

СЕЛЕКЦІЯ НОВИХ ШТАМІВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ-СИМБІОНТІВ *MELILOTUS ALBUS* ТА *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM*

О. В. Логоша^{1,2}, Ю. О. Воробей¹, Т. О. Усманова¹

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14030, Україна

²Національний університет «Чернігівська політехніка»
вул. Шевченка, 95, м. Чернігів, 14030, Україна

e-mail: olha.lohosha@gmail.com

Мета. Вивчити властивості ефективних штамів бульбочкових бактерій-мікросимбіонтів буркуну білого (*Melilotus albus*) та гуньби сінної (*Trigonella foenum-graecum*). **Методи.** Мікробіологічні, біохімічні, вегетаційного дослідження, статистичні. **Результати.** Протягом 2016–2021 рр. проведено пошук активних штамів бульбочкових бактерій малопоширених видів бобових рослин. Методами аналітичної селекції одержано 11 штамів *Ensifer* sp. — мікросимбіонтів буркуну білого та 3 — гуньби сінної. Показано, що інокуляція насіння буркуну білого бактеріальними суспензіями нових штамів *Ensifer* sp. BR-4 та BR-201 сприяє підвищенню утворення бульбочок на коренях рослин на 15 % та 24 % проти позитивного контролю (інокуляція *Ensifer meliloti* ДН-15), а також збільшенню вегетативної маси — на 25 % та 39 % відповідно. Також встановлено, що за інокуляції насіння суспензіями штамів *Ensifer* sp. G-6 та G-10 кількість бульбочок на 52 % і 72 % перевищувала цей показник позитивного контролю, приріст вегетативної маси складав 4 % та 25 % відповідно. Досліджено особливості росту нових ефективних штамів ризобій на гороховому агаризованому середовищі, м'ясо-пептонному та манітно-дріжджовому агарі, лакмусовому молоці, здатність засвоювати різні джерела вуглецю та азоту, резистентність до антибіотиків. Показано відмінності в характері росту на МПА і засвоєнні джерел азоту та вуглецю ризобій буркуну і гуньби. За результатами досліджень культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей нових ізолятів-мікросимбіонтів буркуну білого та гуньби сінної показано, що вони відповідають властивостям референтного штаму та характеристикам виду *E. meliloti*. **Висновки.** Методами аналітичної селекції одержано нові штами мікросимбіонтів буркуну білого та гуньби сінної. Встановлено позитивний вплив бактеризації насіння зазначених культур бактеріальними суспензіями одержаних штамів на симбіотичну активність і продуктивність рослин. За культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними особливостями встановлено належність нових ізолятів виду *E. meliloti*. Виявлено відмінності між ризобіями *Melilotus albus* і *Trigonella foenum-graecum* за характером росту на МПА та засвоєнням вуглецю й азоту.

Ключові слова: *Ensifer meliloti*, бобові рослини, інокуляція, симбіоз, буркун білий, гуньба сінна.

Особливе значення в світовому сільськогосподарському виробництві мають бобові культури, адже з кожним роком потреба в рослинному білку невіддільно зростає, що зумовлює інтенсивне розширення посівних площ [1; 2].

Бобові трави є важливим джерелом корисних та одним із основних факторів біологізації ґрунту [3]. Вирощування в сівозміні бобових трав сприяє підвищенню родючості ґрунтів завдяки їхній здатності засвоювати молекулярний азот повітря в симбіозі

зі специфічними бульбочковими бактеріями [4; 5]. У ґрунті може накопичуватися 100–300 кг/га біологічного азоту залежно від культури і ґрунтово-кліматичних особливостей, що сприятливо позначається на продуктивності сівозміни та забезпечує зменшення використання мінеральних добрив [6].

Багаторічні бобові трави є основним джерелом підвищення вмісту білка в кормах, адже в сухій речовині рослин залежно від виду міститься від 17 % до 22 % протеїну (у злакових травах цей показник змінюється від 8 % до 12 %) [7]. Тому вирощування бобових як компонентів агроценозів підвищує продуктивність останніх та є ефективним прийомом збільшення якості кормів [1; 8]. Серед видів бобових трав буркун та гуньба (тригонела) є важливими кормовими культурами, які використовуються в сільському господарстві різних країн [9; 10].

За даними вітчизняних вчених, у ґрунтах України наявні ефективні аборигенні популяції мікросимбіонтів *Melilotus albus* і *Trigonella foenum-graecum* та інших бобових культур [11]. Проте наявні в ґрунті популяції ризобій можуть мати невисоку азотфіксувальну активність або кількість бактерій може бути недостатньою для ефективною нодуляції бобових рослин [12]. Важливим прийомом у технологіях вирощування бобових трав для підвищення їхньої продуктивності є передпосівна інокуляція насіння мікробними препаратами на основі селекціонованих культур специфічних бульбочкових бактерій [13; 14]. Тому актуальним є проведення аналітичної селекції нових ефективних штамів ризобій — перспективних біоагентів мікробних препаратів для забезпечення ефективного, екологічно збалансованого аграрного виробництва.

Аналіз останніх досліджень і публікацій з досліджуваної теми. Важливою бобовою культурою є буркун білий (*Melilotus albus*). Це однорічна або дворічна посухостійка рослина родини бобових [9; 15], яка має багатоцільове використання в Україні як високопродуктивна кормова білкова рослина, а також як один із найкращих сидератів [16]. Буркун білий є однією з найцінніших медоносних видів рослин, а також характеризується важливими якостями фармацевтичної сировини, що зумовлює введення цієї культури в сівозміни [17; 18]. Важливою біо-

логічною особливістю буркуну білого є здатність формувати високі врожаї зеленої маси на піщаних, малородючих та засолених ґрунтах, висока посухостійкість і зимостійкість [15; 17].

Гуньба (*Trigonella foenum-graecum*) — одна з найдавніших культурних рослин роду *Trigonella*, яка відома в багатьох країнах, має різні назви: буркотина, грецьке сіно, окладник, сіре зілля, пажитник, шамбала, фенугрек, чаман, грибна трава. Зацікавленість цією культурою постійно зростає, її вивчають у багатьох країнах і виявляють нові корисні властивості [10; 19]. Проте, попри все вищезазначене, особливості вирощування цієї культури та її симбіотичні властивості в умовах України вивчено недостатньо.

