



УКРАЇНА

(19) UA (11) 72856 (13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 1/20

C05F 11/08 (2006.01)

A01N 63/00

C12R 1/065 (2006.01)

A01P 21/00

A01C 1/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ AZOTOBACTER VINELANDII ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА  
ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

1

2

(21) 20031211033

(22) 04.12.2003

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Курдиш Іван Кирилович, Бега Зінаїда Терентіївна

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ  
ІМ. Д.К.ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕ-  
МІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA 1012, 30.12.1993

UA 57269, 16.06.2003

(57) Штам бактерій Azotobacter vinelandii IMB B-  
7076 для одержання бактеріального добрива для  
рослинництва.

Винахід відноситься до мікробіологічних засобів підвищення врожайності культурних рослин за рахунок поліпшення азотного та фосфорного живлення і стосується виділення нового штаму, що фіксує азот, призначеного для виготовлення бактеріального препарату.

Метою винаходу є одержання нового штаму, який характеризується високою активністю фіксації атмосферного азоту, стійкістю при довготривалому культивуванні в лабораторних умовах, росте на важкорозчинних сполуках фосфору та виявляє стимулюючий ефект на енергію проростання, схожість насіння, підвищує врожайність сільськогосподарських культур.

Штам бактерій Azotobacter vinelandii 7-KB виділений з чорноземного ґрунту, відібраного з кореневої зони цукрового буряка в Житомирській області і селекціонований у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного (ІМВ) НАН України.

Штам депонований у Депозитарії мікроорганізмів ІМВ НАН України 21 листопада 2002 року і йому привласнено колекційний номер Azotobacter vinelandii 7-KB IMB B-7076.

Основною особливістю штаму є його здат-

ність накопичувати велику кількість біомаси порівняно з відомим штамом Azotobacter vinelandii 56, синтезувати жовто-бурий пігмент та його здатність до росту на важкорозчинних неорганічних сполуках фосфору, зокрема трикальційфосфаті.

Штам Azotobacter vinelandii 7-KB для одержання препарату, що поліпшує азотне живлення рослин і частково фосфорне за рахунок його мобілізації з важкодоступних неорганічних сполук, стимулює енергію проростання та схожість насіння, підвищує врожайність овочевих культур.

Винахід відноситься до ґрунтової мікробіології, зокрема для одержання бактеріального препарату, внесення якого в ґрунт підвищує врожайність сільськогосподарських культур і являє собою новий штам для одержання бактеріального препарату.

Штам виділений з чорноземного ґрунту Житомирської області на мінеральному середовищі Ешбі з сахарозою методом розкладання грудочок ґрунту на поверхню агаризованого середовища Ешбі. Штам ідентифіковано відповідно до визначника Бергі, йому визначили номер 7-KB.

В Депозитарії Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАН України наданий номер IMB B-7076.

(13) C2

(11) 72856

(19) UA

Штам *Azotobacter vinelandii* 7-KB має наступні властивості.

Морфологічні і культуральні ознаки:

клітини округло-овальної форми розміром 1,9-2,0 мкм, в молодому віці (16-20 годин) - паличковидні. Клітини розміщуються поодинокі, утворюють цисти, синтезують значну кількість капсульного слизу. Клітини в молодому віці рухливі, грамваріабельні. В рідкому середовищі Ешбі утворюють жовто-бурий пігмент, розчинний у воді. Колонії на агаризованому Ешбі округлі, слизисті, жовтого кольору, випуклі, блискучі, край колоній рівний. Діаметр колоній 72-годинної культури становить 2-3 мм.

Культура швидкоростуча, за три доби культивування нарощує біомасу з  $1 \cdot 10^5$  кл/мл до  $4,9 \cdot 10^8$  кл/мл, штам *Azotobacter vinelandii* 56 -  $3,4 \cdot 10^8$  кл/мл.

Біохімічні ознаки:

Штам 7-KB - аероб, хемоорганотроф, використовує для живлення вуглеводи (сахарозу, глюкозу, рамнозу), не росте на крохмалі, споживає спирти (маніт, інозит), солі органічних кислот (капронат, каприлат, малонат), каталазопозитивний. Штам *Azotobacter vinelandii* 7-KB росте при температурі від 20 до 45°C і pH від 5,0 до 9,0. Оптимальна температура росту 28-37°C, pH 6,5-7,5. Росте на середовищі Ешбі без азоту, але може використовувати як джерело азоту нітрати, солі амонію. Ознаки штаму стійкі.

Штам непатогенний для теплокровних тварин.

