

**ОТБОР КОНКУРЕНТОСПОСОБНЫХ И ЭФФЕКТИВНЫХ МЕСТНЫХ
ШТАММОВ*****RHIZOBIUM GALEGAE*****Л.Е. Картыжова***ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь***Введение**

Важнейшим резервом высокопродуктивных, устойчивых и длительно функционирующих агроэкосистем, повышающих плодородие почв, а также улучшающих общую экологическую ситуацию, снижающих негативное влияние антропогенно-техногенных факторов, восстанавливающих утраченные ресурсы почвенного плодородия, укрепляющих животноводческую базу, увеличивающих выход растительного и животноводческого белка являются агроценозы с нетрадиционными перспективными многолетними растениями, такими как галега восточная (*Galega orientalis* Lam.).

Перспективность галеги восточной – нетрадиционной для Беларуси бобовой культуры обусловлена высокой биологической пластичностью, долговечностью и способностью обеспечить получение высокого урожая зеленой массы и семян. Эффективность ее возделывания в почвенно-климатических условиях республики требует изучения и оптимизации агротехнических и таких важных приемов, как предпосевная инокуляция семян, обеспечивающих формирование эффективного симбиоза с *Rhizobium galegae*.

Создание высокоэффективной микробо - растительной системы между *Galega orientalis* Lam. и *Rhizobium galegae* направлено на повышение продуктивности галеги восточной, возделываемой в почвенно-климатических условиях Беларуси и разработку биопрепаратов на основе местных конкурентоспособных специфичных штаммов клубеньковых бактерий с целью применения их для предпосевной инокуляции семян.

Одним из показателей продуктивности бобовых культур является их азотфиксирующая активность, которая более уже ста лет обеспечивается предпосевной инокуляцией семян разными видами инокуляционного материала на основе клубеньковых бактерий.

Установлено, что несмотря на то, что rhizobium встречаются практически повсюду, однако, для различных географических широт и типов почв имеются преимущества в распространении определенных специфичных групп ризобий. Для почв умеренных широт характерны клубеньковые бактерии клевера, гороха, фасоли (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R.l.bv.viciae*, *R.l. phaseoli*) и люцерны (*R. meliloti*) [1-3]. Анализ на содержание и встречаемость рода *Aerbaspirillum*, способного осуществлять азотфиксацию в ризосфере 17 видов кормовых трав показал, что их численность колебалась от 10^2 до 10^4 клеток на 1 г почвы [4]. Среди наиболее многочисленных зафиксированы *Rh. trifolii*, составляющие $1,7 \cdot 10^5$ клеток на 1 г почвы. К наименее представленным отнесены популяции *Rh. meliloti*, насчитывающие не более 17 клеток на 1 г почвы [5]. *Rh. galegae* в исследуемых почвах не выявлены.

Специфичность *Rhizobium galegae* доказана при использовании методов фаготипирования, анализа липосахаридов, полимеразной цепной реакции, анализа состава плазмид и структуры геномных локусов. Описано два биотипа вида *R. galegae*, выделенных из двух видов растений-хозяев (*Galega orientalis* и *Galega officinalis*), существенно различающихся между собой и способных к образованию эффективного симбиоза только с тем из видов галеги восточной, из клубеньков которого они были выделены [6].

Возделывание галеги восточной в почвенно-климатических условиях Беларуси без предпосевной инокуляции семян и при отсутствии в почвах спонтанной специфичной

ризобияльной микрофлоры приводит к тому, что посевы галеги восточной к 2-3 году жизни изреживаются и поле зарастает сорняками. Инфицирование семян галеги восточной специфичными клубеньковыми бактериями является необходимым приемом агротехники, обеспечивающим получение высоких урожаев на протяжении 7-15 лет.

Установлено, что инокуляция семян галеги восточной приводит к достоверному увеличению урожая зеленой массы на 40-60% и содержания азота в надземной части растения на 30-80% [7].

