



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62820 (13) A

(51) 7 C05F11/08, C12N1/20

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

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ AZOTOBACTER CHROOCOCCUM T79 ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД СОЮ

1

2

(21) 2003065695

(22) 19 06 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Коць Сергій Ярославович, Титова Людмила
В'ячеславівна, Кириченко Олена Василівна, Оме-

льчук Світлана Василівна, Жемойда Алла Воло-

(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) Штам бактерій *Azotobacter chroococcum* T79
№197 (колекція ІФРГ НАН України) для одержання
бактеріального добрива під сою

Винахід відноситься до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до мікробіологічних засобів підвищення урожайності бобових культур і стосується нового штаму бактерій *Azotobacter chroococcum* T79 для виготовлення бактеріальних добрив під сою.

Сою є цінною зернобобовою культурою завдяки спектру і якості природного комплексу білків, жирів, вуглеводів, мінеральних солей, вітамінів та інших цінних поживних речовин. Розробка способів і пошук чинників, які б сприяли підвищенню ефективності соєво-ризобіального симбіозу і зростанню урожаю зерна сої сприяють вирішенню проблеми дефіциту цінної білкової сировини для харчової промисловості та кормовиробництва.

Обов'язковим заходом у біотехнології вирощування сої є передпосівна інокуляція її насіння специфічними високоактивними та ефективними штамами бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* (Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання добрив під сою UA №3324, 1994).

Задача нашого винаходу полягає у підвищенні продуктивності симбіотичної системи, яку утворює соя зі специфічними їй бульбочковими бактеріями *Bradyrhizobium japonicum* 634Б.

Задача вирішується завдяки одержанню нового штаму вільноіснуючих азотфіксуючих бактерій *Azotobacter chroococcum* T79, який при інокуляції насіння сої сумісно зі специфічними бульбочковими бактеріями дозволяє би підсилити процес формування симбіозу, підвищити вегетативну та зернову продуктивність цієї культури.

Штам T79 був виділений з чорноземного ґрунту Полтавської області та ідентифікований за ви-

значником бактерій Бергі, 1980, М. «Мир», с. 495.

Штам *A. chroococcum* T79 зберігається в колекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (м. Київ) під № 197.

Морфологія - культуральні властивості

Штам характеризується наступними культурально-морфологічними ознаками: культура бактерій не спороносна, аеробна, грамнегативна, рухома (перитрих). Клітини мають вигляд товстих крупних паличок із закругленими кінцями, часто з'єднані попарно. Мають довжину від 4,4 до 7,6 і ширину від 1,2-2,9 мкм. Зрілі клітини мають форму ковчегів, диморфізм. На твердому безазотистому середовищі Ешбі (дистильована вода - 1 л, маніт - 20 г, K_2HPO_4 - 0,2 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 г, NaCl - 0,2 г, K_2SO_4 - 0,1 г, $CaCO_3$ - 5,0 г, агар - 15,0 г, pH 7,2) утворює блискучі слизисті, випуклі, гладкі колонії, коричневого кольору. Культура є швидкозростаючою.

Фізіологіко-біохімічні властивості

Відношення до кисню - аероб

Температурний діапазон росту нового штаму 20 - 30°C. Оптимальною температурою росту є 28°C. Діапазон pH 6,8 - 7,4. Оптимальна pH - 7,2.

В якості джерела вуглецю штам T79 може використовувати глюкозу, сахарозу, маніт, мальтозу, сорбіт, меласу.

Новий штам *A. chroococcum* T79 характеризується високою азотфіксуючою активністю в чистій культурі (43,7 нМ C_2H_4 / млрд клітин за 2 години), а також сприяє підвищенню азотфіксуючої активності симбіотичного апарату у рослин сої більше, ніж у 1,5 рази (табл. 1).

(19) UA (11) 62820 (13) A

Таблиця 1

Вплив нового штаму *A. chroococcum* T79 на азотфіксуючу активність симбіотичного апарату у рослин сої сорту Мар'яна

Варіант інокуляції	Азотфіксувальна активність	
	мкМоль C ₂ H ₄ /рослину годину	%
В. japonicum 6346	15,3 ± 1,5	100
В. japonicum 6346 + <i>A. chroococcum</i> T79	24,2 ± 3,2	158

Поряд із засвоєнням азоту атмосфери штам T79 може використовувати амонійний та нітратний азот. Відновлює нітрати до нітриту.

Інші характерні фізіологічні особливості:

Желатину не розріджує

Слабо пептонізує молоко

Стимуляторів росту даний штам не потребує. Активно продукує речовини росту.

Ознаки штаму є стійкі. Штам не патогенний. Пересівається один раз на 6 місяців і зберігається на твердому середовищі Ешбі при 5 - 7°C.

Ефективність штаму *A. chroococcum* T79 перевірена у вегетаційних та польовому досліді.

