



ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)
(19) **KG** (11) **651** (13) **C1** (46) **30.04.2004**
(51) **A01N 63/00**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20020090.1

(22) 30.10.2002

(46) 30.04.2003, Бюл.№4

(76) Доолоткельдиева Т.Д., Тотубаева Н.Э., Конурбаева М.У. (KG)

(56) US A №5302578, кл. A01N 63/00, 1994

(54) Штамм актиномицета *Streptomyces fragilis* Б1-18 для стимуляции роста сеянцев хвойных пород и сельскохозяйственных культур

(57) Изобретение относится к лесохозяйственной и сельскохозяйственной биотехнологии. Задачей изобретения является получение продуцента актиномицетного препарата, стимулирующего рост растений и повышающего устойчивость к грибковым болезням. Задача решается получением нового вида штамма актиномицента *Streptomyces fragilis*, который был выделен из светло-каштановых почв на территории Иссык-Кульской области и хранится в лабораторной коллекции под номером Б1-18. Предлагаемый штамм позволяет усилить рост растений, повысить их устойчивость к грибковым заболеваниям, является перспективным для использования в микробиологической промышленности 4 табл.

Изобретение относится к лесохозяйственной и сельскохозяйственной биотехнологии.

Известны штаммы из рода *Streptomyces*, предложенные в качестве биологических средств для защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Например, известен штамм *Streptomyces WYEC 108* (US №5403584, кл. C12N 7/00; A01N 63/00; A61K 38/00; C10H 21/16, 1995), который был предложен в качестве биологического средства для снижения чувствительности сельскохозяйственных растений к грибным патогенам при обработке семян или корней.

Известен и другой, более близкий по технической сущности, *Streptomyces rimosus* SC-36 (US A № 5302578, кл. A01N 63/00, 1994), который является основой биостимулирующего препарата для применения в сельском хозяйстве в биостимулировании сельскохозяйственных культур. Однако биологическая активность предложенного штамма ограничивается только стимуляцией роста сельскохозяйственных культур. Известно, что *Streptomyces rimosus* SC-36 подавляют рост и развитие

фитопатогенов, паразитирующих только на овощных культурах и листообразующих древесных породах.

При создании данного изобретения ставилась задача получения продуцента актиномицетного препарата, стимулирующего рост сеянцев хвойных пород и сельскохозяйственных культур и повышающего устойчивость к грибковым заболеваниям.

Задача решается получением нового вида штамма актиномицента *Streptomyces fragilis*, который был выделен из светло-каштановых почв на территории Исык-Кульской области и хранится в лабораторной коллекции под номером Б1-18.

Номенклатурные данные:

Семейство Streptomycetaceae Waksman et Henrici 1943, 339. Род *Streptomyces*, секция *Roseus*, серии *Fuscus*, вид *Streptomyces fragilis*.

Штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 имеет следующие культурально-морфологические признаки: хорошо растет на крахмало-аммиачной среде (КАА) и овсяном агаре. При оптимальных условиях (рН 7.0-7.2, Т = 26-28°C) видимый рост колоний наблюдается на 3-4 сутки после посева.

На крахмало-аммиачной среде колонии неправильной формы, овальные, воздушный мицелий в ранний период светло-розового цвета, постепенно на 6-7-е сутки приобретающий насыщенно розовый оттенок, субстратный мицелий серовато-коричневого цвета. Колония кратерообразная, диаметром 0.3-0.5 мм.

На овсяном агаре растет очень интенсивно, насыщенно, рост культуры наблюдается на 3-4-е сутки.

Воздушный мицелий (ВМ) - розового цвета, субстратный мицелий (СМ) - серовато-коричневого цвета.

У штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 спораносцы короткие, споры гладкие, завитки извитые до спиральных, короткие, окраска зеленоватого цвета, цепи конидий длиной по 9-12 шт., что соответствует группе *Fuscus*.

Физиолого-биохимические признаки:

Температура роста 24-30°C, штамм слабо растет при 22°C, при ниже 20 и выше 50°C культура не прорастает. Рост мицелия лучше идет на средах с рН 7.0-8.0. Штамм в бескислородной среде не растет.

Отношение к источникам углерода:

Л-Арабиноза	+
Д-фруктоза	-
Глюкоза	+
Д-галактоза	+
Маннит	-
Сахароза	-
Д-ксилоза	+
Л-Рамноза	-
Инозит	-
Рафиноза	-

Примечание: " + " - штаммы усваивают источники углерода, " - " - штаммы не усваивают источники углерода.

