

Корисна модель належить до мікробіологічної промисловості, до галузі виробництва препаратів для рослинництва. Біоактиватор Азотофіт може бути використаний у сільському господарстві в рослинництві для передпосівної обробки насіння зернових, зернобобових, круп'яних, олійних, овочевих культур та коренеплодів, обробки розсади та підживлення овочевих, технічних культур, квітів, ягідників молодих саджанців плодових дерев, лісових культур з метою прискорення росту рослин, підвищення урожаю та поліпшення його якості, пригнічення фітопатогенної мікрофлори - збудників хвороб рослин, а також для покращення природної родючості.

Врожай сільськогосподарських культур формується в результаті всіх факторів життя рослин, які регулюються агротехнічними заходами землеробства, такими як створення оптимальних умов живлення рослин, водного і повітряного режимів ґрунту, надійного захисту рослин від хвороб, шкідників і бур'янів. Технології одержання високих врожаїв передбачають також створення нових сортів за рахунок селекції і біоінженерії.

Ще одним резервом підвищення врожайності і покращення якості продукції рослинництва є використання мікробіологічних технологій, які вже визнані і серйозно втілюються як частина національної політики в багатьох країнах світу. Широке застосування цих технологій може внести значний вклад в загальне покращення екологічного стану планети, в цілому, і досягнення економічно ефективного забезпечення продуктами харчування при дбайливому використанні природних ресурсів.

Мікробіологічні технології передбачають бактеризацію (примусове внесення) і створення відповідних умов для розвитку в ґрунті анабіотичних мікроорганізмів, що приймають участь в регенеративних процесах ґрунту, стимуляції росту і розвитку рослин, пригніченні патогенної ґрунтової мікрофлори.

Сучасні технології вирощування сільськогосподарських культур, як показує наука і практика, повинні базуватись не тільки на добре збалансованому використанні макро- і мікроелементів живлення рослин та хімічних засобів їх захисту від шкідників та хвороб, але й на використанні біологічних та фізіологічно активних речовин, які, завдяки специфічності та вибіркості їх дії на процеси росту розвитку рослин, можуть значно підвищити продуктивність та якість продукції сільськогосподарських культур.

До таких речовин і відноситься біоактиватор Азотофіт, який складається з живих клітин азотфіксуючих мікроорганізмів та комплексу біологічно - активних сполук, що активізують у рослинах основні життєві процеси - стимулюють проростання насіння, нарощування зеленої маси і кореневої системи рослин та пригнічують розвиток фітопатогенної мікрофлори - збудників кореневої гнилі, парші, головні та інш. Біоактиватор Азотофіт одержують на основі ґрунтових бактерій, які сприяють збагаченню та відновленню родючості ґрунтів.

Біоактиватор Азотофіт - екологічно чистий препарат, нешкідливий для людини, тварин, птиці, бджіл та інших комах.

Відомі й інші продуценти із роду *Azotobacter*, які синтезують бактерії, здатні фіксувати азот із атмосферного повітря та синтезувати ростостимулюючі речовини. Це *A. vinelandii* і *A. agilis*, які мають деякі недоліки та переваги.

Головним критерієм у відборі продуценту прийнято підвищену стабільність штаму - продуценту із збереженням всіх властивостей біологічно - активних сполук (вітамінів та стимуляторів росту) та стійкість до умов культивування, що забезпечує максимальне накопичення бактеріальної маси.

Відомий штам *Azotobacter vinelandii* 56, продуцент азотфіксуючих бактерій, обробка суспензією яких насіння овочевих культур, зокрема, томатів збільшила енергію проростання насіння на 17,6%, а кількість нормально сформованих паростків виросла на 6,7%. Проте ці показники підвищують свою ефективність в присутності асоціації бактерій продуцента *A. vinelandii* 56 з іншими мікроорганізмами, наприклад фосфатмобілізуючими бактеріями роду *Bacillus*.

Найбільш близьким штамом – найближчим аналогом до заявленого є штам *Azotobacter chroococcum* 20, який в умовах глибинного культивування синтезує азотфіксуючі бактерії з титром життєздатних клітин 1×10^9 КУО/см³ [Мишустин В «Асоціації ґрунтових мікроорганізмів», М. Наука, 1979 стор 41-47].

Суттєвим недоліком вказаного штаму є:

- вимогливість до умов середовища, зокрема до підвищеної концентрації солей в ґрунті;
- понижена продуктивність бактерійної маси (титр 1×10^9 КУО/см³).