Рослини буркуну і гуньби можуть вступати в симбіоз із бульбочковими бактеріями *Ensifer meliloti* [20]. Раніше представників цього виду мікроорганізмів зараховували до родів *Sinorhizobium* та *Rhizobium* [20; 21]. За даними окремих дослідників, бактерії *E. meliloti* також можуть бути мікросимбіонтами люцерни [22]. Отже, штамми цього виду демонструють різний ступінь специфічності щодо рослини-господаря, що визначається типом ексудатів, які продукують ризобії [20–22].

У зв'язку з важливістю буркуну і гуньби для аграрного виробництва, метою нашої роботи був пошук активних штамів бульбочкових бактерій *E. meliloti*, вивчення їхніх культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних властивостей та здатності утворювати ефективний симбіоз з рослинами *Melilotus albus* і *Trigonella foenum-graecum*.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії фізіології мікроорганізмів та на базі Національної колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН).

У роботі використано референтний штам *E. meliloti* ДН-15 (виділений із бульбочок буркуну), який зберігається в Національній колекції корисних мікроорганізмів ІСМАВ НААН, нові штамми бульбочкових бактерій буркуну та гуньби, отримані з природних популяцій протягом 2016–2021 рр.

Виділення ізолятів ризобій проводили у фазу цвітіння рослин модифікованим методом: бульбочки промивали та поверхнево

стерилізували етанолом протягом 1 хв., потім сулемою (1 хв.) і знову етанолом упродовж 1 хв. Поверхнево стерилізовані бульбочки розкладали в чашки Петрі з агаризованим бобовим середовищем по 2–3 шт., роздавлювали скляною паличкою об стінку чашки та паличкою робили посів штрихом. Культивували 7 діб за температури 28 °C [23].

Швидкорослі ризобії вирощували на живильному бобовому середовищі (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,0; K_2HPO_4 — 0,5; KH_2PO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; CaCO_3 — 1,0; цукроза — 10,0; відвар гороху — 1 л (100 г гороху в 1 л H_2O), агар-агар — 10,0–15,0 г, рН 6,8–7,0. Стерилізація — 1,0 атм., 30 хв. [18].

Ідентифікацію бульбочкових бактерій здійснювали за визначником Берджі [20]. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штамів вивчали згідно із загальноприйнятими мікробіологічними та біохімічними методами, для культивування бактерій використовували манітно-дріжджове середовище (МДА) [23; 24]. Здатність ризобій асимілювати вуглеводи та засвоювати джерела азоту досліджували на мінеральному середовищі Козера [23].

Вивчення антибіотикорезистентності штамів проводили диско-дифузійним методом [25], використовували паперові диски з ампіциліном (10 мкг/диск), гентаміцином (10 мкг/диск), тетрацикліном (30 мкг/диск), стрептоміцином (10 мкг/диск).

Морфологічні особливості клітин бактерій визначали за використання світлової мікроскопії (мікроскоп Micros MC 200T).

Нодуляційну здатність виділених ізолятів бактерій та накопичення біомаси рослинами за інокуляції вивчали в умовах вегетаційних дослідів. Повторність дослідів — чотирикратна. Рослини буркуну та гуньби вирощували на стерильному субстраті (вермикуліті), у посудинах об'ємом 1 л в люміностації протягом 45 днів за інтенсивності освітлення 20 тис. люкс; світловий період становив 16 годин та температурний режим 27 ± 3 °C. Насіння поверхнево стерилізували 96 %-м етанолом протягом 15 хв., потім промивали водогінною водою і за дві години до висіву обробляли суспензією 7-добової культури бульбочкових бактерій із розрахунку 10^6 клітин/насінину.

Суху масу коренів та суху надземну масу рослин визначали ваговим методом. Для

цього брали по 10 рослин з кожної повторності, висушували в сушильній шафі упродовж 20–30 хв. за температури 120–130 °C. Далі температуру знижували до 105 °C і сушили зразки протягом 4–6 годин за температури 105 °C до повітряно-сухого стану. Визначали середню масу в розрахунку на одну рослину [26].

Обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою методів математичної статистики та дисперсійного аналізу з використанням пакету комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Протягом 2016–2021 рр. проведено пошук активних штамів бульбочкових бактерій рослин буркуну білого та гуньби сінної, що вирощувалися на полях Чернігівської області. У фазу цвітіння відбирали добре розвинені рослини, на коренях яких були сформовані бульбочки рожевого кольору в розрізі.

Встановлено, що в ґрунтах Чернігівської області наявні природні раси специфічних ризобій, які забезпечують утворення активних бульбочок на коренях досліджуваних рослин. Було виділено 11 ізолятів з бульбочок буркуну білого та 3 ізоляти з бульбочок гуньби сінної.

Ризобії буркуну і гуньби паличкоподібної форми, неспороутворювальні, грамнегативні, рухливі, аеробні. На МДА та на бобовому середовищі на третю добу утворюють круглі, опуклі, непрозорі та слизові колонії діаметром 2–3 мм. Культурально-морфологічні ознаки отриманих ізолятів відповідають характеристиці, наведеній у визначнику Берджі [20] для роду *Sinorizobium*, до якого раніше зараховували види бульбочкових бактерій, що формують симбіоз з рослинами буркуну та гуньби [22]. На сьогодні види цього роду належать до роду *Ensifer*, але досі немає однозначної думки щодо правильності такої класифікації [27].