При использовании болтушки из измельченных корней с клубеньками урожайность зеленой массы галеги восточной, в первый год жизни растений, составила – 171,4ц/га, что выше контроля на 14,6% [8]. Применение бинарного инокулянта (*R. galegae* + *R. meliloti*) совместно с корневой подкормкой молибденом способствует формированию более активных по азотфиксации клубеньков, более высокому урожаю надземной массы с повышенным содержанием в листьях сухого вещества и белка [9].

Эффективным приемом, позволяющим увеличить урожайность козлятника в 2-3 раза, продуктивность симбиотической азотфиксации – в 2-4 раза является применение штамма *R. galegae* 914 и *Artrobacter myzorens* (мизорин) как в чистом виде, так и смеси [10].

Изложенное выше подтверждает настоятельную необходимость выделения из природных источников местных конкурентоспособных и активных штаммов *R. galegae*, способных к эффективному симбиозу с галеей восточной в почвенно-климатических условиях Беларуси.

Основными критериями первоначального отбора штаммов клубеньковых бактерий, как известно, являются качественные проявления способностей ризобий к симбиозу с растением - хозяином, выражающиеся в нодулирующей способности и азотфиксирующей активности [11]. В настоящее время установлено, что определяющими признаками эффективного симбиоза являются количественные признаки как наиболее значимые: конкурентная способность – способность изучаемого штамма ризобий формировать клубеньки на корнях растения – хозяина в присутствии других штаммов клубеньковых бактерий, симбиотическая эффективность – способность создавать эффективный симбиоз и повышать продуктивность бобовых культур [12]. Наличие всех этих признаков у выделенных штаммов клубеньковых бактерий является основанием для отбора с целью разработки биопрепаратов на их основе.

Целью настоящей работы было выделение и отбор местных конкурентоспособных и эффективных штаммов *Rhizobium galegae*.

Методы исследования

Для выделения местных штаммов *Rhizobium galegae* были использованы Растительные объекты: *Galega orientalis* Lam. Сорты: «Гале», «Нестерка».

Микробиологические объекты:

- природная накопительная культура клубеньковых бактерий (в виде суспензии);
- почва (нестерильная)
- клубеньки (стерильные, нестерильные),
- клубеньки +почва (нестерильные).
- Природные изоляты *Rhizobium galegae* №1-11;
- природные изоляты *Rhizobium galegae* 1, 5, 8(резистентные по рифампицину).

Почвенные объекты: дерново-подзолистая почва селекционного питомника БГСХА.

Выделение природных изолятов *Rhizobium galegae* проводили из клубеньков старовозрастных растений *Galega orientalis* Lam.

Отбор наиболее эффективных штаммов клубеньковых бактерий проводили по качественным (нодулирующая способность и азотфиксирующая активность) и количественным(конкурентная способность) признакам [11,13-15].

Получение устойчивых к антибиотикам природных изолятов *Rhizobium galegae* № 1, 5, 8 проводили методом постепенной адаптации к повышенным дозам рифампицина (150 мкг/мл).

Эффективность, выделенных природных изолятов *Rhizobium galegae* определяли резистентным методом по конкурентной способности: санпрофитной (СКС) [13], ризосферной (РКС) [14, 15], нодулирующей (НКС) - подсчетом клубеньков, образовавшихся на корнях растений, инокулированных смесью ризобияльных штаммов в течение 30 дней после инокуляции. Проводили анализ каждого образовавшегося клубенька на устойчивость к антибиотику. Использовали также косвенный метод для определения нодулирующей (НКС) [16,17,18].

Результаты и обсуждение

Выделение природных изолятов *Rh. galegae*.

Для выделения эффективных штаммов клубеньковых бактерий из местных популяций *Rhizobium galegae* bv. *galegae* были отобраны 1-3-х и 15-ти летние растительные образцы галеги восточной (*Galega orientalis* Lam.). На корнях 1-3-х летних растений галеги восточной клубеньки не обнаружены. Растительные образцы старовозрастных 15 - летних растений галеги восточной селекционного питомника имели более развитую вегетативную массу и мощную корневую систему, на которой имелось незначительное количество розовых клубеньков, которые вместе с ризосферной дерново-подзолистой почвой пахотного горизонта селекционного питомника были использованы для выделения специфичных для *Galega orientalis* Lam. местных штаммов *Rhizobium galegae*. Методом аналитической селекции были выделены и отобраны природные изоляты *Rhizobium galegae*.

