



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. № 104

(19) **SU** (11) **1490887** **A1**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

(5D 4 C 05 F 11/08, C 12 N 1/20
(C 12 N 1/20, C 12 R 1:065))

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4133167/31-13

(22) 08.10.86

(71) Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного

(72) А.Ф. Антипчук, Р.М. Канцелярук, Е.В. Танцюренко, Н.Н. Скочинская и В.Н. Рангелова

(53) 63:576.8(088.8)

(56) Рубенчик Л.И. *Azotobacter* и его применение в сельском хозяйстве.

Киев: Изд-во АН УССР, с.328.

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *AZOTOBACTER VINELANDII* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО УДОБРЕНИЯ ПОД КАПУСТУ

(57) Изобретение относится к микробиологическим средствам повышения урожайности овощных культур и касается получения нового штамма азотобактера для производства бактери-

ального удобрения под капусту. Целью изобретения является получение нового штамма бактерий рода *Azotobacter*, более эффективно повышающего урожай капусты и одновременно улучшающего ее качество. Штамм *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ № 24 выделен из черноземной почвы. Штамм *Azotobacter vinelandii* депонирован и хранится в коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии под номером 24 и Институте микробиологии и вирусологии АН УССР под номером 56. При проведении инокуляции капусты штамм *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24 в сравнении с известным *A. chroococcum* К. дает прибавку в среднем на 100 ц/га (от 30-50 до 2279 ц/га) и повышает содержание аскорбиновой кислоты в листьях капусты на 81,5%. 3 табл.

Изобретение относится к микробиологическим средствам повышения урожайности овощных культур и касается получения нового штамма азотобактера для изготовления бактериального удобрения под капусту.

Целью изобретения является получение нового штамма бактерий рода *Azotobacter*, более эффективно повышающего урожай капусты и одновременно улучшающего ее качество.

Штамм *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ № 24 выделен из черноземной почвы.

Штамм *Azotobacter vinelandii* депонирован и хранится в коллекции ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии 24-89

гии под номером 24 и коллекции Института микробиологии и вирусологии АН УССР под номером 56.

Штамм идентифицирован по "Краткому определителю бактерий Берги". М.: Мир, 1980, с. 495.

Культурально-морфологические признаки штамма *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24.

Azot. vinelandii ВНИИСХМ 24 - культура неспороносная, аэробная, грамотрицательная, подвижная (перитрих). При выращивании на агаризованных средах Эшби (дистиллированная вода 1 л; маннит 20 г; K_2HPO_4 0,2 г; $MgSO_4$ 0,2 г; $NaCl$ 0,2 г; K_2SO_4 0,1 г; $CaCO_3$ 5,0 г; агар 15 г,

СССР **SU** (11) **1490887** **A1**



pH 7,6) и Федорова (дистиллированная вода 1 л; маннит 20 г; K_2HPO_4 0,3 г; $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,2 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 г; K_2SO_4 0,2 г; NaCl 0,5 г; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,05 г; $CaCO_3$ 5 г; смесь микроэлементов 1 мл, pH 7,0)

при 28°C культура образует влажные, блестящие, слизистые беловатые колонии. На тех же средах с сахарозой вокруг клеток образуются капсулы. Длина клеток варьирует от 3,4 до 7,6 мкм, ширина — от 1,2 до 2,9 мкм. Клетки овальные, объем их колеблется от 12,4 до 15,9 мкм³. При выращивании на качалках на жидкой среде Эшби при 160–240 оборотах в минуту и температуре 28°C культура образует зеленый, слегка флуоресцирующий пигмент и большое количество капсулярной слизи.

Физиолого-биохимические признаки штамма *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24.

Штамм в качестве источников углерода может использовать глюкозу, сахарозу, мальтозу, декстрин, маннит, мелассу, соли яблочной и лимонной кислот. Наряду с усвоением азота атмосферы может использовать аммонийный азот и азот мочевины. В стимуляторах роста предлагаемый штамм не нуждается. При выращивании на жидкой среде Эшби с маннитом время генерации не превышает 15–17 ч.

Для получения титра 0,8–1,2 млрд. клеток/мл за 48 ч в жидкую питательную среду Эшби в качестве источника углеродного питания вместо маннита вносят мелассу в количестве 60 г на 1 л среды (так как содержание сахара в мелассе не превышает 50%).

Культура не растет на белковых средах, не разжижает желатин. Слабо пептонизирует молоко. Восстанавливает нитраты до нитритов.

Признаки штамма устойчивы. Штамм не патогенен.