Умови зберігання.

Штам зберігається на безазотному середовищі Ешбі наступного складу (г/л): сахароза - 20,0;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  - 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2; NaCl - 0,2;  $K_2SO_4$  - 0,1;  $CaCO_3$  - 2,0; агар - 15,0; мікроелементи (по Федорову) - 1 мл; pH - 7,0-7,5. Зберігання штаму здійснюється в пробірках на скошеному агаризованому середовищі Ешбі під ватно-марлевими пробками при температурі 4°C. Підтримується штам методом періодичних пересівів (один раз у квартал).

Здатність штаму до високої ростової активності за рахунок фіксації атмосферного азоту підтверджується прикладом 1.

Приклад 1

Готують посівний матеріал, вирощуючи бактерії *Azotobacter vinelandii* 7-KB на скошеному агаризованому середовищі Ешбі в пробірках протягом 48 год при 28°C в термостаті. Потім готують суспензію бактерій змивом з косяків фізіологічним розчином. Визначають титр бактерій в суспензії методом прямого рахунку, наносячи 0,01 мл суспензії на 4 см<sup>2</sup> предметного скла. В качалочні колби з 100 мл рідкого середовища Ешбі вносять суспензію з таким розрахунком, щоб концентрація клітин *Azotobacter vinelandii* складала  $1 \cdot 10^5$  або  $5 \cdot 10^5$  кл/мл. Вирощують культури при періодичному культивуванні (240 об/хв) протягом 3-х діб при 28°C. До і після вирощування в культуральній рідині визначають чисельність азотфіксуючих бактерій (таблиця 1).

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що культивування *Azotobacter vinelandii* 7-KB в безазотному середовищі Ешбі супроводжу-

ється накопиченням більшої кількості клітин ніж *Az. vinelandii* 56.

Здатність *Azotobacter vinelandii* 7-KB рости і на тяжкорозчинному трикальційфосфаті показано на прикладі 2.

Приклад 2

Посівний матеріал вирощують в пробірках на скошеному агаризованому середовищі Ешбі на протязі 48 годин при 28°C. Потім 1 мл суспензії, приготованої змивом мікроорганізмів фізіологічним розчином з скошеного середовища і доведеної за стандартом мутності до 5 одиниць, засівають в 100 мл рідкого середовища Ешбі, в якому розчинний  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  замінено на тяжкорозчинний  $Ca_3(PO_4)_2$  (2 г/л). *Azotobacter vinelandii* вирощували 72 години при 28°C, в умовах періодичного культивування при перемішуванні (240 об/хв.). До і після цього в культуральній рідині визначали чисельність бактерій методом посіву на агаризоване середовище з десятикратних розведень. У фугаті визначають концентрацію  $PO_4^{3-}$  колориметрично з використанням молібденовокислого амонію та аскорбінової кислоти в якості відновлювача (таблиця 2).

Таким чином, штам *Azotobacter vinelandii* 7-KB, що пропонується для внесення в ґрунт, характеризується значним стимулюючим впливом на енергію проростання і схожість насіння ряду овочевих культур.

Приклад 3

Вплив *Azotobacter vinelandii* 7-KB на енергію проростання та схожість насіння овочевих культур оцінювали за ГОСТом 12038-84. З цією метою отримували суспензію мікроорганізмів на рідкому середовищі Ешбі в умовах, описаних вище. Насіння огірків, томатів, буряка, капусти обробляли суспензією клітин *Azotobacter vinelandii* 7-KB, а також суспензіями, розведеними в 10, 50 і 100 разів водопровідною водою, протягом 1 години, після чого насіння розкладали на зволожений фільтрувальний папір в чашки Петрі, або пластмасові кювети. Крім того, насіння обробляли надосадковою рідиною, звільненою від клітин центрифугуванням. Інкубували насіння в темряві при 25°C згідно ГОСТ 12038-84. Контролем служило насіння, оброблене водопровідною водою (таблиця 3).

Дані таблиці 3 показують, що обробка насіння суспензією азотфіксуючих мікроорганізмів *Azotobacter vinelandii* 7-KB та надосадковою рідиною значно підвищує енергію проростання, і його схожість та довжину проростків.

Запропонований штам спричиняє помітний стимулюючий вплив на ріст та врожайність сільськогосподарських рослин.

