



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53187 (13) A

(51) 7 C12N1/20, C05F11/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ АЗОТОФІКСУЮЧИХ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ

1

2

(21) 2002042551

(22) 01 04 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Патица Володимир Пилипович, Шерстобова
Олена Володимирівна, Толкачов Микола Захаро-
вич, Гртчина Людмила Юріївна, Каменева Ірина
Олексівна(73) ПІВДЕННИЙ ФІЛІАЛ ІНСТИТУТУ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ УК-
РАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) 1 Спосіб виготовлення препарату на основі

азотофіксуючих бульбочкових бактерій, що вклю-
чає вирощування азотофіксуючих бактерій,
підготовку наповнювача, яка включає його вису-
шування, розмелювання, зволоження, фасуван-
ня, стерилізацію, перевірку на наявність сторон-
ньої мікрофлори, та введення у наповнювач азо-
тофіксуючих бактерій і поживних речовин, який
відрізняється тим, що як наповнювач використо-
вують вермикулітний субстрат2 Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у
наповнювач додають відхід цукрового виробниц-
тва дефекастВинахід стосується способів виготовлення ор-
ганічних добрив з добавкою культури бактерійЗа найближчий аналог обрано спосіб виготов-
лення препарату ризоторфін на основі азотфіксу-
ючих бульбочкових бактерій (Методические реко-
мендации «Методы культивирования азотфикси-
рующих бактерий, способы получения и приме-
нения препаратов на их основе» Академия сельско-
хозяйственных наук, Ленинград, 1991, 60с.,
стр. 31)Ризоторфін призначений для передпосівної
обробки насіння бобових культур з метою підви-
щення їх врожайності і вмісту білка. Для ризоторфін-
у основана на використанні здатності бульбочко-
вих бактерій фіксувати атмосферний азот у симбі-
озі з бобовими рослинами. В залежності від куль-
тур бактерій випускають два види препаратів ри-
зоторфін, виготовлений із швидкоростучих буль-
бочкових бактерій (ШББ) роду *Rhizobium*, і ризото-
рфін, виготовлений із повільно зростаючих буль-
бочкових бактерій (ПББ) роду *Bradyrhizobium*. Клі-
тини бульбочкових бактерій вказаних родів явля-
ють собою палички шириною 0,5-1,0 мікронів і до-
вижиною 1,0-7,0 мікронів, які часто є зігнутими. Фо-
рма клітин бульбочкових бактерій змінюється при
проходженні фази розвитку, а також під впливом
складу середовища. Вони проявляють високу спе-
цифічність до рослини-хазяїна. Повільно зростаю-
чі бульбочкові бактерії (ПББ) - сої, люпину, вигни,
еспарцету, маша, арахісу та швидкоростучі буль-бочкові бактерії (ШББ) - люцерни, конюшини, нуту,
чини, донника, сочевиці, які розрізняють у залеж-
ності від швидкості зростання на агаризованому
середовищі. На бобовому агарі ШББ через три-
чотири доби формують прозорі, округлі колонії
в'язкої консистенції розміром 3,0-5,0мм і більше.
ПББ на десяту - п'ятнадцяту добу формують коло-
нії діаметром не більше 1,0-2,0мм, білого кольору,
випуклі, круглі, пастоподібні.Спосіб виготовлення ризоторфину включає
отримання робочих культур, які вирощують у єм-
ностях (коллах, бутлях, ферментерах) з коефіцієн-
том заповнення поживного середовища 0,6% на
квцалці при температурі 28-30°C протягом 36-
48годин. Отриману ферментаційну рідину вико-
ристовують для інокуляції стерильного торфу. За
наповнювач у ризоторфін використовують торф
з рН4,5-5,0. Його висушують до повітряно-сухого
стану (20-25% вологості), розмелюють на млинах з
одночасним просіюванням до розміру часток не
більше 0,1мм. Розмолотий торф завантажують у
змшувач і додавають приблизно 5% СаСО₃ або
допоміжне борошно для отримання рН6,8-7,0 та
воду для отримання вологості 35-40%. Після цього
торф розфасовують у поліетиленові пакети і сте-
рилізуєть, наприклад, гамма-промінням, джере-
лом яких є Со⁶⁰, дозою 2,5-5,0Мрад. При необхід-
ності здійснюють перевірку наповнювача на наяв-
ність сторонньої мікрофлори. Далі стерильний

(13) A

(11) 53187

(19) UA

торф інюкують ін'єкцією охолодженої до 3-8°C суміші ферментаційної рідини і розчину поживних добавок (меляси, кукурудзяного екстракту і глюкози)

Ознаками найближчого аналога, які збігаються з суттєвими ознаками винаходу є наявність у способі виготовлення препарату на основі азотфіксуючих бульбочкових бактерій вирощування азотфіксуючих бактерій, підготовку наповнювача, яка включає його висушування, розмелювання, зволоження, фасування, стерилізацію, перевірку на наявність сторонньої мікрофлори, та введення у наповнювач азотфіксуючих бактерій і поживних речовин

Технічним результатом винаходу є зниження енергоємності та трудовитрат технологічного процесу, підвищення якості препарату

Причинами, які перешкоджають досягненню технічного результату при використанні найближчого аналога, є використання торфу за субстрат-наповнювач, що потребує значної енергоємності при отриманні гама-торфіна, нестабільність фізико-хімічних властивостей, висока заплідненість різними мікроорганізмами, необхідність використання торф'яників визначених видів, вказаних в технічних умовах, а також відсутність виробництва гама стерильних субстратів для виготовлення біопрепаратів в Україні

В основу винаходу поставлено технічну задачу створення способу виготовлення препарату на основі азотфіксуючих бульбочкових бактерій, нового бактеріального препарату - органічного добрива з використанням альтернативного наповнювача-субстрату