Вивчали здатність отриманих ізолятів штамів бульбочкових бактерій до формування симбіозу з рослинами буркуну білого та гуньби сінної. Показано, що інокуляція насіння гуньби суспензією *Ensifer* sp. G-9 не забезпечувала утворення бульбочок (табл. 1). За бактеризації насіння гуньби *Ensifer* sp. G-6 та *Ensifer* sp. G-10 на коренях рослин формувалося на 52 % та 72 % більше бульбочок,

Таблиця 1. Ефективність симбіотичної взаємодії бульбочкових бактерій гуньби (*Trigonella foenum-graecum*) в умовах вегетаційного дослідю

Варіанти дослідю	Кількість бульбочок, од./10 рослин	Надземна маса, мг/рослину	Маса коренів, мг/рослину
Контроль (без інокуляції)	0	159,0 ± 13,9	374,0 ± 25,7
За інокуляції			
<i>E. meliloti</i> ДН-15 (позитивний контроль)	32,0 ± 2,9	180,0 ± 28,3	440,0 ± 37,4
<i>Ensifer</i> sp. G-6	47,5 ± 4,8	187,0 ± 23,3	445,5 ± 27,0
<i>Ensifer</i> sp. G-9	0	175,0 ± 16,7	402,5 ± 35,4
<i>Ensifer</i> sp. G-10	55,0 ± 2,4	225,0 ± 27,3	510,0 ± 36,2

ніж на рослинах позитивного контролю (інокуляція *E. meliloti* ДН-15). Також у варіантах з інокуляцією цими штамми підвищувалися показники вегетативної маси на 17,6 % та 25 % і маса коренів — на 19 % та 36 % проти позитивного контролю відповідно (табл. 1).

Інокуляція насіння буркуну бактеріальними суспензіями *Ensifer* sp. BR-4 та *Ensifer* sp. BR-201 сприяла формуванню на коренях рослин найбільшої кількості бульбочок — на 15 % та 24 % більше, ніж у позитивному контролі (табл. 2), а також сприяла збільшенню показників вегетативної маси —

на 25 % та 39 % і маси коренів рослин — на 77 % та 58 % проти позитивного контролю відповідно.

Досліджували властивості нових ефективних штамів *Ensifer* sp. Показано, що симбіонти буркуну і гуньби відрізняються за здатністю розвиватися на м'ясо-пептонному агарі.

Так, бульбочкові бактерії буркуну характеризуються помірним ростом на МПА, тоді як розвитку ризобій гуньби на цьому середовищі ми не спостерігали (табл. 3). Згідно з характеристиками, наведеними у визначнику

Таблиця 2. Ефективність симбіотичної взаємодії штамів бульбочкових бактерій буркуну (*Melilotus albus*) в умовах вегетаційного дослідю

Варіанти дослідю	Кількість бульбочок, од./10 рослин	Надземна маса, мг/рослину	Маса коренів, мг/рослину
Контроль (без інокуляції)	0,00	106,7 ± 6,9	128,9 ± 4,8
За інокуляції			
<i>E. meliloti</i> ДН-15 (позитивний контроль)	48,9 ± 2,9	130,0 ± 5,8	160,0 ± 1,9
<i>Ensifer</i> sp. BR-1	50,0 ± 1,9	120,0 ± 5,8	173,3 ± 1,9
<i>Ensifer</i> sp. BR-4	57,8 ± 2,9	162,2 ± 8,7	283,3 ± 1,9
<i>Ensifer</i> sp. BR-6	52,2 ± 2,9	126,7 ± 6,7	206,7 ± 3,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-8	51,1 ± 4,8	120,0 ± 8,8	158,9 ± 4,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-9	54,4 ± 4,8	110,0 ± 3,8	140,0 ± 5,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-10	50,0 ± 1,9	112,1 ± 6,8	165,6 ± 2,9
<i>Ensifer</i> sp. BR-11	51,1 ± 4,0	122,2 ± 5,9	170,0 ± 5,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-151	51,1 ± 2,9	113,3 ± 3,8	163,3 ± 5,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-16	53,3 ± 5,8	120,0 ± 5,8	165,6 ± 2,9
<i>Ensifer</i> sp. BR-201	62,2 ± 4,0	180,0 ± 5,8	252,2 ± 7,8
<i>Ensifer</i> sp. BR-22	53,3 ± 4,8	123,3 ± 6,9	160,0 ± 5,8

Берджі [20], бульбочкові бактерії буркуну та гуньби пептон засвоюють слабо.

Важливим показником для ідентифікації бульбочкових бактерій є характер їхнього росту на лакмусовому молоці. За даними, наведеними у визначнику Берджі [20], бактерії роду *Sinorizobium* казеїн та агар не гідролізують [20], підкислюють середовище без газоутворення. Після перенесення виду *S. meliloti* до роду *Ensifer* ця характеристика не була уточнена, тому є неоднозначною.

Нами показано, що за культивування референтного штаму *E. meliloti* ДН-15 та 4 досліджуваних ізолятів на знежиреному стерильному молоці з лакмусом на сьому добу відбувається незначне підкислення середовища та утворення зони гідролізу (табл. 3, рис. 1).

За культивування ризобій гуньби та буркуну на цьому середовищі спостерігали

утворення прозорої зони на його поверхні. Це зумовлено наявністю у цих бактерій ферментів, що гідролізують казеїн (рис. 1).

Культивування досліджуваних штамів на 7-му добу сприяє відновленню лакмусу, внаслідок чого колір нижнього шару середовища світлішає. Пептонізація лакмусового молока за культивування референтних та досліджуваних ізолятів бульбочкових бактерій не відзначалася.

Важливою систематичною характеристикою ризобій є здатність засвоювати джерела азоту та вуглецю.

В умовах лабораторних дослідів на мінеральному середовищі Козера перевіряли здатність ізолятів бактерій роду *Ensifer* використовувати різні джерела азоту (табл. 4). За даними визначника Берджі [20], бактерії *S. meliloti* можуть використовувати як джерела азоту солі амонію, нітрати, нітрити та

Таблиця 3. Властивості штамів бульбочкових бактерій гуньби та буркуну

Штами	Ріст на МПА	Культивування на лакмусовому молоці			
		рН середовища		гідроліз казеїну	відновлення лакмусу
		на 7-му добу	на 30-ту добу		
<i>E. meliloti</i> ДН-15	+	ск	к	++	+
<i>Ensifer</i> sp. G-6	–	ск	к	+	+
<i>Ensifer</i> sp. G-10	–	ск	к	+	+
<i>Ensifer</i> sp. BR-4	+	ск	к	++	+
<i>Ensifer</i> sp. BR-201	+	ск	к	++	+

Примітки: – — відсутність прояву ознаки, + — помірний прояв ознаки, ++ — значний прояв ознаки; ск — рН середовища слабо-кисле (6–6,5), к — рН кисле (4–5,5).