Традиційний спосіб одержання сухих (товарних) форм бактерійних препаратів включає стадії одержання культуральної рідини, стандартизації її та висушування. При цьому загальні втрати продукту складають 20-25%

Найбільш поширений спосіб висушування культуральної рідини в промисловості - це сушка розпилюючим методом в потоці гарячого повітря на вході в сушарку 130-140°C і на виході з сушарки 60-70°C. Враховуючи, що в даному випадку культуральна рідина - це суспензія живих клітин бактерій, в процесі такого сушіння бактерій багато гине, руйнуються біологічно активні та ростостимулюючі речовини, крім цього, вище названий спосіб має значні недоліки:

- забруднення навколишнього середовища викидом відпрацьованого повітря з клітинами бактерій;
- великі втрати препарату із-за впливу високої температури та виносу бактерій з відпрацьованим повітрям.

Останнім часом в виробничу практику впроваджують метод нанесення культуральної рідини на природний носій, який утримує біологічно активну основу на своїй поверхні, зберігаючи всі властивості препарату.

Найбільш близьким за технічною сутністю є винахід [«Спосіб одержання препарату на основі азотофіксуючих бульбочкових бактерій» патент України №53187 А, оп. 15.01.2003 р.], що включає вирощування азотофіксуючих бактерій, підготовку стерильного вермикулітного субстрата-наповнювача, введення у наповнювач азотофіксуючих бактерій і поживних речовин, вирощування бактерій за відомими технологіями. Одержують титр $(5-6) \times 10^9$ кл/кг. Препарат поліпшує мінеральне харчування сільськогосподарських культур і підвищує їх продуктивність. Проте є і суттєві недоліки такого способу, а саме: вермикуліт, як носій, характеризується нестандартністю, нерідко в ньому містяться токсичні речовини, які є інгібіторами для росту рослин, його доставка та підготовка потребує додаткових витрат; є проблеми з стерилізацією самого субстрата, яка потрібна для усунення грибів і бактерій, здатних знизити титр життєздатних клітин, суспензія яких змішується зі стерильним носієм.

Метою даної корисної моделі є розробка вище описаного препарату. Задача вирішується тим, що одержання біоактиватора Азот офіту здійснюється шляхом культивування мікроорганізма-продуцента та сушіння культуральної рідини, при цьому як мікроорганізм-продуцент використовують штам *Azotobacter chroococcum* 3064, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України як *Azotobacter chroococcum* IMB В-

7090, культивування проводять в аеробних умовах за температури $29 \pm 1^\circ\text{C}$, при постійному перемішуванні, водневому показнику 6,5-7,0 протягом 24-50 годин на стерильному поживному середовищі, яке містить, мас %:

амоній молібденовокислий	0,0001-0,0010
калій фосфорнокислий	
однозаміщений	0,02-0,08
магній сірчаноокислий	0,01-0,06
залізо сірчаноокисле	0,0002-0,0008
марганець сірчаноокислий	0,0001-0,0010
кислота борна	0,0001-0,0010
крейда	0,2-0,6
меляса бурякова	2,0-6,0
сіль кухонна	0,01-0,10,

при цьому одержана культуральна рідина є рідкою товарною формою препарату з титром життєздатних клітин продуцента не менше $1,0 \times 10^{10}$ КУО/см³, а суху товарну форму одержують сушінням суміші культуральної рідини з речовинами-стабілізаторами (цеоліт природний молотий, глина бентонітова порошкоподібна неактивована, торф верховий) в сушильній шафі за температури 20-40°C протягом 20-24 годин або іншими відомими методами сушіння з оптимально підібраними для цього параметрами (температура, тривалість).

Спільними з найближчим аналогом ознаками є:

- використання в якості мікроорганізму - продуцента штаму *Azotobacter chroococcum*;
- використання природного носія - стабілізатора.

Відмінними ознаками є:

- використання нового удосконаленого штаму *Azotobacter chroococcum* IMB-B-7090, що характеризується підвищеною здатністю фіксувати молекулярний азот і покращувати азотне живлення рослин, більш високою активністю продукувати бактерійну масу (титр не менше 1×10^{10} КУО/см³) та біологічно - активні сполуки (вітаміни і стимулятори росту), солетолерантністю;

- використання природного носія - стабілізатора, до складу якого входять мінеральні сполуки кальцію, магнію, фосфору, натрію, калію та біля 40 макро - та мікроелементів (мідь, срібло, нікель, цинк, хром, молібден, кобальт, бор та інші) для утримання біологічно - активної основи на своїй поверхні, зберігаючи всі властивості препарату;

- значне зниження трудових, матеріальних та енерговитрат на виробництво бактерійного препарату, в зв'язку з нанесенням стабілізованої культуральної рідини на поверхню природного носія, виключаючи розпилюючу сушарку

- одержання більш стабільного при зберіганні препарату, в зв'язку з висушуванням при достатньо низькій температурі.