В условиях светокультуры, в зависимости от вида инокуляционного материала (стерильные и нестерильные клубеньки, клубеньки + почвы), образовывалось разное количество клубеньков. В варианте с инокуляцией семян почвенной суспензией, приготовленной из нестерильных клубеньков и почвы, сформировалось максимальное количество клубеньков, которое составило, в среднем, 12 штук на 1 растение.

Клубеньки, имеющие розовую окраску и большие по размеру, были использованы для выделения природных изолятов *Rhizobium galegae*. В таблице 1 представлены симбиотические свойства 11 природных изолятов *Rhizobium galegae* и их влияние на биометрические показатели растения-хозяина.

Таблица 1 – Качественные признаки *Rhizobium galegae*

Штаммы <i>Rh. galegae</i>	Вирулентность, время появления клубеньков, сутки	Нодулирующая способность, количество клубеньков, шт/1 раст.	Вес фитомассы/ корней, г /1 раст		Высота растений, см	Азотфиксирую- щая активность, мкг N/1 раст. за 30'
			сырой	сухой		
1	10	23	164/82	23/11	8,7	4,6
2	17	7	74/29	16/3	5,2	0,6
3	11	13	63/25	15/4	5,0	-
4	-	-	-	-	-	-
5	10	13	142/51	23/6	8,3	2,2
6	18	5	70/30	16/3	4,8	0,5
7	13	8	76/30	18/5	7,0	0,8
8	10	10	142/46	25/7	8,4	2,5
9	10	5	78/35	16/4	5,2	0,6
10	17	7	84/32	18/3	6,8	0,8
11	15	7	88/28	17/4	7,6	0,9

Отбор наиболее эффективных и неэффективных, но конкурентоспособных природных изолятов *Rhizobium galegae*.

По качественным признакам симбиотической активности (нодулирующая способность, азотфиксирующая активность) из 11 полученных природных изолятов клубеньковых бактерий галеги восточной были отобраны 4 самых эффективных: *Rhizobium galegae* № 1, № 5, № 8. и один конкурентоспособный изолят (по нодулирующей способности) не обладающий азотфиксирующей активностью *Rhizobium galegae* №3.

Установлено, что наибольшую нодулирующую способность (23 шт/1 раст.) и азотфиксирующую активность (4,6 мкг N/1 раст. за 30 мин.) проявил природный изолят №1. За счет инокуляции семян *Rhizobium galegae* №3 и №5 образовывалось одинаковое количество клубеньков, однако у *Rhizobium galegae* №3 вирулентная активность была ниже на 10% по сравнению с *Rhizobium galegae* №1. Количество образовавшихся клубеньков, за счет инокуляции семян *Rhizobium galegae* №3, *Rhizobium galegae* №5 и *Rhizobium galegae* №8 составило 56 и 43% соответственно по сравнению с *Rhizobium galegae* №1. Однако при использовании *Rhizobium galegae* №3 было установлено снижение биометрических показателей растений (см. табл. 1): веса сырой/сухой фитомассы, высоты растений на 62/35% и 43% по сравнению с *Rhizobium galegae* №1, №5, №8 соответственно, что было обусловлено, видимо, отсутствием азотфиксирующей способности у изолята №3. Клубеньки, сформировавшиеся на корнях галеги восточной за счет инфицирования *Rhizobium galegae* №3, не имели розовой окраски, что является дополнительным свидетельством неэффективного симбиоза с растением. Сравнительный анализ качественных признаков симбиотической активности показал, что природный изолят *Rhizobium galegae* №3 является конкурентным среди местной популяции специфичных ризобий, но неспособным к формированию эффективного симбиоза с растением – хозяином. В связи с этим, природный изолят *Rhizobium galegae* №3 был использован в качестве тестора для количественного сравнительного анализа конкурентоспособности и эффективности отобранных природных изолятов №1, 5, 8, обладающих азотфиксирующей способностью.

