

**ЕФЕКТИВНІ ШТАМИ *MESORHIZOBIUM CICERI*
ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ РИЗОБОФІТУ ПІД НУТ
(*CICER ARIETINUM*)**

Дідович С.В., Толкачов М.З., Каменєва І.О.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської
мікробіології УААН,

вул. Карла Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513, Україна

З бульбочок нуту ізольовано 68 штамів *Mesorhizobium ciceri* та встановлено ефективність їх симбіозу з сучасними сортами нуту. При застосуванні штамів *M. ciceri* Н-12, ПН-12, Н-18, 068, НС-6 в умовах вегетаційних дослідів урожай зеленої маси нуту був на 6-30 % вищим, ніж при використанні еталонних штамів. Технологічний штам Н-12 рекомендовано для виготовлення ризобіоту під нут.

Ключові слова: *Mesorhizobium ciceri*, нут, симбіотична азотфіксація, препаративна форма.

Нут – одна з давно відомих у світі культур, яка займає третє місце серед зернобобових за площею посівів. При значному зменшенні площі зрошуваних земель в Україні нут має великі перспективи у виробництві рослинного білка і відновленні родючості ґрунту у богарному землеробстві, особливо в південних районах та на південному сході України.

В технології вирощування цієї культури передбачена нітрагінізація – передпосівна обробка насіння біопрепаратами, створеними на основі ефективних штамів *Mesorhizobium ciceri*, що забезпечує підвищення інтенсивності симбіотичної азотфіксації і продуктивності рослин. Рослини нуту вступають у симбіоз з бактеріями виду *M. ciceri*, утворюють азотфіксувальні бульбочки і здатні в умовах півдня України засвоїти за період вегетації до 80-150 кг/га молекулярного азоту та сформувати без застосування азотних добрив урожайність зерна 20-25 ц/га [1]. В ґрунтах нашої країни немає аборигенних бульбочкових бактерій нуту, і лише в окремих місцях, де раніше систематично вирощували цю культуру, зустрічаються локальні інтродуковані популяції *M. ciceri*, які можуть бути джерелом нових штамів бульбочкових бактерій, адаптованих до місцевих ґрунтово-кліматичних умов і генотипів сучасних сортів

нату.

В Україні селекцією бульбочкових бактерій нуту з 1983 року стали займатися науковці Південного філіалу Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Метою наших досліджень було виділити нові штами ризобій нуту, встановити ефективність їх симбіозу із сучасними сортами цієї культури, вивчити технологічні властивості кращих за симбіотичними показниками штамів для виготовлення біопрепаратів на їхній основі.

Матеріали і методи. Виділення бульбочкових бактерій нуту з бульбочок рослин нуту проводили згідно з методичними рекомендаціями ВНДІСГМ РАСГН [2]. Для одержання вискоефективних штамів *M. ciceri*, пристосованих до сортів, які вирощуються в ґрунтово-кліматичних умовах Степу, використовували кореневі бульбочки нуту, а також зразки ґрунту з посівів Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення УААН, Луганського Інституту АПВ УААН і Саратовської дослідної станції (Росія).

Ефективність симбіотичної азотфіксації штамів *M. ciceri* з рослинами нуту оцінювали у вегетаційних дослідах у порівнянні з виробничими штамми 520, 522, 527, отриманими з міжнародної колекції ВНДІСГМ РАСГН [2]. Досліди проводили з сортами нуту селекції СГІ НАЦНАС УААН (Розана, Олександрит, Пам'ять, Тріумф) та Луганського інституту АПВ УААН (Колорит).

Насіння поверхнево стерилізували 96 %-ним етанолом протягом п'яти хвилин, висушували на повітрі і перед висіванням обробляли суспензією 7-добової культури ризобій із розрахунку 10^6 бактерій на одну насінину. Щільність суспензії бульбочкових бактерій визначали на фотоелектроколориметрі (КФК-2) при зеленому світловому фільтрі з довжиною хвилі 315 нм, за контроль служила дистильована вода.

Рослини нуту вирощували в посудинах з перфорованим дном, ємністю 500 см^3 , на простерилізованому безазотному субстраті – спученому вермикуліті (мінерал класу алюмосилікатів, слюдяна крихта фракції 2-5 мм), зволоженому модифікованим середовищем Красільнікова-Кореняко. Вирощували по дві рослини нуту в посудині до фази цвітіння, повторність була семиразовою. Визначали кількість, масу та нітрогеназну активність бульбочок, а також абсолютно суху речовину рослин. Нітрогеназну активність

бульбочок аналізували ацетиленовим методом на газовому хроматографі “Chrom-5” з полум’яно-іонізаційним детектором [3, 4].