Отношение к источникам азота:

Штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 растет на различных источниках азота.

Предпочтительными источниками неорганического азота является сульфат аммония, нитрат аммония. Предпочтительными органическими источниками азота является пептон, дрожжевой экстракт.

Изобретение поясняется следующими конкретными примерами получения штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18, и использования его для стимулирующего роста сеянцев ели Шренка и сельскохозяйственных культур.

Пример 1.

Посевной материал - штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 культивируют на крахмально-аммиачном или овсяном агаре. Полученный посевной материал в количестве 5.0 % от объема среды засевают в колбы со стерильной жидкой питательной средой. В качестве жидких питательных сред используют среды следующего состава (%);

1) глюкоза-30.0;

пептон-5.0;

KNO₃ - 4.0; MgSO₄ - 1.0; KH₂PO₄ -0.4; NaCl - 0.1;

вода водопроводная -1.0л

pH = 8.0-8.2;

2. соевая мука-2.0;

(NH₄)₂SO₄ - 0.3; NaCl - 0.25; KH₂PO₄ -0.075; CaCO₃-0.3;

глюкоза-2.0

pH = 8.0.

Штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 в колбах выращивают на качалках со скоростью вращения 200-220 об/мин при температуре 28-30°C в течение 48-72 ч. Затем колбы выдерживают без встряхивания в течение 1 недели. В результате образуется слой мицелия и воздушные споры на поверхности среды. Споры декантируют, гомогенизируют в стерильной воде. Суспензию центрифугируют и влажную споровую массу хранят в пластмассовых мешках. Перед употреблением суспензируют в воде. Продолжительность хранения спор штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 в дистиллированной воде или в физиологическом солевом растворе при температуре +4°C составляет 6 месяцев.

В чашке Петри образуется примерно 10¹⁰ спор штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18, которые суспензируют, например, в 5 мл воды. При дальнейшем разбавлении из этого титра спор можно готовить суспензии, которой достаточно для погружения в ней семян сельхозкультур или хвойных пород.

Пример 2. Использование препарата как биостимулятора роста сеянцев ели Шренка.

Проведенные опыты показали, что данный актиномицетный препарат на основе *Streptomyces fragilis* оказывает стимулирующий эффект роста на сеянцы ели Шренка. Семена ели Шренка замачивали в суспензии 7-суточных штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 на 1 сутки, затем их досуха просушивали при комнатной температуре. В контрольном варианте № 1 семена замачивали на 1 сутки в растворе 0.2 % KMnO₄. Посев семян проводили узкострочным методом. Тип почвы - горный чернозем.

В таблице 1, приведены данные стимулирующей активности штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 на всхожесть семян ели Шренка. Как видно из таблицы, штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 проявляет стимулирующий эффект на рост сеянцев. На 15-е сутки в варианте с обработанными семенами в суспензии штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 средняя длина стебля составила 3.8 см, средняя длина корня - 2.9, средняя длина хвоинки - 1.5 см, в то время, когда у контрольного варианта средняя длина стебля - 2.3 см, средняя длина корня - 1.4, средняя длина хвоинки - 1.3 см. Кроме этого, штамм актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 оказывает влияние на всхожесть семян. Так семена, обработанные суспензией штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18, взошли на 1 сутки и всхожесть составила 81.2 %, тогда как в контрольном варианте - на 11-е сутки, со всхожестью 62.5 %.

Таблица 1

Варианты опыта	Количество семян, шт.	Количество всходов, шт.	Длина стебля (мм) в сутки	Длина корней, мм
----------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------	------------------

			10 сут	12 сут	15сут	15 сут
1. Доза - 10^{10} спор 7-суточной культуры <i>Streptomyces fragilis</i> Б1 - 18	16	13	16	22	38	29
2. Контроль	16	10	Нет всх.	0.8	23	14

Пример 3. Использование препарата как биостимулятора роста сельскохозяйственных культур

Для выявления стимулирующего свойства роста штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18, семена пшеницы предварительно замачивали на 1-е сутки в 0.2-0.3 % растворе KMnO_4 для обеззараживания. Слегка просушенные семена замачивали в суспензии 5-суточного штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 в течение одного часа перед посевом в почву. Тип почвы - серозем. Температура воздуха 20-23°C. В контрольном варианте семена перед посевом замачивали в дистиллированной воде в течение одного часа.