Резистентный метод, основанный на совместной инокуляции семян природными изолятами № 1, 5, 8 и изолятом–тестором позволил провести количественный сравнительный анализ и определить степень конкурентоспособности каждого изучаемого природного изолята.

Таблица 2. - Количественные признаки *Rhizobium galegae* (резистентный метод), в %

Номер изолята	СКС		РКС		НКС	
	контроль	опыт: 4 суток	контроль	опыт: 96 часов	контроль	Опыт: 30 суток
1	45	57	47	73	53	57
5	52	62	54	82	58	73
8	42	48	40	70	50	60

Контроль - исходная доля природного изолята при совместном культивировании с изолятом - тестором;

опыт- доля природного изолята при совместном культивировании с изолятом - тестором через определенный период времени.

Лабораторные испытания по количественной оценке симбиотической активности природных изолятов № 1, 5, 8 показали, что ризобияльный изолят №5 (см. табл. 3) имел самые высокие показатели СКС, РКС, НКС среди исследуемых природных изолятов *Rhizobium galegae*, что и обеспечивает ему большую приспособленность при интродукции в экосистему с различными почвенно-экологическими условиями. На основании тестирования конкурентной способности отобранных природных изолятов клубеньковых бактерий установлено, что изолят №5 способен усваивать С, N, P и обладает устойчивостью к экстремальным условиям среды (t^0 , pH, влажности, наличию пестицидов

в почве). Высокая ризосферная и нодуляционная способность природного изолята *Rhizobium galegae* 5 обусловлена его высокой подвижностью, адсорбцией на корнях, скоростью размножения в ризосфере, что и увеличивает степень колонизации и инфицирования корней растения-хозяина. Обладая максимальной совместимостью с видом *Galegae orientalis* Lam. природный изолят формирует активные клубеньки на поверхности его корней и полноценный симбиоз с растением-хозяином.

Природный изолят №1, обладает высокой ризосферной конкурентной способностью (73%), что обеспечивает ему хорошую подвижность и размножение в почве, адсорбцию на корнях растения – хозяина, а также колонизацию его корней. Установлено, что нодулирующая конкурентоспособность природного изолята *Rhizobium galegae* 1 составляет 57%, что меньше, чем у *Rhizobium galegae* 5 и *Rhizobium galegae* 8. В связи с этим очевидным является то, что скорость проникновения в корень и совместимость с растением-хозяином также меньше. Однако необходимо отметить, что степень выживания при интродукции в экосистему у природного изолята *Rhizobium galegae* 1 на 9% выше, чем у природного изолята № 8, однако на 5% ниже, чем у природного изолята №5.

Наличие высокой ризосферной конкурентной способности у изолята №8, составляющей 70%, обеспечивает ему высокую подвижность в почве, скорость размножения в ризосфере бобового растения. Генетически-контролируемая способность растения-хозяина активно отбирать определенные штаммы клубеньковых бактерий из ризосферной популяции или из смешанного инокулюма, как указывала Онищук, 1995г., возможно в комплексе с ризосферной конкурентной способностью изолята *Rhizobium galegae* 8 и обеспечивает ему высокую нодулирующую способность. Вследствие чего происходит адсорбция большого количества клеток природного изолята *Rhizobium galegae* 8 на поверхности корня растения – хозяина и увеличивается скорость их проникновения в корень, что и обеспечивает лучшую совместимость с *Galega orientalis* Lam. Поэтому и скорее всего, высокая НКС изолята 8 и специфичность генотипа растения-хозяина определяют в данном случае создание эффективного симбиоза между ними.