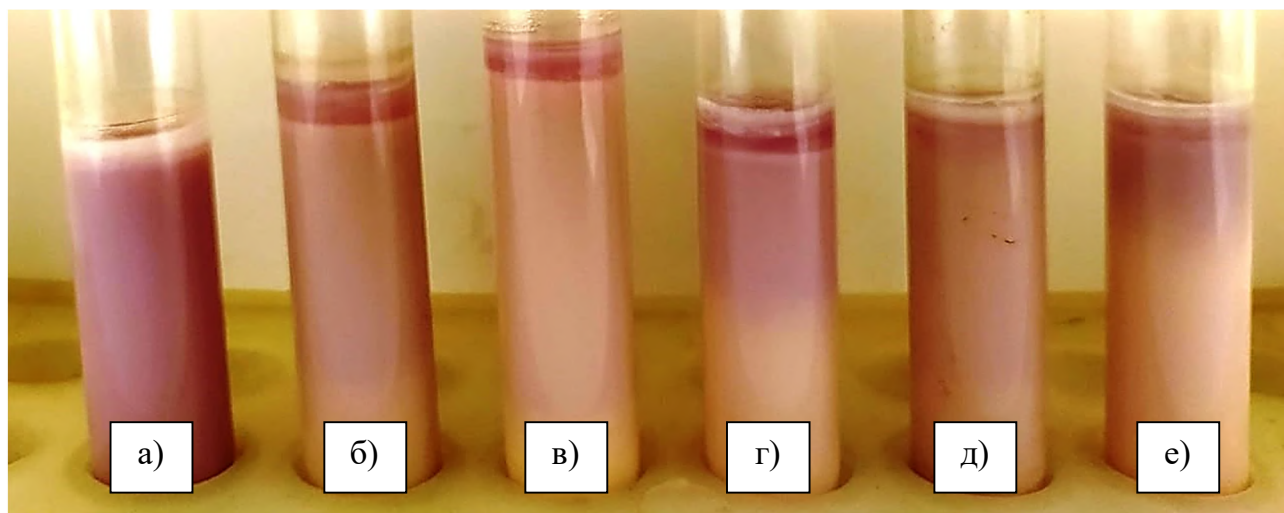


Рис. 1. Культивування на лакмусовому молоці штамів: а) контроль; б) *E. meliloti* ДН-15; в) *Ensifer* sp. BR-4; г) *Ensifer* sp. BR-201; д) *Ensifer* sp. G-6; е) *Ensifer* sp. G-10 (7-ма доба).

Таблиця 4. Використання джерел азоту штамми бактерій роду *Ensifer* (середовище Козера)

Джерело азоту		Засвоєння джерел азоту штамми				
		<i>E. meliloti</i> ДН-15	<i>Ensifer</i> sp. BR-4	<i>Ensifer</i> sp. BR-201	<i>Ensifer</i> sp. G-6	<i>Ensifer</i> sp. G-10
Аспарагін	Ріст	Помір.	Рясн.	Помір.	Рясн.	Помір.
	ЕПС	–	++	–	++	–
Сечовина	Ріст	Слабк.	Помір.	Помір.	Слабк.	Слабк.
	ЕПС	–	+	+	–	–
Аланін	Ріст	Помір.	Рясн.	Слабк.	Слабк.	Слабк.
	ЕПС	+	+	–	–	–
Орнітин	Ріст	Помір.	Слабк.	Слабк.	Помір.	Рясн.
	ЕПС	+	–	–	+	+++
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Ріст	Рясн.	Рясн.	Рясн.	Рясн.	Рясн.
	ЕПС	++	++	++	++	++
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ріст	Помір.	Помір.	Помір.	Помір.	Помір.
	ЕПС	+	+	+	+	+
NH ₄ Cl	Ріст	Помір.	Помір.	Слабк.	Слабк.	Помір.
	ЕПС	+	+	+	+	+
NH ₄ NO ₃	Ріст	Помір.	Помір.	Помір.	Помір.	Слабк.
	ЕПС	+	++	++	+	+
NaNO ₃	Ріст	Помір.	Слабк.	Слабк.	Слабк.	Слабк.
	ЕПС	+	+	++	++	++

Примітки: + — незначне продукування ЕПС (екзополісахаридів), ++ — помірне продукування ЕПС, +++ — рясне продукування ЕПС.

більшість амінокислот, зокрема аланін та орнітин.

Показано, що засвоєння сполук азоту є певною мірою індивідуальною штамовою ознакою. Так, референтний штам *E. meliloti* ДН-15 та нові штамми ризобій буркуну і гуньби як джерело азоту використовують амонійні, нітратні, амідні солі. Проте всі досліджувані штамми найкраще ростуть на середовищі з амонієм фосфорнокислим. Ризобії буркуну краще засвоюють сечовину, ніж бульбочкові бактерії гуньби. На середовищах з амонійними та нітратними формами штамми росли краще, ніж на середовищах з аспарагіном, аланіном та орнітином. На середовищі з різними джерелами азоту досліджувані штамми продукували помірну кількість полісахаридів, слизова маса не розтікалася по скосу агару. За умови слабого росту культур екзополісахариди практично не утворювалися.

Згідно з даними визначника Берджі [20], мікросимбіонти бактерії роду *Sinorizobium* (нині *Ensifer*) використовують порівняно широкий спектр органічних субстратів як єдине джерело вуглецю, викликають кислу реакцію в мінерально-сольовому середовищі, що містить маніт. Зростання на вуглеводних середовищах часто супроводжується рясним позаклітинним утворенням полісахаридного слизу.