Технологічність штамів оцінювали у порівнянні з виробничим штамом *M. ciceri* 522. Бульбочкові бактерії нуту вирощували в рекомендованих для повільноростучих бульбочкових бактерій (ПББ) рідких живильних середовищах протягом трьох діб при обертках качалки 220 об./хв та температурі 27 °С. Титр бульбочкових бактерій нуту в препаративних формах визначали методом висіву граничних розведень суспензії на агаризоване бобове середовище [5].

Вермикулітну форму біопрепарату виготовляли за технологією ризобофіту для сої (ТУ У 319.00494456-006-2002). При виготовленні гетерофазних форм препаратів у рідке середовище для культивування ПББ вносили 2 % лігнину, вермикуліту та біологічно активного мулу.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методом дисперсійного аналізу [6].

Результати та їх обговорення. У 1983-1995 рр. було виділено 13 штамів *M. ciceri*, у 2002-2003 рр. – ще 55 штамів, які в наших дослідженнях позначені як перспективні та нові штами, відповідно. Виділені штами підтримуються періодичними пересівами на агаризованому бобовому середовищі. Показано, що всі ці штами зберігають здатність формувати азотфіксувальні бульбочки у симбіозі з сортами нуту, що вирощуються в Україні.

Аналізували ефективність симбіозу отриманих штамів ризобій нуту з районованими і перспективними сортами нуту у вегетаційних дослідах на безазотному субстраті та відбирали ті з них, симбіотичні показники яких були на рівні виробничих штамів або перевищували їх.

У 2002 році було оцінено ефективність симбіозу 13 перспективних штамів *M. ciceri* з сортом Розана. У контрольному варіанті рослини нуту сорту Розана не утворювали бульбочок, за фенологічними спостереженнями з третього тижня відмічалось послаблення росту з ознаками азотного голодування, маса цих рослин була на 48,7-71,8 % меншою, ніж рослин варіанту досліду з інокуляцією штамами *M. ciceri* (табл. 1).

Таблиця 1. Ефективність симбіозу *Mesorhizobium ciceri* з нутом сорту Розана на безазотному субстраті (фаза цвітіння рослин)

Варіант досліджу	Кількість бульбочок на одну рослину, од.	Маса бульбочок, мг на рослину	Нітрогеназна активність, наномоль C_2H_4 на рослину за годину	Вміст сухої речовини, г на рослину
Контроль	–	–	–	1,99
Виробничі штами:				
520	21,6	266	1374	2,96
522	24,5	289	1708	3,04
Перспективні штами:				
Н-12	23,9	268	1882	3,23
Н-14	15,7	196	1309	3,04
Н-15	15,1	255	1213	3,11
Н-17	17,0	272	1961	3,39
Н-18	23,6	317	1896	3,42
Н-21	18,2	249	1148	3,09
Н-26	22,1	262	1882	3,05
Н-27	24,0	293	2148	3,23
Н-28	22,4	298	2348	3,37
НІР ₀₅	2,6	66	281	0,24

На основі аналізу кількості, маси бульбочок, нітрогеназної активності у фазу цвітіння рослин ефективнішим у симбіозі з сортом Розана серед виробничих штамі виявився *M. ciceri* 522. Щодо цих показників йому не поступалися перспективні штами Н-12, Н-18, Н-26, Н-27, Н-28. Урожайністю зеленої маси рослин у варіантах досліджу зі штамами Н-12, Н-18, Н-17, Н-28 перевищував цей показник у варіанті з даним виробничим штамом на 6,3-12,5 %.

У 2003 році вивчалася ефективність симбіозу двох сучасних сортів нуту Пам'ять і Колорит з виробничими, перспективними і новими штамами *M. ciceri*. Рослини в контрольному варіанті досліджу не утворювали бульбочок, і відзначались жовтувато-зеленим

кольором листя, тоді як у інокульованих рослин колір листя був темно-зеленим. У сорту Колорит під впливом інокуляції урожайність зеленої маси рослин збільшилась на 74,3-117,9 %, у сорту Пам'ять – на 80,2-120,3 % (табл. 2).