Применение косвенного метода определения нодулирующей конкурентной способности, основанного на том, что большее количество клубеньков образуется за счет инокуляции эффективным штаммом при совместном культивировании со штаммом-тестором, позволило убедиться и подтвердить степень, ранее определенной, резистентным методом, конкурентной способности каждого из природных изолятов № 1, 5, 8.

Количественная оценка НКС исследуемых природных изолятов, представленная коэффициентом K , показала, что исследуемые изоляты *Rhizobium galegae* № 1 ($K^+=108\%$), 5 ($K^+=155\%$), 8 ($K^+=100\%$) обладают высокой конкурентной способностью по сравнению с изолятом – тестором. Установлено, что большая часть клубеньков образовывалась за счет *Rhizobium galegae* №1, 5, 8, при смешивании их с *Rhizobium galegae* №3 в соотношении 1:10 соответственно.

Применение косвенного метода оценки конкурентной способности выделенных природных изолятов *Rhizobium galegae* позволило подтвердить ранее полученные резистентным методом данные о конкурентной их способности. Природный изолят №5 является наиболее конкурентоспособным, так как обладает максимальным коэффициентом K , равным 155%.

Изучение количественных признаков, выделенных природных изолятов № 1, 5, 8 с использованием резистентного и косвенного методов позволило подтвердить высокую конкурентную способность и эффективность изолятов *Rhizobium galegae*.

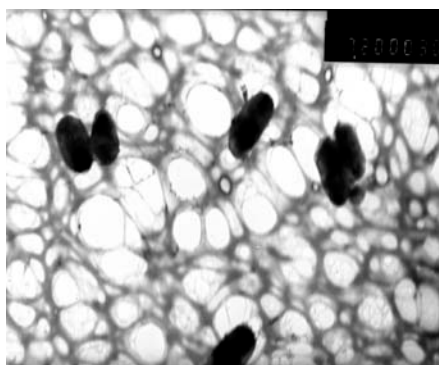
У отобранных, конкурентоспособных природных изолятов *Rhizobium galegae* изучены морфология колоний (рис. 1) и клеток (рис. 2), с помощью таксономических ключей определителя Берджи исследованы их физиолого-биохимические свойства.

Проведена проверка на способность природных изолятов *Rhizobium galegae* №1, 5, 8 инфицировать другие бобовые культуры: *Pisum sativum* (горох), *Trifolium repens* (клевер),

Phaseolus vulgaris (фасоль), *Medicago sativa* (люцерна), *Vicia sativa* (вика), *Glycine max* (соя), *Galega orientalis* (галега восточная), *Galega officinalis* (галега лекарственная). Установлено формирование клубеньков только на корнях *Galega orientalis* (галега восточная).

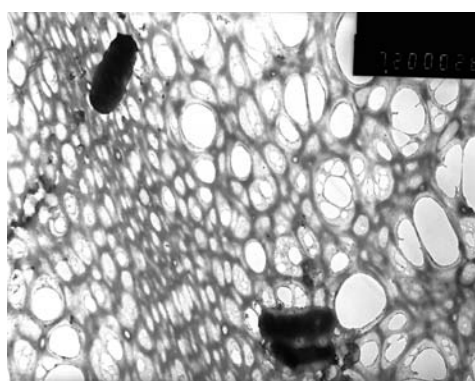
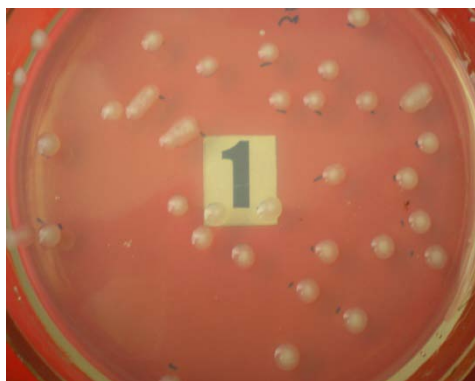
Природные изоляты *Rhizobium galegae* № 1, 5, 8 идентифицированы как штаммы *Rhizobium galegae*, способные образовывать клубеньки на корнях растения-хозяина. Проведена токсико-гигиеническая проверка штаммов *Rhizobium galegae*. Местные штаммы *Rhizobium galegae* 1, 5, 8 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (научная коллекция типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси») и им присвоены регистрационные номера соответственно: *Rhizobium galegae* БИМ В-436Д, *Rhizobium galegae* БИМ В-437Д, *Rhizobium galegae* БИМ В-438Д.