Хранится на твердой среде Эшби при 5–7°C, пересеивается 1 раз в 6 месяцев.

Как видно из табл. 1, штамм *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24 обладает практически такой же скоростью размножения, как и штамм *A. chroococcum* К., но отличается от него более высокой экономичностью фиксации атмосферного азота: из

расчета на 1 г потребленной сахарозы он фиксирует в 1,8 раза больше азота.

В сравнении со штаммом *Azotobacter chroococcum* К. штамм *A. vinelandii* ВНИИСХМ 24 интенсивнее продуцирует ауксины и витамины группы В и подавляет рост большего количества фитопатогенных микроорганизмов.

Пример 1. Получение препарата на основе штамма *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24.

Для получения бактериального удобрения штамм 24 выращивают на модифицированной среде Эшби следующего состава: дистиллированная вода 1 л; меласса 60 г; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4$ 0,2 г; NaCl 0,2 г; K_2SO_4 0,1 г; $CaCO_3$ 5,0 г; агар 15,0 г, pH 7,6. Среду стерилизуют при 0,75 атм в течение 30 мин. Посевной материал вносят стерильно в среду в количестве 5–10% по объему. Культуру выращивают 48 ч в колбах при скорости перемешивания 160–240 оборотов в минуту при 28°C. При этом титр азотобактера 0,8–1,2 млрд. клеток/мл.

Для бактеризации рассады можно использовать жидкое бактериальное удобрение (культуру), а также торфяной препарат, который получают путем внесения стерильной 48-часовой культуры в стерильный торф из расчета 300 мл культуры с титром 0,8–1,2 млрд. клеток/мл на 1 кг торфа.

Торф стерилизуют в заводских условиях γ -лучами в дозе 2,5 Мрад.

После инокуляции пакеты с торфом доращиваются при температуре 18–20°C в течение 10 сут.

Методика проведения инокуляции штаммом *A. vinelandii* ВНИИСХМ 24 капусты.

Бактеризацию рассады капусты производят непосредственно перед высадкой растений в грунт методом обмакивания корней. При этом торфяной препарат после доращивания разводится в 5 раз. Корни рассады обмакивают в полученной суспензии, содержащей 60–70 млн. клеток азотобактера в 1 мл.

Можно производить бактеризацию рассады капусты методом полива растений в прикорневую зону.

При использовании жидкого препарата исходную культуру, содержащую

0,8-1,2 млрд. клеток/мл, разводят в 5 раз. Под каждое растение вносят 3-5 мл полученной суспензии.

Пример 2. Конкретное применение штамма *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ 24.

Обработку рассады капусты производят методом обмакивания корней перед высадкой в почву. Прибавка урожая раннеспелой капусты сорта Июльская в Киевской области в результате бактеризации штаммом 24 составила 227 ц/га; позднеспелой сорта Амогер 100 ц/га. В Донецкой области прибавка урожая капусты сорта Амогер от бактеризации колебалась от 30 до 50 ц/га по сравнению с известным штаммом К. Бактеризованная штаммом № 24 капуста созрела на 7 дней раньше.

Результаты применения для бактеризации штамма 24 и К представлены в табл. 2.

Итак, прибавка урожая капусты при сравнении штаммов азотобактера 24 и К составляет в среднем 100 ц/га.

Характеристика полученной продукции представлена в табл. 3.

Таким образом, штамм *A. vinelandii* ВНИИСХМ 24 по сравнению со штаммом *A. chroococcum* К. повышает содержание аскорбиновой кислоты в листьях капусты на 81,5%.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ № 24 для получения бактериального удобрения под капусту.

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика штамма *Azotobacter vinelandii* ВНИИСХМ № 24 и известного - *A. chroococcum* К.

Но- мер	Показатели	Az.chroo- coccum К.	Az.vinelan- dii ВНИИСХМ 24
1	2	3	4

1 Скорость размножения - определяют по методу Разумова А.С. Для этого учитывают начальную концентрацию культуры при посеве на жидкую среду Эшби и конечную концентрацию культуры через 48 ч культивирования. Затем рассчитывают по формуле

$$g = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg N_2 - \lg N_1},$$

16,5 ч

17,5 ч

где g - время генерации, ч;
t - длительность опыта, ч;
N₂ - количество бактерий в 1 мл в конце опыта;
N₁ - количество бактерий в 1 мл в начале опыта;
.2 - коэффициент геометрической прогрессии, по которой возрастает численность размножения бактерий.