Одержаний штам *Azotobacter chroococcum* депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України в березні 2003 р. з реєстраційним номером *Azotobacter chroococcum* IMB B-7090. Штам виділений методом направленої селекції із зразків ґрунту, непатогенний і має наступні характеристики:

1. Культурально-морфологічні особливості штаму: На середовищі Ешбі, агаризованому середовищі Федорова, МПА колонії випуклі, круглі, блискучі, гладенькі, непрозорі, слизисті. Край колонії рівний.

Клітини паличкоподібні 3,1×2мкм, довжина змінюється майже до кокоподібних форм, розташовуються поодинокі, парами і неправильними групами.

Утворює товстостінні цисти, якщо бракує поживних речовин. Рухливі. Жгутики перитрихальні. Утворюють капсульний слиз. Гетеротроф. Здатний фіксувати молекулярний азот в присутності молібдену, який можливо замінити ванадієм. Аероб. Каталозопозитивний. Використовує глюкозу, сахарозу, крохмаль, маніт. Не використовує рамнозу. Мезофіл. Оптимальна температура росту 20-30°C. Межі pH для росту 5,5-8,5. Оптимум pH 6,5 ÷ 7,0.

Галузь застосування штаму: біотехнологія. Продукт, який синтезується штамом: біомаса життєздатних бактерій.

Активність штаму (з вказівкою умов культивування та способу визначення активності): при культивуванні на середовищі Федорова наступного складу (г/л): калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,5; магній сірчаноокислий - 0,3; марганець сірчаноокислий - 0,005; залізо сірчаноокисле - 0,005; амоній молібденовокислий - 0,005; крейда - 3,5; кислота борна - 0,005; меляса - 30,0 або цукор - 20,0 після культивування на качалці при 200-220об/хв, температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 48-60 год накопичення біомаси 1×10^9 кл/мл. Титр культури визначають методом посіву на агаризоване середовище Федорова.

Спосіб, умови і склад середовищ для зберігання: скошене агаризоване середовище (г/л): магній сірчаноокислий - 0,3; натрій хлористий - 0,3; калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,5; марганець сірчаноокислий - 0,005; залізо сірчаноокисле - 0,005; амоній молібденовокислий - 0,005; кальцій вуглекислий - 3,5; меляса - 20, або цукор - 10; кислота борна - 0,005; агар - 20,0; температура плюс 4°C, термін зберігання - 6 міс.

Умови і склад середовищ для ферментації: аерація, перемішування, температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$; тривалість культивування 48-60 год, pH - 6,5 ÷ 7,0, середовище (г/л): калій фосфорнокислий однозаміщений - 0,5; магній сірчаноокислий - 0,3; марганець сірчаноокислий - 0,005; залізо сірчаноокисле - 0,005; сіль кухонна - 0,3; амоній молібденовокислий - 0,005; кислота борна - 0,005; крейда - 3,5; меляса - 30; пропінол - 0,3.

Генетичні особливості: Не підлягав дії мутагенних факторів. Непатогенний. Аутокотрофність, стійкість до антибіотиків не встановлені.

Культивування в виробництві здійснюють в аеробних умовах, при постійному перемішуванні, за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$, протягом 38-60 годин на стерильному поживному середовищі, що містить: калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчаноокислий, сіль кухонну, залізо сірчаноокисле, марганець сірчаноокислий, амоній молібденовокислий, кислоту борну, крейду, мелясу, пропінол.

В одержаній культуральній рідині титр життєздатних клітин продуцента не менше 1×10^{10} КУО/см³.

Для стабілізації в культуральну рідину вносять природні стабілізатори, суміш, розмішують в пристрої з механічним перемішуванням типу турбозмішувача і розміщують тонким шаром на піддонах, підсушують у сушильній шафі з систематичним перемішуванням за температури 20-40°C протягом 20-24 годин до вологості не більше 10%. В готовому препараті визначають загальне число життєздатних мікроорганізмів продуцента.

Вихід готового продукту складає в середньому 80-90%.