Вивчали здатність бульбочкових бактерій буркуну і гуньби засвоювати різні джерела вуглецю. Показано, що всі досліджувані штамми бактерій роду *Ensifer* sp. активно ростуть на діагностичному середовищі Козера та засвоюють глюкозу, лактозу, фукозу, рамнозу, Д-арабінозу, продукуючи кислоту (табл. 5). Референтний штам *E. meliloti* ДН-15 та штамми *Ensifer* sp. підлюговують реакцію середовища з дульцитом (рис. 2, табл. 5), помірно підкислюють середовище із сорбітом

Таблиця 5. Використання штамами роду *Ensifer* джерел вуглецю

Джерело вуглецю	Засвоєння джерел вуглецю штамами				
	<i>E. meliloti</i> ДН-15	<i>Ensifer</i> sp. BR-4	<i>Ensifer</i> sp. BR-201	<i>Ensifer</i> sp. G-6	<i>Ensifer</i> sp. G-10
Контроль (без вуглеводів)	н	н	н	н	н
Фруктоза	п/к	к	к	п/к	п/к
Маніт	п/к	п/к	п/к	к	к
Дульцит	п/л	п/л	п/л	л	л
Глюкоза	к	к	к	к	к
Лактоза	к	к	к	к	к
Сорбіт	п/к	п/к	п/к	п/к	п/к
Фукоза	к	к	к	к	к
Ксилоза	п/к	к	к	п/к	п/к
Рамноза	к	к	к	к	к
Мальтоза	к	к	к	п/к	п/к
Сахароза	п/к	п/к	п/к	к	к
D-арабіноза	к	к	к	к	к

Примітки: к — підкислюють середовище; п/к — помірно підкислюють середовище; п/л — помірно підлужують середовище; л — підлужують середовище; н — нейтральна реакція рН середовища.

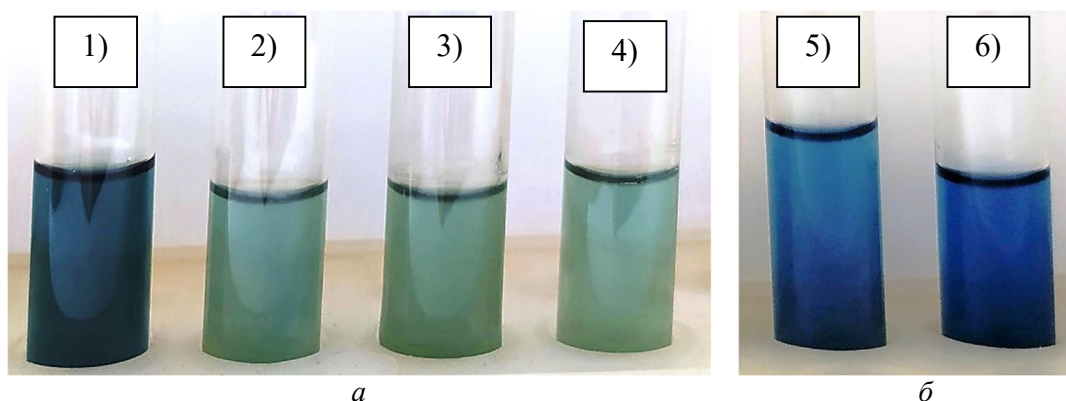


Рис. 2. Засвоєння дульциту ризобіями буркуну (а) та гуньби (б):
1) контроль; 2) *E. meliloti* ДН-15; 3) *Ensifer* sp. BR-4; 4) *Ensifer* sp. BR-201;
5) *Ensifer* sp. G-6; 6) *Ensifer* sp. G-10 (14-та доба).

та манітом, що відповідає характеристиці роду *Sinorizobium* (нині *Ensifer*).

Штами, виділені з бульбочок гуньби сінної, слабо засвоюють фруктозу, ксилол та мальтозу, помірно підкислюючи середовище. Штами буркуну помірно підкислюють середовище з манітом та сахарозою (табл. 5).

У визначнику Берджі відсутні дані щодо стійкості бактерій *S. meliloti* до антибіотиків [20]. Згідно з результатами досліджень марокканських вчених, бактерії цього роду розвивалися на середовищах зі стреп-

томіцином (10 і 25 мкг/мл) і тетрацикліном (10 і 25 мкг/мл) [28].

Нами було досліджено антибіотикорезистентність *Ensifer* spp. до антибіотиків з різних груп: ампіциліну (бета-лактамі антибіотики (пеніциліни)), гентаміцину (аміноглікозиди), стрептоміцину (аміноглікозиди) і тетрацикліну (тетрацикліни).

У табл. 6 наведені результати вимірювання діаметру зон затримки росту культур за використання паперових дисків, просочених антибіотиками.

Таблиця 6. Резистентність штамів бактерій роду *Ensifer* до антибіотиків

Антибіотики	Діаметр зон затримки росту, см				
	<i>E. meliloti</i> ДН-15	<i>Ensifer</i> sp. BR-4	<i>Ensifer</i> sp. BR-201	<i>Ensifer</i> sp. G-6	<i>Ensifer</i> sp. G-10
Ампіцилін	0,40 ± 0,10	1,25 ± 0,25	–	0,90 ± 0,10	0,55 ± 0,05
Стрептоміцин	0,40 ± 0,10	–	3,55 ± 0,05	2,85 ± 0,35	3,75 ± 0,25
Гентаміцин	0,90 ± 0,10	0,70 ± 0,10	1,10 ± 0,30	1,25 ± 0,15	1,35 ± 0,05
Тетрациклін	3,65 ± 0,15	5,90 ± 0,10	5,10 ± 0,10	4,45 ± 0,05	4,10 ± 0,10

Усі досліджувані культури проявляли найбільшу чутливість до тетрацикліну (інгібітора бісинтезу білка на рівні рибосом). Так, зони затримки росту становили 3,65–5,90 см. До ампіциліну бактерії *Ensifer* sp. більш стійкі (зона затримки росту 0,40–1,25 см). Нові штами виявляли меншу резистентність до стрептоміцину та гентаміцину, як порівняти зі штамом *E. meliloti* ДН-15, окрім *Ensifer* sp. BR-4, що характеризувався стійкістю до стрептоміцину (табл. 6).