Таблиця 2. Ефективність інокуляції сортів нуту штамми *Mesorhizobium ciceri* на безазотному субстраті

Варіант досліджу	Урожайність зеленої маси, г на рослину	
	сорт Пам'ять	сорт Колорит
Контроль	2,37	2,18
Виробничі штамми:		
520	4,28	3,80
522	4,47	3,89
Перспективні штамми:		
Н-12	4,48	4,28
Н-18	4,27	4,27
Нові штамми:		
02	4,56	4,18
09	5,03	4,56
022	4,65	4,43
039	4,56	4,28
040	5,22	4,75
046	4,84	4,56
057	4,57	4,37
064	4,75	4,08
067	5,04	4,65
078	4,56	4,27
НІР ₀₅	0,29	0,33

Виробничі та перспективні штамми ризобій нуту мали подібні показники ефективності симбіозу з сортом Пам'ять. Цей сорт формував з новими штамми *M. ciceri* 064, 046, 09, 067 та 040 високоефективний симбіоз, істотно (на 6,0-22,2 %) перевищуючи за урожайністю фітомаси варіанти з виробничими та перспективними штамми.

Сорт Колорит також виявився чутливим до інокуляції пер-

спективними та новими штамми ризобій нуту. У симбіозі з перспективними штамми *M. ciceri* Н-12, Н-18 та новими штамми 040, 067 рослини цього сорту перевищували за урожайністю зеленої маси рослини, інокульовані виробничими штамми, на 10,0-12,4 % та на 8,6-11,2 %, відповідно.

У 2004 році вивчалася ефективність симбіозу нуту сорту Олександрит з 63-ма штамми *M. ciceri*. Виробничі штами були близькі між собою за симбіотичною ефективністю і серед них за комплексом показників виділявся штам *M. ciceri* 520 (табл. 3). Ефективність симбіозу семи перспективних штамів з нутом сорту Олександрит була на рівні ефективності штаму *M. ciceri* 520, але нітрогеназна активність штамів Н-22 та Н-28 перевищувала нітрогеназну активність даного виробничого штаму відповідно у 1,6 та 3,8 рази.

Серед дев'яти нових штамів виділявся штам *M. ciceri* 068, який істотно перевищував штам 520 за активністю та ефективністю симбіотичної азотфіксації, не поступаючись йому за іншими показниками симбіозу з сортом Олександрит. Урожайність фітомаси нуту у варіанті досліду зі штамом *M. ciceri* 068 перевищила цей показник варіанту з виробничим штамом 520 на 13,9 %.

У 2005 році вивчалася ефективність симбіозу нуту сорту Тріумф з 22-ма виробничими, перспективними та новими штамми *M. ciceri*. В цьому досліді як контроль використовувалось нестерильне насіння нуту для порівняння ефективності бульбочкових бактерій епіфітної мікрофлори насіння з інокуляцією ефективними штамми *M. ciceri*.

Серед виробничих штамів за комплексом показників симбіотичної ефективності відзначено штамми *M. ciceri* 522 та 527 (табл. 4). Усі перспективні і нові штамми *M. ciceri* показали високу ефективність симбіозу з цим сортом – на рівні і вище даних виробничих штамів. Перспективні штамми Н-14, Н-17, Н-18 за ефективністю симбіотичної азотфіксації були кращими і переважали штам 527 за урожайністю фітомаси інокульованих рослин на 20,0-29,9 %.

За результатами досліджень, проведених з різними сортами нуту, були відібрані два кращих штамми *M. ciceri* Н-12 і Н-18, які передано до національної колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів при Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН.

Таблиця 3. Ефективність симбіозу нуту сорту Олександрит з штамами *Mesorhizobium ciceri* (фаза цвітіння рослин)

Варіант дослідю	Кількість бульбочок на одну рослину, од.	Маса бульбочок, мг на рослину	Нітрогеназна активність, наномоль C_2H_4 на рослину за годину	Вміст сухої речовини, г на рослину
Контроль	0	0	0	2,76
Виробничі штами:				
520	44,1	750	692	5,81
522	30,1	998	352	5,36
527	49,0	651	583	5,75
Перспективні штами:				
Н-12	33,2	475	425	5,55
Н-14	37,0	690	656	5,96
Н-17	38,0	460	437	5,54
Н-18	47,1	652	717	5,83
Н-22	42,4	620	1081	5,69
Н-27	38,0	772	790	5,43
Н-28	31,3	815	2649	5,53
Нові штами:				
068	48,1	730	1482	6,55
044	46,0	570	583	6,35
039	44,8	545	437	6,28
050	43,0	630	765	6,20
063	44,9	430	595	6,08
061	39,0	570	644	6,04
041	42,8	620	863	5,95
053	32,1	499	583	5,69
065	48,0	695	462	5,52
НІР ₀₅	5,5	144	259	0,58