Ефективність дії бактерійного препарату біоактиватора Азотофіт випробовували в дослідях на рослинах огірка, при розсадному і безрозсадному способах вирощування, на рослинах капусти цвітної, в залежності від способів застосування біоактиватора, на рослинах салату при замочуванні насіння до висіву. Підтверджено, що застосування біоактиватора Азотофіт в рослинництві прискорює ріст рослин, ефективно підвищує урожай та значно поліпшує його якість.

Технічне розв'язання поставлених завдань пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1

З метою одержання бактерійного препарату приготували рідке поживне середовище, що містить калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчанокислий, сіль кухонну, залізо сірчанокисле, марганець сірчанокислий, амоній молібденовокислий, кислоту борну, крейду, мелясу, пропінол.

Культуральну рідину вирощували на качалці з числом обертів $200-220 \text{ хв}^{-1}$ за температури $29 \pm 1^\circ \text{C}$ протягом 48-60 годин, pH $6,5 \div 7,0$. В одержану культуральну рідину (об'єм 10л) з накопиченням біомаси $1 \times 10^{10} \text{ КУО/см}^3$.

Культуральну рідину змішали з природним стабілізатором, помістили тонким шаром на піддони і підсушили в сушильній шафі за температури 20-25°C протягом 20-24 годин до вологості 7%.

З операції одержано 20кг готового продукту з титром життєздатних клітин продуценту $4 \times 10^9 \text{ КУО/г}$. Вихід препарату по відношенню до культуральної рідини склав 80%.

Приклад 2

Препарат одержували, як описано вище, але в виробничих умовах - в ферментаторі ємністю $1,0 \text{ м}^3$. Процес культивування здійснювали при постійному перемішуванні мішалкою в аеробних умовах з витратою повітря $1,0 \div 1,1$ на 1 м^3 поживного середовища за 1 хвилину, за температури $29 \pm 1^\circ \text{C}$, надлишковому тиску $0,03-0,05 \text{ МПа}$ протягом 38-60 годин. Одержано 500л культуральної рідини з титром життєздатних клітин $1,1 \times 10^{10} \text{ КУО/см}^3$, pH $6,0-7,0-7,6$, без сторонньої мікрофлори. Із стабілізованої культуральної рідини одержали 986кг готового продукту з титром життєздатних клітин $5 \times 10^9 \text{ КУО/г}$ і вологістю 6,5%. Вихід препарату по відношенню до культуральної рідини склав 89,6%.

Приклад 3

Вивчення впливу препарату біоактиватора Азотофіт на продуктивність рослин огірка, капусти цвітної, салату, томатів проводились на дослідних ділянках.

Встановлено, що найбільший ефект від застосування препарату при обробці насіння та обприскуванні рослин за вегетацією. Біоактиватор Азотофіт здатний замінити хімічні протруйники та заощадити на внесенні 50-70кг/га аміачної селітри.

Ефект від застосування препарату полягає у підвищенні схожості насіння, стимуляції розвитку кореневої системи та рослини загалом, прискоренні цвітіння і дозрівання урожаю, покращенні мінерального живлення рослини, підвищення стійкості їх до хвороб та абіотичних факторів, підвищення урожайності овочевих на 40%, зменшенні витрат на протруєння насіння та захист рослин від хвороб у 5-10 раз та доз азотних добрив на 60-70%. Урожайність овочевих культур при застосуванні біоактиватора Азотофіт суттєво зростає, про що свідчать дані наведеної Таблиці.

Вплив біоактиватора Азотофіт на урожайність овочевих культур, ц/га

Культура/сорт	Контроль	Застосування Азотофіту	Зростання урожаю, %
1	2	3	4
Томати			
Ладний	456	462	1,3
	456	491	7,7
Салат головчастий			
Юстіна:	396	411	12,3
Годар	311	318	2,3
Модесто	478	489	2,3
Золотий шар	189	222	17,5
Салат листковий			
Огірки			
Гібрид Вокал	401	539	34,4
	452	574	27,0
	452	589	30,3
	452	502	11,1
Цвітна капуста			
Робер	180	236	31,1
	180	221	22,8
	180	214	18,9
Гудмен	186	196	5,4
	186	237	27,4
	186	226	21,5

Отже, під впливом біоактиватора Азотофіт урожайність томатів підвищується до 8%, салату головчастого до 12,3, листкового - до 18%, огірків до 35%, цвітної капусти до 32%.

Щодо економічної ефективності застосування біоактиватора Азотофіт: вартість передпосівної обробки традиційними хімічними протруйниками 140-180грн/т, біоактиватором Азотофіт - приблизно 42грн/т.; вартість підживлення аміачною селітрою - 100грн/т, біоактиватором Азотофіт - 45грн/т.