Висновки. Інокуляція насіння буркуну білого бактеріальними суспензіями нових штамів *Ensifer* sp. BR-4 та BR-201 сприяє підвищенню утворення бульбочок на коренях рослин на 15 % та 24 % щодо позитивного контролю (інокуляція *E. meliloti* ДН-15), а також зростанню вегетативної маси — на 25 % та 39 % відповідно. Також встановлено позитивний вплив бактеризації насіння гуньби сінної на нодуляційну активність і продуктивність культури. За інокуляції суспензіями штамів *Ensifer* sp. G-6 та G-10 утворювалось на 52 % і 72 % більше бульбочок, ніж за інокуляції *E. meliloti* ДН-15 (позитивний контроль), приріст показника вегетативної маси становив 4 % та 25 % відповідно. Встановлено відмінності в характері росту на МПА і засвоєнні джерел азоту та вуглецю ризобіями *Melilotus albus* і *Trigonella foenum-graecum*. За результатами досліджень культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей нових ізолятів-мікросимбіонтів буркуну білого та гуньби сінної показано, що вони відповідають властивостям референтного штаму та характеристикам виду *E. meliloti*.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Lohosha O. V., Vorobei Yu. O., Leonova N. O. Symbiotic efficiency and cytokinin activity of new Mesorhizobium ciceri strains. *Microbiological jour-*

nal. 2023. Vol. 85, № 1. P. 3–11. <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.01.003>

2. Stagnari F., Maggio A., Galieni A., Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture.* 2017. Vol. 4, № 2. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>

3. Tomic Z., Lusic Z., Radovic J., Sokolovic D., Nesic Z., Krnjaja V. Perennial legumes and grasses stable source of quality livestock fodder feed. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 2007. Vol. 23, № 5–6. P. 559–572. <https://doi.org/10.2298/bah0701559t>

4. Кургак В. Г., Карбівська У. М. Ефективність застосування мінеральних добрив та азотфіксувальних препаратів на бобово-злакових лучних агрофітоценозах Прикарпаття. *Вісник аграрної науки.* 2020. Т. 98, № 4. С. 35–41. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202004-05>

5. Abd-Alla M. H., Al-Amri S. M., El-Enany A.-W. E. Enhancing Rhizobium–legume symbiosis and reducing nitrogen fertilizer use are potential options for mitigating climate change. *Agriculture.* 2023. Vol. 13, № 11. 2092. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112092>

6. Панасюк С. С., Клименко Т. Є., Міняйло В. Д. Формування багаторічних кормових фітоценозів за участю бобових трав. *Інноваційні технології в рослинництві:* матеріали IV Всеукраїнської наукової інтернет-конференції (м. Кам'янець-Подільський, 10 травня 2021 р.). Кам'янець-Подільський, 2021. С. 108–110.

7. Ярмолюк М. Т., Котяш У. О., Демчишин Н. Б. Екобіологічні й агротехнічні основи створення та використання трав'янистих фітоценозів: монографія. Львів : ПАІС, 2010. 228 с.

8. Imran A., Hakim S., Tariq M., Nawaz M. S., Laraib I., Gulzar U. ... Ahmad M. Diazotrophs for lowering nitrogen pollution crises: looking deep into the roots. *Frontiers in Microbiology.* 2021. Vol. 12, 637815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637815>

9. Zabala J. M., Marinoni L., Giavedoni J. A., Schrauf G. E. Breeding strategies in *Melilotus albus* Desr., a salt-tolerant forage legume. *Euphytica.*

2018. Vol. 214, № 22. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2031-0>
10. Mehrafarin A., Rezazadeh Sh., Naghdi Badi H., Noormohammadi Gh., Zand E., Qaderi A. A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of Medicinal Plants*. 2011. Vol. 10, № 37. P. 6–24.
11. Дідович С. В., Толкачов М. З., Бутвіна О. Ю. Ефективність симбіотичної азотфіксації в агроценозах України. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2008. Вип. 8. С. 117–125.
12. Адамень Ф. Ф., Щигорцова О. Л., Турин Є. М., Дідович С. В. Мікробіологічні препарати в агротехнологіях вирощування бобових культур. *Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області*. 2010. Вип. 7. С. 148–155.
13. Петриченко В. Ф., Гетман Н. Я. Фактори підвищення продуктивності агрофітоценозів багаторічних бобових трав в умовах Лісостепу Правобережного. *Корми і кормовиробництво*. 2017. Вип. 84. С. 3–10.
14. Pukhtaievych P. P., Kukol E. P., Vorobey N. A., Vasileva V., Kots S. Ya. Efficiency of inoculation by nodule bacteria of alfalfa grown in mixture with smooth brome grass at various rates of phosphorus and potassium nutrition. *Физиология растений и генетика*. 2019. Т. 51, № 5. С. 415–424. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.415>
15. Місевич О. В. Влашук А. М. Особливості вирощування буркуна білого однорічного в умовах півдня України. *Зрошуване землеробство*. 2016. Вип. 66. С. 122–124.
16. Влашук А. М., Колпакова О. С., Влашук О. А., Копилов С. О., Галілюк В. В. Розробка елементів технології вирощування буркуну білого однорічного в умовах Південного Степу України. *Зрошуване землеробство*. 2017. Вип. 68. С. 69–73.
17. Овсієнко О. Л. Вплив мікроорганізмів та мінеральних добрив на розвиток рослин буркуну при вирощуванні на лесоподібному суглинку. *Біологічні системи*. 2012. Т. 4. Вип. 3. С. 326–329.
18. Zhang Y., Zhang K., Ji Y., Tao J. Physical dormancy and soil seed bank dynamics in seeds of *Melilotus albus* (*Fabaceae*). *Flora*. 2020. Vol. 266, 151600. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151600>
19. Basu S. K., Zandi P., Cetzal-Ix W. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): distribution, genetic, diversity, and potential to serve as an industrial crop for the global pharmaceutical, nutraceutical, and functional food industries. *The role of functional food security in global health*. 2019. P. 471–497. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813148-0.00028-1>
20. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria / Eds. G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. Springer US, 2005. 1415 p. <https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5>
21. Herrera-Cervera J. A., Sanjuan-Pinilla J. M., Olivares J., Sanjuan J. Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *Journal of Bacteriology*. 1998. Vol. 180, № 17. P. 4583–4590. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4583-4590.1998>
22. Hartmann A., Giraud J. J., Catroux G. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *meliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 1998. Vol. 25, № 2. P. 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00464.x>
23. Методи культивування та тривалого зберігання бульбочкових бактерій у колекціях: методичні рекомендації. Чернігів : ІСМАВ НААН, 2015. 36 с.
24. Каталог культур мікроорганізмів. Чернігів : видавець Брагинець О. В., 2015. 48 с.
25. Гаркавенко Т. О., Неволько О. М., Козицька Т. Г., Ординська Д. О., Меженська Н. А. Методичні вказівки щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Київ : ДНДІЛДВСЕ, 2014. С. 19–24.
26. Сердюк М. Є., Прісс О. П., Гапріндашвілі Н. А., Здоровцева Л. М., Сухаренко О. І., Іванова І. Є. Дослідницький практикум. Частина І. Методи дослідження плодоовочевої та ягідної продукції: підручник для здобувачів ступеня вищої освіти закладів вищої освіти. Мелітополь : Люкс, 2020. 370 с.
27. Kuzmanović N., Fagorzi C., Mengoni A., Lassalle F., di Cenzo G. C. Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2022. Vol. 72, № 3. 005243. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005243>
28. Elboutahiri N., Thami-Alami I., Udupa S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*. 2010. Vol. 10, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-15>