Таблиця 4. Ефективність симбіозу штамів *Mesorhizobium ciceri* з нутом крупнозерного сорту Тріумф (фаза цвітіння рослин)

Варіант досліджу	Кількість бульбочок на одну рослину, од.	Маса бульбочок, мг на рослину	Нітрогеназна активність, наномоль C_2H_4 на рослину за годину	Вміст сухої речовини, г на рослину
Контроль	25,0	400	270	3,89
Виробничі штами:				
520	55,1	440	4027	3,51
522	79,0	580	2925	4,36
527	74,1	570	1596	4,75
Перспективні штами:				
Н-12	80,3	480	1311	4,74
ПН-12	77,1	550	969	4,55
Н-14	67,0	520	1520	6,16
Н-17	57,0	420	1406	5,70
Н-18	57,1	540	2013	6,17
Н-22	53,0	440	456	4,83
Н-24	69,9	560	1406	4,37
Н-27	50,1	490	2773	4,65
Н-28	65,2	490	4179	4,27
Нові штами:				
039	77,0	580	456	4,37
044	71,0	520	2773	4,83
050	68,4	500	2925	5,02
051	63,0	580	4406	4,70
063	80,1	550	2754	4,74
065	72,2	500	1577	4,36
068	81,0	530	3001	4,76
075	57,3	530	2621	4,93
077	52,0	480	1083	4,36
НС-6	63,2	450	1159	4,85
НІР ₀₅	12,1	90	2001	0,56

Було вивчено технологічні властивості даних штамів у порівнянні з виробничим штамом 522, зокрема здатність формувати високий титр клітин у рідких живильних середовищах та різних препаративних формах і зберігати його тривалий час.

При культивуванні усіх штамів *M. ciceri* спостерігалось підкислення середовища, що пояснюється утворенням органічних кислот у процесі метаболізму вуглеводів.

В реактиваційному середовищі титри *M. ciceri* Н-12, Н-18 були нижчі за стандарт на 1,8 та 2,2 млрд КУО/мл або на 24-29 %, а у виробничому середовищі досліджувані штами виявилися більш технологічними – їхні титри перевищували титр штаму *M. ciceri* 522 відповідно у 2,5 та 1,5 раза (табл. 5).

Таблиця 5. Технологічні властивості штамів *Mesorhizobium ciceri* у рідких стандартних середовищах (млрд КУО в 1 мл)

Штам	Реактиваційне середовище			Виробниче середовище		
	рН середовища	рН культури	титр, млрд КУО/мл	рН середовища	рН культури	титр, млрд КУО/мл
522	6,9	4,5	7,5 ± 0,17	6,8	5,3	18,5 ± 0,03
Н-12	6,9	4,5	5,3 ± 0,65	6,8	5,4	44,5 ± 0,29
Н-18	6,9	4,5	5,7 ± 0,17	6,8	5,3	28,5 ± 0,29

Було вивчено збереженість штаму *M. ciceri* Н-12 у різних препаративних формах, виготовлених за технологією ризобіфіту для сої. Титр ризобій нуту після двотижневого зберігання у рідкій препаративній формі знижувався у 14 разів і становив 3,7 млрд КУО/мл, а при подальшому зберіганні клітини втрачали життєздатність.

Титр *M. ciceri* Н-12 у вермікулітній, торф'яній та гетерофазній препаративних формах також знижувався проти вихідного, але зберігався на достатньому для нітрагінізації насіння рівні протягом двох місяців. Таким чином, виявлена можливість зберігання ризобій нуту з титром 4,5-7,5 млрд/г в досліджуваних препаративних формах протягом двох місяців.

На основі штаму *M. ciceri* Н-12 були виготовлені сипучі препарати бульбочкових бактерій нуту з торф'яним, лігніновим і вермікулітним наповнювачами та визначено можливі строки їх зберігання (табл. 6).