Как показывают данные таблицы 2, на начальных этапах развития всходов сильный рост проявляет культура, обработанная штаммом актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18. Обработанная культура опережает контрольный вариант опыта по всхожести семян и длине стебля и корня, а также по средней биомассе. Так, средний прирост стебля за сутки составил 14.4 мм, длина корня - 104 мм за 10 суток, биомасса - 0.27 г. Если в контрольном варианте всходы появились лишь на 5 сутки, количество всходов составило всего 38.8 % от общего количества высеянных семян, то в опытном варианте, где была использована культура, обработанная штаммом актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1 - 18 - всходы появились через 1 сутки после посева, количество всходов составило 91.6 %.

Таблица 2

Варианты опыта	Количество семян, шт.	Количество всходов, шт.	Длина стебля (мм) в сутки						Средний прирост за 1 сутки	Длина корней за 10 сут	Средняя биомасса
			1	3	5	7	8	10			
1. Доза - 10^{10} спор 5-суточной культуры <i>Streptomyces fragilis</i> Б1 - 18	12	11	4	13	23	56	85	145	14.4	104	0.27
2. Контроль	18	7	Нет всх.	Нет всх.	8	53	76	117	10.9	83	0.14

Были проведены опыты, где семена пшеницы замачивали в суспензии штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 в течение 1 суток (табл. 3).

Количество всходов в опытном варианте составляет 88.8 % от общего количества высеянных семян, в контрольном варианте (вода) 83.3 %. При этом всходы взошли в контроле на 5-е сутки. Средний прирост за сутки в контроле - 9.5 мм, в опытном варианте - 15.4 мм.

Таблица 3

Варианты опыта	Количество семян, шт.	Количество всходов, шт.	Длина стебля (мм) в сутки						Средний прирост за 1 сутки, мм
			1	2	5	6	8	10	
1. 5-суточная культура штамма Б1-18 <i>Streptomyces fragilis</i>	18	16	4	16	69	119	148	173	15.4
2. Контроль (вода)	18	15	-	-	54	107	140	163	11.9

Ростстимулирующая активность штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 была проверена на всхожести клубней картофеля. В опыте были использованы здоровые и больные (пораженные серой гнилью) клубни, которые перед посадкой в почву были обработаны 5-суточной культурой штамма актиномицента *Streptomyces fragilis* Б1-18 (доза 10^{10} спор). Результаты опыта приведены в табл. 4.

Таблица 4

Варианты опыта	Количество семян, шт.	Количество всходов, шт.	Длина стебля (мм) в сутки								Средний прирост, мм
			4	5	6	7	10	11	13	15	
1. Здоровые клубни + 5-суточная культура <i>Streptomyces fragilis</i>	5	4	4	7	11	20	45	65	100	265	23.7
2. Больные клубни + 5-суточная культура <i>Streptomyces fragilis</i>	5	3		5	25	37	81	120	200	206	20.1
3. Контроль - здоровые клубни + вода	5	3	4	10	22	30	35	50	82	85	7.36

Как показывают результаты опытов, ростстимулирующий эффект культуры *Streptomyces fragilis* проявляется даже на больных клубнях, пораженных фитопатогенным грибом серой гнилью. Средний прирост стебля за 11 суток со дня появления всходов в варианте со здоровыми клубнями составил 23.7 мм, т. е. почти в 3.2 раза превосходит рост в контроле; с больными клубнями - 20.1 мм, т.е. в 2.73 раза превосходит рост в контроле.

Отмечен интенсивный рост стеблей в варианте с больными клубнями, особенно, начиная с 10-х суток, где средний прирост составил от 40 до 80 мм за сутки, что свидетельствует о том, что под влиянием метаболитов, выделяемых микроорганизмом, происходит угнетение фитопатогенов помимо ростстимулирующего свойства.

Формула изобретения

Штамм актиномицета *Streptomyces fragilis* Б1-18 как средство для стимуляции роста сеянцев хвойных пород и сельскохозяйственных культур и повышения их устойчивости к грибковым заболеваниям путем обработки семян перед посевом.

Составитель описания

Усубакунова З.К.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03