Отримано 18.04.2024

SELECTION OF NEW STRAINS OF NODULE BACTERIA-SYMBIONTS OF *MELILOTUS ALBUS* AND *TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM*

O. V. Lohosha^{1,2}, Yu. O. Vorobei¹, T. O. Usmanova¹

¹Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

²Chernihiv Polytechnic National University

e-mail: olha.lohosha@gmail.com

Objective. Study the properties of effective strains of nodule bacteria-microsymbionts of white melilot (*Melilotus albus*) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). **Methods.** Microbiological, biochemical, vegetative experiment, statistical. **Results.** During 2016–2021, a search for active strains of nodule bacteria of rare types of leguminous plants was carried out. Analytical selection methods have found 11 strains of *Ensifer* sp. — microsymbionts of white melilot and 3 of fenugreek. It was shown that the inoculation of white melilot seeds with bacterial suspensions of new strains of *Ensifer* sp. BR-4 and BR-201 contribute to an increase in the formation of nodules on plant roots by 15 % and 24 % versus the positive control (inoculation with *Ensifer meliloti* ДН-15), as well as an increase in vegetative mass by 25 % and 39 %, respectively. It was also established that during seed inoculation with suspensions of *Ensifer* sp. G-6 and G-10, the number of nodules exceeded this indicator of the positive control by 52 % and 72 %, the increase in vegetative mass was 4 % and 25 %, respectively. The peculiarities of the growth of new effective strains of rhizobia on pea agar medium, meat-peptone and mannitol-yeast agar, litmus milk, the ability to assimilate various sources of carbon and nitrogen and resistance to antibiotics were studied. The differences in the nature of growth on MPA and assimilation of nitrogen and carbon sources for melilot and fenugreek rhizobia were shown. Based on the results of research into the cultural-morphological and physiological-biochemical properties of the new microsymbiont isolates of the white melilot and fenugreek, it was shown that they correspond to the properties of the reference strain and characteristics of *E. meliloti* species. **Conclusion.** Analytical selection methods were used to obtain new strains of microsymbionts of the white melilot and fenugreek. The positive effect of bacterization of the seeds of these cultures with bacterial suspensions of the obtained strains on the symbiotic activity and productivity of plants was established. According to the cultural-morphological and physiological-biochemical properties, the new isolates have been assigned to *E. meliloti*. Differences in the nature of growth on MPA and assimilation of carbon and nitrogen between the rhizobia of *Melilotus albus* and *Trigonella foenum-graecum* were revealed.

Key words: *Ensifer meliloti*, leguminous plants, inoculation, symbiosis, white melilot, fenugreek.

REFERENCES

1. Lohosha, O. V., Vorobei, Yu. O., & Leonova, N. O. (2023). Symbiotic efficiency and cytokinin activity of new Mesorhizobium ciceri strains. *Microbiological Journal*, 85 (1), 3–11. <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.01.003>
2. Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4 (2), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
3. Tomic, Z., Lusic, Z., Radovic, J., Sokolovic, D., Nestic, Z., & Krnjaja, V. (2007). Perennial

legumes and grasses stable source of quality livestock fodder feed. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23 (5–6), 559–572. <https://doi.org/10.2298/bah0701559t>

4. Kurgak, V. H., & Karbivska, Yu. M. (2020). Efektyvnist zastosuvannia mineralnykh dobryv ta azotfiksuvalnykh preparativ na bobovo-zlakovykh luchnykh ahrofitotsenozakh Prykarpattia [The efficiency of application of mineral fertilizers and microbiological preparations on legume-cereal meadow agrophytocenosis]. *Visnyk aharnoї nauky — Bulletin of Agricultural Science*, 98 (4), 35–41 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk2020-04-05>