На основании определения времени генерации рассчитывают количество поколений в сутки:

24 ч: g = количество поколений/сутки

1,45

1,39

Продолжение табл.1

1	2	3	4
2	<p>Азотфиксацию - определяют в шестисуточных культурах азотобактера, выращенных на жидкой среде Эшби с сахарозой. Количество фиксированного азота учитывают по методу Кьельдаля и выражают в мг. Параллельно с этим в исходной среде при засевах и при снятии опыта определяют содержание сахара фенол-серным методом Дюбуа и выражают в г/л среды или в мг/мл среды. По разнице между исходным и конечным содержанием сахарозы рассчитывают количество потребленного культурой сахара. Отношение фиксированного азота к количеству потребленной сахарозы, выраженное в мг N на 1 г сахарозы, характеризует экономичность потребления углеводов.</p>	5,4 мг/г потреблен- ной сахарозы	9,8 мг/г потребленной сахарозы
3	<p>Количество потребленного сахара (сахарозы) при одинаковых условиях культивирования - устанавливают у шестисуточных культур по разности исходного содержания (20 г/л) и конечного и выражают в процентах (при этом исходное количество сахара принимают за 100%). Концентрацию сахарозы определяют фенол-серным методом Дюбуа.</p>	91%	84%
4	<p>Образование ауксинов - определяют методом биотестов на coleoptiles пшеницы и растениях фасоли. Coleoptiles пшеницы и проростки фасоли обрабатывают раствором ауксина разной концентрации и параллельно культуральной жидкостью азотобактера при плотности культуры 50 млн/мл. Основной раствор ауксина содержит 9,3 мг ауксина в 50 мл воды. Рабочие растворы ауксина готовят по убывающей концентрации в буферном растворе. Содержание ауксина в культуральной жидкости азотобактера устанавливают методом сравнения и выражают в мг на 1 л среды.</p>	Следы	3,6 мг/л

1	2	3	4
5	Образование витамина B_1 - определяют по Одиной (1959) в двухсуточных культурах азотобактера, выращенных на жидкой среде Эшби, с использованием двухсуточной индикаторной культуры <i>Debaromyces dispersus</i> . Выражают в мкг на 1 г сухой биомассы	2,76 мкг/г	9,36 мкг/г
6	Образование витамина B_6 - определяют аналогично B_1	3,72 мкг/г	11,92 мкг/г
7	Способность сдерживать или подавлять рост и развитие фитопатогенных грибов - определяют методом блоков или цилиндров, помещаемых на газоны тест-культур, выращенных на сусло-агаре. Стерильные блоки фильтровальной бумаги $d = 0,5$ см пропитывают, а стерильные стеклянные цилиндры $V = 0,2$ мл заполняют трехсуточными культурами азотобактера	<i>Fusarium gibbosum</i> <i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium sambucinum</i> <i>Fusarium gibbosum</i>
8	Способ сдерживать или подавлять рост и развитие фитопатогенных бактерий - определяют аналогично методом блоков или цилиндров. Показателем подавления роста и развития фитопатогенов является образование зон просветления	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Corynebact. michiganense</i> <i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Agrobacter tumefaciens</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Corynebact. michiganense</i> <i>Pseudom. syringae</i> <i>Erwinia carotovora</i>

Т а б л и ц а 2

Влияние бактеризации на урожай капусты штаммами
Azotobacter vinelandii ВНИИСХМ 24 и *A. chroococcum* K.

Штаммы, использованные для бактеризации	Урожай, ц/га, пример			
	1	2	3	4
Контроль без бактеризации	187	181	173	195
<i>Az. chroococcum</i>	339	333	328	346
<i>A. vinelandii</i> ВНИИСХМ-24	443	430	412	463
$m = +15,0$ ц/га; $P, \% = 4,7$; $НСР_{0,5} = 51,7$ ц/га				
Прибавка к контролю без бактеризации при использовании штамма 24	136,9	137,5	138,1	142
Средняя прибавка 138				

Т а б л и ц а 3

Показатель	A.chroococcus K.	A.vine-landii ВНИИСХМ 24
Содержание суммы сахаров (глюкозы, фруктозы, сахарозы) в листьях бактеризованной капусты сорта Амогер (% на глюкозу) - определяют по методу Бертрانا	4,8	4,3
Содержание аскорбиновой кислоты в листьях бактеризованной капусты сорта Амогер (мг %) - определяют по методу И.Мурри	18,4	33,4

Составитель А. Кураков

Редактор Л. Павлова

Техред Л.Олейник

Корректор М. Самборская

Заказ 1102/ДСП

Тираж 223

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101