Приклад 1. Для отримання бактеріального добрива штам *A. chroococcum* T79 вирощували на рідкому поживному середовищі Ешбі в колбах на круглих качалках при 160 - 240 об/хв і температурі 28°C протягом 60-72 годин. Титр азотобактера при цьому досягав 100-200 млн клітин в 1 мл. Отриману суспензію азотобактера (10⁸ кл/мл) змішували з суспензією ризобій (10⁹ кл/мл) у співвідношенні 1:1, після чого даною сумішшю інокулювали 2-добові проростки сої або насіння. Приготовлена суміш бульбачкових бактерій сої з новим штамом азотобактера T79 представляє собою комплексний біопрепарат мікробної природи. Інокуляцію насіння проводили в день посіву при бактеріальному навантаженні не менше як 10⁵ клітин на одну насінину.

У досліді було два контролю: абсолютний контроль (без інокуляції штамом, обробка водою) та варіант, у якому проростки інокулювали лише штамом 6346 (традиційна моноінокуляція).

Результати вегетаційного досліді з піщаною ґрунтовою культурою представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив нового штаму *Azotobacter chroococcum* T79 на ефективність симбіозу у рослин сої сорту Мар'яна зі специфічними бульбачковими бактеріями *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (піщана культура)

Параметри уро- жай	Контроль (обробка водою)	В. japonicum 6346	В. japonicum 6346+ <i>A. chroococcum</i> T79
Кількість бобів на рослині	шт	4,6±0,2	6,7±0,3
	%	100	146/100
Кількість зерен на рослині	шт	9,7±0,5	10,4±0,2
	%	100	107/100

Маса 1000 зерен	г	144,8±10,2	179,8±4,8	180,0±10,0
	%	100	124/100	124/100
Маса зерен на рослині	г	1,7±0,4	1,9±0,1	2,4±0,1*
	%	100	112/100	141/131

Примітка: 1)* - достовірно відмінні показники відносно варіанту з моноінокуляцією; 2) у чисельнику - % відносно контролю (обробка водою), в знаменнику — % відносно варіанту з моноінокуляцією штамом 6346.

При інокуляції новим препаратом урожай зерна сої достовірно збільшувався на 31% порівняно з варіантом моноінокуляції. Причому, зростання урожаю відбувалось за рахунок збільшення кількості бобів на рослині і, відповідно, кількості зерен (на 13% і 30%).

Слід підкреслити, що у варіанті з новим штамом рослини сої формували також більше зеленої маси. Вага сухої фітомаси рослин у цьому варіанті достовірно перевищувала варіант з моноінокуляцією на 8%, а варіант абсолютного контролю (без інокуляції) - на 43%.

Приклад 2. Ефективність дії нового препарату на продуктивність сої було випробувано у вегетаційному досліді з ґрунтовою культурою на темно-сірому лісовому ґрунті (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив штаму *Azotobacter chroococcum* T79 на ефективність симбіозу рослин сої сорту Мар'яна з *Bradyrhizobium japonicum* 6346 (ґрунтова культура)

Параметри урожаю	Конт- роль(оброб- ка водою)	В. japonicum 6346	В. japonicum 6346+ <i>A. chroococcum</i> T79
Кіль- кість бобів на рос- лині	шт	6,2±0,5	10,6±0,5
	%	100	171/100
Кіль- кість зерен на рос- лині	шт	12,5±0,8	21,3±0,8
	%	100	170/100
Маса 1000 зерен	г	161,2	161,4
	%	100	102/102
Маса зерен на рос- лині	г	2,0±0,1	3,9±0,1
	%	100	195/100

Примітка: * - достовірно відмінні показники відносно варіанту з моноінокуляцією.

Результати досліджень показали, що передпосівна обробка дводобових проростків сої сорту Мар'яна комплексним препаратом призвела до зростання урожаю зерна. Так, маса зерен на рослині у варіанті з новим штамом T79 була достовірно на 13% більшою, ніж у варіанті з традиційною інокуляцією. Урожайність сої зростала за рахунок збільшення кількості зерен на рослині (на 25%).

Приклад 3. В умовах польового досліді (науково-виробничий відділ Інституту фізіології рослин

і генетики НАН України, смт Глеваха) було досліджено дію нового штаму *Azotobacter chroococcum* T79 на ефективність симбіозу рослин сої сорту Мар'яна з бульбочковими бактеріями

Результати показали (табл. 4), що передпосівна обробка насіння сої новим препаратом призвела до збільшення урожаю зерна. Польова врожайність (при ручному збиранні рослин) у варіанті з новим штамом становила 32,5 ц/га, що на 17%

більше відносно варіанту з традиційною моноінкуляцією ризобіями. Прибавка урожаю становила 4,6 ц/га.

Таким чином, новий штам *Azotobacter chroococcum* T79 сприяв посиленню процесу азотфіксації у кореневій зоні, значно підвищував ефективність симбіотичного апарату у рослин сої та урожай зерна. Надбавка урожаю в умовах вегетаційних та польового дослідів становила 13 - 31%.

Таблиця 4

Вплив нового штаму *Azotobacter chroococcum* T79 на урожай сої сорту Мар'яна (польовий досвід)

Варіант	Урожай, ц/га						Прибавка урожаю	
	I	II	III	IV	Середн	%	ц/га	%
В. japonicum 6346	28,5	27,9	27,8	27,3	27,9±0,2	100		
В. japonicum 6346+ A. chroococcum T79	29,9	33,2	33,8	33,1	32,5±0,9	116,5	4,6	16,5