Суспензію мікроорганізмів *Azotobacter vinelandii* 7-KB змішували з глинистим мінералом і вносили під коріння рослин з розрахунку 0,5 г препарату. 1 г препарату містив не менше ніж  $1 \cdot 2,5 \cdot 10^8$  клітин *Azotobacter vinelandii* 7-KB. В результаті в господарстві "Совки" Києво-Святошинського району Київської області в умовах закритого фунту одержано урожай томатів сорту Червона стріла на 27,7% вищий, ніж в контрольному варіанті.

Таблиця 1

Ростова активність *Azotobacter vinelandii* 7-KB в рідкому середовищі Ешбі (72 год. культивування)

П №	Штам	Кількість життєздатних клітин в 1 мл	
		Початкова	Кінцева
1	Az.vinelandii 7-KB	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(4,9 \pm 0,30) \cdot 10^8$
	Az.vinelandii 56	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,40 \pm 0,50) \cdot 10^8$
2	Az.vinelandii 7-KB	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,80 \pm 0,08) \cdot 10^9$
	Az.vinelandii 56	$(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(1,71 \pm 0,27) \cdot 10^9$
3	Az.vinelandii 7-KB	$(5,9 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(8,70 \pm 0,56) \cdot 10^8$
	Az.vinelandii 56	$(6,4 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(6,20 \pm 0,32) \cdot 10^8$

Таблиця 2

Ріст азотофіксуючих мікроорганізмів в середовищі Ешбі з тяжко розчинними фосфатом кальцію

Штами	Середовище Ешбі з $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0,2 г/л		Середовище Ешбі з $Ca_3(PO_4)_2$ , 2 г/л	
	Чисельність, кл/мл	$PO_4^{3-}$ , мг/л	Чисельність, кл/мл	$PO_4^{3-}$ , мг/л
Az.vinelandii 7-KB	$(2,14 \pm 0,26) \cdot 10^4$	$180 \pm 0,21$	$(2,40 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$4,2 \pm 0,14$
	$(1,87 \pm 0,22) \cdot 10^5$	$160 \pm 0,52$	$(1,97 \pm 0,06) \cdot 10^8$	$9,6 \pm 0,70$
Az.vinelandii 56	$(1,23 \pm 0,33) \cdot 10^4$	$184 \pm 0,30$	$(3,87 \pm 0,30) \cdot 10^4$	$3,0 \pm 0,01$
	$(1,68 \pm 0,18) \cdot 10^5$	$157 \pm 3,00$	$(2,65 \pm 0,15) \cdot 10^8$	$8,2 \pm 0,20$

Примітка: в чисельнику - показники на початку досліджу;  
в знаменнику - після 72 годин культивування

Таблиця 3

Енергія проростання, схожість насіння та довжина проростків після їх бактеризації *Azotobacter vinelandii* 7-KB

Бактеризація насіння	Енергія проростання, % від контролю	Схожість, % від контролю	Довжина проростків, % від контролю
Томати сорту Лагідний			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	116,4	101,9	111,8
Суспензія, розведена 1:10	119,8	103,6	120,5
Суспензія, розведена 1:100	111,3	107,4	109,0
Надосадкова рідина	116,7	101,9	117,2
Томати сорту Новинка Придніпров'я			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	-	100,0	112,2
Суспензія, розведена 1:10	110,1	103,9	109,6
Суспензія, розведена 1:100	104,3	102,4	106,0
Надосадкова рідина	103,4	104,7	111,8
Огірки сорту Конкурент *			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	100,0	100,0	120,0
Суспензія, розведена 1:10	100,0	100,0	121,7
Суспензія, розведена 1:100	100,0	100,0	117,3
* Схожість огірків у всіх варіантах 100%			
Червоноголова капуста сорту Топаз			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	113,4	114,0	129,1
Суспензія, розведена 1:10	122,9	118,1	131,3
Суспензія, розведена 1:100	147,9	120,0	133,8
Столовий буряк сорту Бордо			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	119,2	134,2	105,4
Суспензія, розведена 1:10	108,3	104,5	108,3
Надосадкова рідина	-	103,4	115,9

Продовження таблиці 3

Ярова пшениця сорту Рання-93			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія, розведена 1:50	120,5	120,7	100,0
Цукровий буряк сорту Олександрія			
Контроль	100,0	100,0	100,0
Суспензія	-	102,2	109,3
Суспензія, розведена 1:10	112,0	141,2	100,0
Суспензія, розведена 1:50	100,0	223,7	100,0
Надосадкова рідина	106,8	182,5	109,8
Надосадкова рідина, розведена 1:10	157,2	177,7	103,6
Надосадкова рідина, розведена 1:50	172,0	221,5	103,8

Примітка: за 100% прийнято показник у контрольному варіанті