5. Abd-Alla, M. H., Al-Amri, S. M., & El-Enany, A.-W. E. (2023). Enhancing *Rhizobium*–legume symbiosis and reducing nitrogen fertilizer use are potential options for mitigating climate change. *Agriculture*, 13 (11), 2092. <https://doi.org/10.3390/agriculture13112092>
6. Panasiuk, S. S., Klymenko, T. Ye., & Miniailo, V. D. (2021, May). Formuvannia bahatorichnykh kormovykh fitotsenoziv za uchastiu bobovykh trav [Formation of perennial fodder phytocenoses with the participation of leguminous grasses]. Materials of the IV All-Ukrainian Scientific Internet Conference Innovative technologies in crop production (pp. 108–110), Kamianets-Podilskyi [in Ukrainian].
7. Yarmoliuk, M. T., Kotiash, U. O., & Demchyshyn, N. B. (2010). *Ekobiologichni y ahrotekhnichni osnovy stvorennia ta vykorystannia travianystykh fitotsenoziv* [Ecobiological and agrotechnical bases of creation and use of herbaceous phytocenoses]. Lviv: PAIS [in Ukrainian].
8. Imran, A., Hakim, S., Tariq, M., Nawaz, M. S., Laraib, I., Gulzar, U. ... Ahmad, M. (2021). Diazotrophs for lowering nitrogen pollution crises: looking deep into the roots. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637815>
9. Zabala, J. M., Marinoni, L., Giavedoni, J. A., & Schrauf, G. E. (2018). Breeding strategies in Melilotus albus Desr., a salt-tolerant forage legume. *Euphytica*, 214 (22), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2031-0>
10. Mehrafarin, A., Rezazadeh, Sh., Naghdi Badi, H., Noormohammadi, Gh., Zand, E., & Qaderi, A. (2011). A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *Journal of Medicinal Plants*, 10 (37), 6–24.
11. Didovich, S. V., Tolkachov, N. Z., & Butvina, O. Y. (2008). Efektyvnist symbiotychnoi azotfikatsii v ahrotsenozakh Ukrainy [The efficiency of symbiotic nitrogen fixation in the agrocenosis of Ukraine]. *Silskohospodarska mikrobiologhiia — Agricultural Microbiology*, 8, 117–125 [in Ukrainian].
12. Adamen, F. F., Shchyhortsova, O. L., Turyn, Ye. M., & Didovych, S. V. (2010). Mikrobiologichni preparaty v ahrotekhnolohiiakh vyroshchuvannia bobovykh kultur [Microbiological preparations in agrotechnologies of growing leguminous crops.]. *Visnyk TsNZ APV Kharkivskoi oblasti — Bulletin of the Center for Science Provision of Agribusiness in the Kharkiv region*, 7, 148–155 [in Ukrainian].
13. Petrychenko, V. F., & Hetman, N. Ya. (2017). Faktory pidvyshchennia produktyvnosti ahrofitotsenoziv bahatorichnykh bobovykh trav v umovakh Lisostepu Pravoberezhnoho [Factors for increasing the productivity of agrophytocenoses of perennial leguminous grasses in the conditions of the Pravo-berezhny Forest Steppe]. *Kormy i kormovyrobnytstvo — Feeds and Feed Production*, 84, 3–10 [in Ukrainian].
14. Pukhtaievych, P. P., Kukol, E. P., Vorobey, N. A., Vasileva, V., & Kots, S. Ya. (2019). Efficiency of inoculation by nodule bacteria of alfalfa grown in mixture with smooth bromegrass at various rates of phosphorus and potassium nutrition. *Fiziologia Rastenij i Genetika*, 51 (5), 415–424. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.415>
15. Misievych, O. V., & Vlashchuk, A. M. (2016). Osoblyvosti vyroshchuvannia burkuna biloho odnorichnoho v umovakh pivdnia Ukrainy [Peculiarities of the cultivation of white melilot annual in the conditions of southern Ukraine]. *Zroshuvane zemlerobstvo — Irrigated farming*, 66, 122–124 [in Ukrainian].
16. Vlashuk, A. M., Kolpakova, O. S., Vlashuk, O. A., Kopylov, S. O., & Haliliuk, V. V. (2017). Rozrobka elementiv tekhnolohii vyroshchuvannia burkunu biloho odnorichnoho v umovakh Pivdennoho Stepu Ukrainy [Development of elements of the technology of growing white melilot annual in the conditions of the Southern Steppe of Ukraine.]. *Zroshuvane zemlerobstvo — Irrigated farming*, 68, 69–73 [in Ukrainian].
17. Ovsiienko, O. L. (2012). Vplyv mikroorganizmiv ta mineralnykh dobryv na rozvytok roslyn burkunu pry vyroshchuvanni na lesopodibnomu suhlynku [The influence of microorganisms and mineral fertilizers on the development of burkun plants when grown on loess-like loam]. *Biologichni systemy — Biological systems*, 4 (3), 326–329 [in Ukrainian].
18. Zhang, Y., Zhang, K., Ji, Y., & Tao, J. (2020). Physical dormancy and soil seed bank dynamics in seeds of *Melilotus albus* (Fabaceae). *Flora*, 266, 151600. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151600>
19. Basu, S. K., Zandi, P., & Cetzal-Ix, W. (2019). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): distribution, genetic, diversity, and potential to serve as an industrial crop for the global pharmaceutical, nutraceutical, and functional food industries. *The role of functional food security in global health*, 471–497. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813148-0.00028-1>
20. Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (Eds.). (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: The Proteobacteria. Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Springer US. 1415 p. <https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5>
21. Herrera-Cervera, J. A., Sanjuan-Pinilla, J. M., Olivares, J., & Sanjuan, J. (1998). Cloning and identification of conjugative transfer origins in the *Rhizobium meliloti* genome. *Journal of Bacteriology*,

180 (17), 4583–4590. <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4583-4590.1998>

22. Hartmann, A., Giraud, J. J., & Catroux, G. (1998). Genotypic diversity of Sinorhizobium (formerly Rhizobium) meliloti strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 25 (2), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00464.x>

23. *Metody kultyvuvannia ta tryvaloho zberihannia bulbochkovykh bakterii u kolektsiakh: metodychni rekomendatsii* [Methods of cultivation and long-term storage of nodule bacteria in collections: guidelines] (2015). Chernigiv: IAMAM NAAS [in Ukrainian].

24. *Kataloh kultur mikroorhanizmiv* [Catalog of cultures of microorganisms] (2015). Chernihiv: publ. Brahynets O. V. [in Ukrainian].

25. Harkavenko, T. O., Nevolko, O. M., Kozyska, T. H., Ordynska, D. O., & Mezhenska, N. A. (2014). *Metodychni vkazivky shchodo vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ* [Methodical guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs]. Kyiv: DNDILDVSE [in Ukrainian].

26. Serdiuk, M. Ye., Priss, O. P., Hapriindashvili, N. A., Zdorovtseva, L. M., Sukharenko, O. I., & Ivanova, I. Ye. (2020). *Doslidnytskyi praktykum. Chastyna I. Metody doslidzhennia plodovochevoi ta yahidnoi produktsii: pidruchnyk dlia zdobuvachiv stupenia vyshchoi osvity zakladiv vyshchoi osvity* [Research workshop. Part I. Research methods of fruit and vegetable and berry products: a textbook for higher education degree holders of higher education institutions]. Melitopol: Liuks [in Ukrainian].

27. Kuzmanović, N., Fagorzi, C., Mengoni, A., Lassalle, F., & di Cenzo, G. C. (2022). Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72 (3), 005243. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005243>

28. Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., & Udupa, S. M. (2010). Phenotypic and genetic diversity in Sinorhizobium meliloti and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*, 10, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-15>

Received 18.04.2024