***Rhizobium galegae* 5**



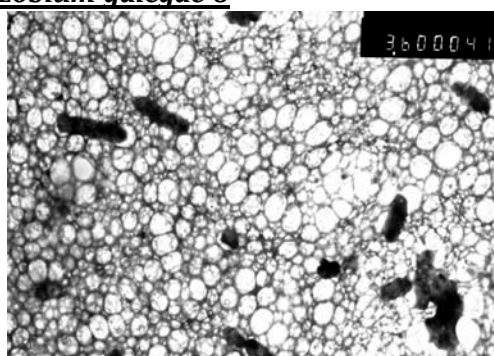
увеличение в 26640 раз,
размеры клеток 71.5x26мкм

***Rhizobium galegae* 1**



увеличение в 26640 раз,
размеры клеток 6.5x 2.99мкм

***Rhizobium galegae* 8**



увеличение в 13599 раз,
размеры клеток 9.6x2мкм

Рисунок 1 – Колонии *Rhizobium galegae* Рисунок – 2 Клетки *Rhizobium galegae*

Основываясь на полученных в лабораторных условиях количественных и качественных показателях симбиотической активности местных штаммов клубеньковых бактерий *Rhizobium galegae* и оценочной характеристике конкурентоспособности штаммов клубеньковых бактерий[2], установлено, что

- штамм *Rhizobium galegae* №1(БИМ В-436Д) обладает более высокой сапрофитной и ризосферной, чем нодулирующей конкурентоспособностью, что обусловлено быстрым размножением и колонизацией корней растения-хозяина(*Galega orientalis* Lam.), что обеспечивает ему приспособленность к различным почвенно-экологическим условиям и высокую выживаемость в агроценозе;
- штамм *Rhizobium galegae* №5(БИМ В-437Д) проявляет высокую сапрофитную, ризосферную, нодулирующую конкурентоспособности, что позволяет ему быть устойчивым к экстремальным условиям среды. Штамм обладает высокой степенью выживаемости в экосистеме, быстро размножается, колонизируя корни *Galega orientalis* Lam., обладает высокой совместимостью с растением-хозяином и скоростью проникновения в корень, способен к образованию эффективных клубеньков на поверхности корня;
- штамм *Rhizobium galegae* №8(БИМ В-438Д) в большей степени обладает нодулирующей конкурентной способностью, что способствует при высокой подвижности штамма в почве и адсорбции на корнях обеспечить высокую скорость проникновения в корень и вирулентную активность. Высокая совместимость с растением – хозяином и отсутствие сортовой специфичности позволяет сформировать эффективный симбиоз с разными сортами галеги восточной, а также способствует быстрому размножению в ризосфере и выживаемости в разных почвенно-климатических условиях.

Таким образом, с помощью качественной оценки способностей ризобий к симбиозу с растением - хозяином, из выделенных местных природных изолятов *Rhizobium galegae* отобраны наиболее эффективные и конкурентоспособные. Количественный анализ показал, что каждому из отобранных изолятов свойственна высокая сапрофитная, ризосферная, нодулирующая конкурентная способность. Отобранные и изученные на способность к эффективному симбиозу с растением – хозяином изоляты клубеньковых бактерий галеги восточной идентифицированы как штаммы *Rhizobium galegae*. Изучение их конкурентоспособности имеет важное значение при интродукции в почву.