Таблиця 6. Вживання *Mesorizobium ciceri* Н-12 у сипучих субстратах, млрд КУО в 1 г препарату

Варіанти досліду	Вихідний титр	1 місяць зберігання	2 місяці зберігання	3 місяці зберігання
Торф	5,4 ± 0,10	2,8 ± 0,10	2,5 ± 0,06	2,2 ± 0,00
Лігнін	7,2 ± 0,20	3,9 ± 0,10	3,1 ± 0,12	0,9 ± 0,00
Вермикуліт	6,3 ± 0,24	3,7 ± 0,20	2,0 ± 0,03	0,4 ± 0,00
Вермикуліт + 2 % активного мулу	5,8 ± 0,03	3,1 ± 0,03	2,7 ± 0,00	0,3 ± 0,00

Показано, що серед досліджуваних субстратів термостерильний торф є найкращим для виготовлення біопрепаратів *M. ciceri* Н-12. Після тримісячного зберігання титр клітин зменшився в 2,5 раза від вихідного і становив 2,2 млрд/г. Лігніновий препарат мав найвищий вихідний титр $7,2 \times 10^9$ КУО/г і протягом двох місяців чисельність бактерій у ньому зберігалася на рівні $3,1-3,9 \times 10^9$ КУО/г. У вермикуліті та у вермикуліті з додаванням 2 % біологічно активного мулу, як і при використанні лігніну, високий титр ризобій нуту також зберігався не більше двох місяців.

Таким чином, з бульбочок нуту в чисту культуру виділено 68 штамів *M. ciceri* та проаналізовано ефективність їх симбіозу з п'ятьма сучасними сортами нуту. Отримано високоефективні штами *M. ciceri* Н-12, Н-17, Н-18, 040, 067, 068, здатні підвищувати урожайність зеленої маси нуту на 6-30 % порівняно з виробничими штамми. Штами Н-12, Н-18 рекомендовано для виготовлення ризобіофіту для нуту.

Показано, що у гетерофазній формі препарату з добавкою 2 % пилу вермикуліту та у сипучих формах на основі торфу, лігніну, вермикуліту та вермикуліту з добавкою 2 % активного мулу необхідний для нітрагінізації титр бульбочкових бактерій *M. ciceri* Н-12 зберігається до двох місяців. Найвищий титр клітин бактерій (2,2 млрд/г) зберігається в сипучих препаратах з торф'яним наповнювачем – до трьох місяців.

1. Толкачёв Н.З., Шерстобоева Е.В., Мельничук Т.Н. и др. Биологическая технология выращивания нута / Инф. листок. – Симферополь: КРИЦНТЭИ, 2002. – № 2. – 4 с.
2. Методы исследований клубеньковых бактерий: Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии – Л., 1981. – 48 с.
3. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. – Л., 1982. – 12 с.
4. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.G. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation laboratory and field evaluation // Plant. Physiol. – 1968. – Vol. 42, № 8. – P. 1185-1207.
5. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий и способы получения препаратов на их основе (Методические рекомендации). – Л., 1991. – 60 с.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

ЭФФЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ *MESORHIZOBIUM CICERI* ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РИЗОБОФИТА ПОД НУТ (*CICER ARIETINUM*)

Дидович С.В., Толкачёв Н.З., Каменева И.А.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

Из клубеньков нута выделено 68 штаммов Mesorhizobium ciceri и установлена эффективность их симбиоза с современными сортами нута. При использовании штаммов M. ciceri Н-12, ПН-12, Н-18, 068, НС-6 в условиях вегетационных опытов урожай зеленой массы нута был на 6-30 % выше в сравнении производственными штаммами. Технологичный штамм Н-12 рекомендован для изготовления ризобифита под нут.

Ключевые слова: *Mesorhizobium ciceri*, нут, симбиотическая азотфиксация, препаративная форма.

**EFFICIENT STRAINS OF *MESORHIZOBIUM CICERI*
FOR PREPARATION OF RHIZOBOFIT FOR CHICKPEA
(*CICER ARIETINUM*)**

Didovich S.V., Tolkachov N.Z., Kameneva I.A.

The South Experimental Station of Institute of Agricultural
Microbiology UAAS, Gvardeyskoye

68 strains of M. ciceri have been isolated from chickpea nodules and efficiency of their symbiosis with modern chickpea sorts has been studied in greenhouse experiments. High efficient strains of Mesorhizobium ciceri H-12, ПН-12, H-18, 068, HC-6 increased yield of chickpea green mass to 6-30% in comparison with standard strains in greenhouse experiments. The technological strain H-12 was recommended to manufacture rhizobofit for chickpea.

Key words: Mesorhizobium ciceri, chickpea, symbiotic nitrogen fixation, preparation form.