0	51,8	114,3	108,8
AC08 (запропонований)	241,6±2,6	124,5	80,7±2,6	120,1	322,3	61,6	116,9	111,3
HIP <sub>05</sub>					11,3			

Це є свідченням того, що інтродуковані ризобії здатні приживатись у ґрунті, інфікувати корені рослин та активно функціонувати у симбіозі з рослинами люцерни протягом першого та другого років вегетації. Підтвердженням цього є також різниця за азотфіксуючою активністю між інокульованими та неінокульованими (зазнали впливу місцевої ризобіальної мікрофлори ґрунту) рослинами.

У рослин, бактеризованих штамом AC08, відмічено збільшення концентрації хлорофілів а і b та каротиноїдів порівняно із показниками контрольних варіантів, що підтверджує стимулюючий вплив даних мікроорганізмів на формування фотосинтетичного апарату у порівнянні з інокуляцією люцерни штамом аналітичної селекції 425a (табл. 8).

Таблиця 8

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках люцерни, інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti*

Штам-інокулянт	Хлорофіл, мг/г сирої речовини		Каротиноїди, мг/г сирої речовини
	a	b	
Без інокуляції	0,71±0,05	0,24±0,01	0,15±0,01
425a (виробничий)	1,14±0,05	0,36±0,01	0,25±0,01
T17 (базовий)	1,32±0,03	0,47±0,01	0,24±0,01
AC08 (запропонований)	1,29±0,09	0,39±0,03	0,28±0,02

Додатковою перевагою штаму AC08 є його висока конкурентоздатність, яка забезпечує йому пріоритет у процесі утворення бульбочок при вирощуванні люцерни за присутності сторонньої ризобіальної мікрофлори. Конкурентоздатність штаму AC08 визначали непрямим методом (за надземною масою інокульованих рослин) і розраховували за формулою Амаргер (Amarger N., 1981). На люцерні сорту Зарниця запропонований штам AC за показником конкурентоздатності перевищував еталонний виробничий штам 425a та базовий T17 *S. meliloti* (табл. 9). Відповідні показники дорівнювали - 83 % (AC08) проти - 75 % (425a) і 79 % (T17).

Таблиця 9

Ефективність азотфіксації та конкурентоздатність бульбочкових бактерій люцерни *S. meliloti* (вегетаційний дослід)

Штам-інокулянт	Абсолютно суха речовина, г/посудину		Конкурентоздатність, %
	інокуляція (шт. +)	інокуляція сумішшю (шт. + шт. -)	
Без інокуляції	1,60±0,02		
CXM1-48 (неактивний)	1,48±0,04		
425a (виробничий)	1,88±0,03	1,79±0,02	75,0
T17 (базовий)	2,37±0,05	2,19±0,03	79,0
AC08 (запропонований)	2,50±0,03	2,43±0,04	83,0

Рекомендований штам AC08 *S. meliloti* достатньо технологічний і його можна використовуватися у виробництві бактеріального добрива під люцерну, оскільки добре приживається і інтенсивно розмножується на сипучому субстраті-носії - вермикуліті, збагаченому поживними домішками (кукурудзяний екстракт, меляса, глюкоза). Протягом 45 діб зберігання бактеріальний титр препаратів виготовлених на основі штаму AC08 мав тенденцію до збільшення порівняно із препаративними формами на основі штамів 425a і T17.

Отже, запропонований штам AC08 *Sinorhizobium meliloti* відрізняється від виробничого штаму 425a генетичними ознаками та фізіолого-біохімічними показниками, є стійким до мінерального азоту, утворює ефективний симбіоз із районованими в умовах Полісся сортами люцерни Ярославна та Зарниця і не поступається за симбіотичними показниками високоактивному базовому штамму T17. Використання запропонованого штаму AC08 для бактеризації районованих сортів люцерни у ґрунтово-кліматичних умовах Західного Поділля збільшує урожай зеленої маси в середньому на 16,9 % (61,6 ц/га) порівняно з варіантом без інокуляції та на 11,3 % (42,6 ц/га) порівняно з виробничим штамом 425a *S. meliloti*. Таким чином,



запропонований штам AC08 за основними господарсько-корисними властивостями ефективністю симбіозу, конкурентоздатністю та технологічністю переважає штамми 425a і T17 *S. meliloti*.

5 Для забезпечення формування активного бобово-ризобіального симбіозу люцерни районуваних в Україні сортів Ярославна, Зарниця за дії стресових чинників довкілля (зокрема, підвищеного вмісту мінерального азоту) ефективним буде застосовувати бульбочкові бактерії AC08, які характеризуються стійкістю до впливу екзогенного мінерального азоту і пропонуються як бактеріальна основа для виготовлення бактеріальних добрив під люцерну.

10 Штам AC08 є екологічно безпечним, має пріоритетне значення за господарсько-цінними властивостями та рекомендується використовувати для створення високоефективного бобово-ризобіального симбіозу *Medicago sativa*-*Rhizobium*. Раціональне використання властивостей природних бульбочкових бактерій *S. meliloti*, зокрема, AC08, у перспективі, без сумніву, є важливим елементом біологізації землеробства і створення адаптивно-інтенсивної стратегії розвитку лукивництва в Україні.

#### 15 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Sinorhizobium meliloti* IMB B-7411 для одержання бактеріального добрива під люцерну.

20

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601