Поставлена технічна задача вирішена у Південному філіалі Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, де розроблено спосіб виробництва препарату ризобіофіт з використанням наповнювача - вермикулітного субстрату У способі виготовлення препарату на основі азотфіксуючих бульбочкових бактерій, що містить вирощування азотфіксуючих бактерій, підготовку наповнювача, яка включає його висушування, розмелювання, зволоження, фасування, стерилізацію, перевірку на наявність сторонньої мікрофлори, та введення у наповнювач азотфіксуючих бактерій і поживних речовин, згідно винаходу, за наповнювач використовують вермикулітний субстрат Згідно винаходу, у наповнювач додають відхід цукрового виробництва дефекаст

Для приготування наповнювача використовують пиліподібну фракцію (для додання йому гіроскопічності) вермикуліту - мінералу класу алюмосилікатів У сільському господарстві вермикуліт використовується для поліпшення структури ґрунту і як сорбент токсичних речовин Вибір цього наповнювача обумовлений рядом його позитивних властивостей Найбільш важливими перевагами вермикуліту перед торфом є сталість фізико-хімічних властивостей і значно менша заплідненість мікроорганізмами При високотемпературній термічній обробці (до 800°C він, на відміну від торфу, не утворює токсичних для мікроорганізмів речовин Стерилізацію можна проводити в промислових автоклавах і сухо повітряних стерилізаторах, які можна установити на заводах і в регіона-

льних лабораторіях За сорбційною здатністю вермикуліт не уступає торфу, що створює можливість іммобілізації великої кількості мікроорганізмів на його поверхні Вермикуліт має нейтральну або слабо лужну реакцію, торф - кислу (1,0-6,0) Торфи з нейтральним рН містять багато спор грибів і бактерій і не придатні для виробництва субстрату Вермикуліт має більш високу адгезійну здатність, що виключає застосування клейких речовин, необхідних для втримання торфу на поверхні насіння Використання вермикуліту дозволяє одержати високоякісний препарат зі значно нижчими у порівнянні з найближчим аналогом енергоємністю та трудовитратами на його виробництво

Спосіб здійснюють таким чином Для приготування субстрату використовується сухий вермикуліт, що має сіро-жовтий колір і слюдяний блиск Вермикуліт розмелюють до пилоподібної фракції на кулачковому лабораторному чи промисловому млину і промивають двічі водопровідною водою Промитий вермикуліт розкладають на поліетиленовій плівці і просушують до повітряно-сухого стану або сушать у сушильних шафах і печах Сухий вермикуліт зберігають у паперових мішках Далі сухий вермикуліт звожують до 40% внесенням 400мл водопровідної води на 1кг вермикуліту Вносять 3% дефекасту (30м на 1кг вермикуліту) і фасують у поліпропіленові пакети, наприклад, розміром 20х30см вагою 130г Дефекаст - це відхід цукрового виробництва, основним компонентом якого є солі кальцію У дефекасті міститься невеликий запас поживних речовин - вуглеводів, вітамінів, органічних солей, мікроелементів і інших мінеральних речовин, що можуть слугувати додатковим джерелом харчування бактерій Стерилізують вермикуліт тричі з добовим інтервалом в автоклаві в режимі 1,5 атмосфер протягом 1,5 годин Якість стерилізації перевіряють посівом на стандартне живильне середовище МПА (м'ясо-пептоновий агар) з 0,5% глюкози і сахарози (10г субстрату розмішують у 100мл стерильної води, 1мл суспензії висівають у чашку Петрі і заливають середовищем МПА) У кожен пакет зі стерильним вермикулітом стерильно додають за допомогою дозатора поживні речовини - 3 г меляси і 1г кукурудзяного екстракту (для соєвих ризобій необхідна добавка 1г глюкози) Готовий субстрат має колір від темно-сірого до бурого, вологість 40%, вагу в одному пакеті 160г Вирощування азотфіксуючих бактерій здійснюють за відомими технологіями Інокують вермикулітний субстрат-наповнювач через дозатор, уводячи інокуляційною голкою 40мл культури бактерій, згідно регламенту виробництва відповідного препарату Механічно перемішують для однорідного розподілу бактеріальних клітин у препараті

Зберігають препарат при температурі 8-12°C протягом 6 місяців Якість препарату визначають титр бактерій методом граничних розведень з наступним висівом на відповідне потреба мікроорганізму що культивують, агаризоване середовище, чистоту - висівом на МПА з вуглеводами

Титр шестимісячного збереження біопрепаратів для бульбочкових бактерій - 5,0-6,0млрд кл/г, для асоціативних бактерій - 8,0-12,0млрд, кл/г згідно Таблиці

Таблиця

Штам бактерій	Під яку сільськогосподарську культуру застосовується	Титр клітин, млрд , у 1г
<i>Enterobacter aerogenes</i> 30ф	ячмінь	6,0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 10	овочеві	3,8
<i>Flavobacterium</i> sp L 30	злакові трави	20,0
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 204	пшениця	16,9
Нові штами (неідентифіковані)		
8301	пшениця	6,5
8306	пшениця	24,3
П	пшениця	4,0
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 6346	соя	2,8
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-8	соя	6,8
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Д-2	соя	2,5
<i>Rhizobium leguminosarum</i> П-2	горох	13,0

При обробці насіння 200г препарату розмішують у 1л води і наносять на одну його гектарну норму. Обробку проводять у день посіву або безпосередньо перед посівом. Вермикулітний препа-

рат на основі азотфісуючих бульбочкових бактерій поліпшує мінеральне харчування сільськогосподарських культур і підвищує їх продуктивність.