Список литературы

1. Федоров, М.В. Биологическая фиксация азота атмосферы / М.В. Федоров. - М.: Сельхозгиз, 1948. - 442с.
2. England, K.S. Bacterial survival in soil: effect of clays and Protozoa / K.S. England, H. Lee, J.T. Trevors // Soil Biol. Biochem. - 1993. - Vol. 25. - P. 525 - 531.
3. Triplett, E.W. Crop rotation effects on populations of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium meliloti* / E.W. Triplett, K.A. Albrecht, E.S. Oplinger // Ibid. - 1993. Vol.25. - P. 781 - 784.
4. Indira, B.N. Herbaspirillum associated with forage grasses/ B.N. Indira, D.J. Bagyaraj // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B. – 1996. -Vol. 63. - № 1. – P. 25-30.
5. Martyniuk, S. Effect of agricultural practices on populations of *Rhizobium* in some field experiments/ A. Wozniakowska, M. Martyniuk // Pap of the International Conference «Diversity of microbial species and Regulation of their Activity», Vilnius, Sept. 30 Oct, 1999: / Bot. Lithuan.-1999. – Suppl. 3.- P. 99-102.
6. Radera, G. Description of biovars in the *R. galegae* species: biovar *orientalis* and biovar *officinalis* / G. Radera, G. Gurgens, M. Niemi, L. Suomiren, K. Lindstrom // Syst. And Appl. Microbiol. - 2001. – Vol. 24, № 2. - P.192 - 205.
7. Ванькова, А.А. Эффективность инокуляции козлятника восточного штаммами клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* /А.А.Ванькова, Ю.А. Ледовская//

Сельскохозяйственная микробиология в XIX–XXI веках: тезисы докл. Всер. конф., С.–Петербург, 2001г.: /С.–Петербург, 2001.– С.45–46.

8. Довнар, И.А. Реакция козлятника восточного на приемы агротехники в первый год жизни/ И.А. Довнар // Резервы повышения продуктивности кормовых угодий в республике Беларусь: материалы респ. науч.– практ. конф., Горки, 2000г. /Горки, 2000.– С.84–87.

9. Заболотная, В.П. Инокуляция козлятника восточного как прием повышения надземной массы и накопления в ней белка / В.П. Заболотная [et. al] // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2001.– Vol. 33.– №4. – С.313–318.

10. Попов, А.А. Бактериальные препараты – эффективное средство повышения азотфиксирующей активности и продуктивности козлятника восточного/ А.А. Попов [и др.] // Материалы 9 Межд. симп. по кормовым растениям, Сыктывкар, 1999г.–С.152–154.

11. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации: утв. Всесоюз. науч.-исслед. ин-т с.-х. микробиол.- Ленинград, 1982. -10с.

12. Онищук, О.П. В Гены, контролирующие нодуляционную конкурентоспособность клубеньковых бактерий и ее использование в селекции/ Онищук, О.П. [и др.] // Генетика.- 1995. - Т. 31. - №3. - С.293-303.

13. Федоров, С.Н. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у *Rhizobium meliloti* под действием УФ-лучей / С.Н. Федоров, Б.В. Симаров //С.-х. биология.- 1987. - №9. - С.44-49.

14. Araujo, R.S. Hydrophobic mutant of *Rhizobium altered* in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere/ R.S. Araujo, E.A. Robleto, J.A. Handelsman // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. -Vol. 60. - P.1430-1436.

15. Robleto, E. A. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective/ E. A. Robleto, J. Borneman, E. W. Triplett // Appl. Environ. Microbiol.-1998. - Vol. 64.- P. 5020-5022.

16. Федоров, С. Н. Оценка симбиотических свойств клубеньковых бактерий люцерны(*Rhizobium meliloti*) в лабораторных условиях / С. Н. Федоров, И.Г. Фокина, Б.В. Симаров // С. –х. биология. - 1986. - №1. - С. 112-118.

17. Шарыпова Л.А. Способ сравнения конкурентоспособности эффективных штаммов *Rhizobium meliloti*/ Л.А. Шарыпова, Б.В. Симаров //Труды ВНИИСХМ. - 1985. -№ 55. - С. 85-90.

18. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов/ П.Ф. Рокицкий. – Минск: БГУ, 1973. – 221 с.