



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **102850**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 04352	(72) Винахідник(и): Волкогон Віталій Васильович (UA), Надкернична Олена Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.05.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Чернігівська обл., 14027 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2015, Бюл.№ 22	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ДІАЗОБАКТЕРИНУ ДЛЯ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ НАСІННЯ ОЗИМОГО ЖИТА, ГРЕЧКИ ТА КОРМОВИХ ЗЛАКОВИХ ТРАВ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення біологічного препарату Діазобактерину для передпосівної обробки насіння озимого жита, гречки та кормових злакових трав включає приготування посівного матеріалу *Azospirillum brasilense* та культивування його в ферментері.

UA 102850 U

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології, а саме до біопрепаратів, створених на основі азотфіксувальних мікроорганізмів.

Відомо, що покращення азотного живлення рослин за рахунок підвищення активності фіксації молекулярного азоту в їх кореневій зоні є важливим напрямом сільськогосподарської мікробіології, що спонукає до пошуку нових високоактивних штамів азотфіксувальних бактерій та створення біопрепаратів на їх основі.

Широко застосовуються біопрепарати на основі бульбочкових бактерій під бобові культури. Значно менше застосовуються активні штами і біопрепарати під інші сільськогосподарські культури. У той же час, селекціоновано активні штами родів *Bacillus* [1,2], *Azotobacter* [3], *Agrobacterium* [3, 4], *Azospirillum* [5-8] та створено біопрепарати на їх основі.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення біопрепарату Діазобактерину на основі азотфіксувальних бактерій *Azospirillum brasilense* для передпосівної обробки насіння озимого жита, гречки та кормових злакових трав.

Поставлена задача вирішується тим, що у розробці способу виготовлення біопрепарату Діазобактерину для передпосівної обробки насіння озимого жита, гречки та кормових злакових трав, що включає приготування посівного матеріалу *Azospirillum brasilense* та культивування його в ферментері, згідно з корисною моделлю, живильне середовище для вирощування азоспірил готують при наступному співвідношенні компонентів, %:

кукурудзяний екстракт	1,8-2,2
маляса	2,75-3,25
вода водопровідна	93-97,

а культивування у ферментері проводять протягом 48 годин за температури +28 - +30 °С.

Запропонований спосіб включає наступні стадії:

1. Приготування посівного матеріалу.

Приготування посівного матеріалу здійснюється за такою схемою: музейні → робочі → маточні культури → посівний матеріал.

1.1. Зберігання і підтримання музейних культур.

Музейні культури зберігають у холодильнику при +4 - +5 °С на живильному середовищі такого складу (г/л):

яблучнокислий натрій	2,5
сахароза	2,5
картопляний відвар (з розрахунку 200 г картоплі на 1 л води)	1000.

Показник рН середовища до стерилізації доводять до 6,8-7,0 40 %-м розчином їдкого натру. Чистота культури визначається методом штриха на агарі. Музейні культури пересівають 1 раз в три місяці.

Азотфіксувальну активність культур перевіряють 1 раз на рік. Для визначення азотфіксувальної активності бактерій *Azospirillum brasilense* проводиться висів культури на напіврідке середовище Доберейнер наступного складу (г/л):

K_2HPO_4	0,4
KH_2PO_4	0,1
NaCl	0,1
$MgSO_4$	0,1
$FeCl_3$	0,001
$NaMoO_4$	сліди
яблучнокислий натрій (або янтарнокислий натрій)	5,0
агар	3,0
рН	6,8-7,0.

Через 72 години вирощування культури посудини (пробірки або флакони) герметично закривають гумовою пробкою, вводять ацетилен в кількості 10 % від об'єму повітряної фази посудини, інкубують 24 години при $t^{\circ}=+28 - +30$ °С, після чого визначають нітрогеназну активність на газовому хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором.

1.2. Приготування робочих культур.

Робочі культури готують шляхом пересіву вихідних музейних культур. Одну пробірку, позначену першим порядковим номером, зберігають до одержання наступної партії як музейну в холодильнику за температури +2°-+7 °С. Культуру, призначену для роботи (під порядковим номером 2 і 3), розсівають у пробірки на агаризоване живильне середовище наступного складу (г/л):

яблучнокислий натрій	2,5
сахароза	2,5
картопляний відвар (з розрахунку 200 г 100 картоплі на 1 л води)	0
агар-агар	20.

Показник pH середовища після стерилізації дорівнює 6,8-7,0. Засіяні пробірки вирощують у термостаті при +28 - +30 °C протягом 2-3 діб.

1.3. Приготування маточних культур.

- 5 Культури з робочих пробірок використовуються для засіву маточних колб з рідким живильним середовищем. Зі скошеного агару клітини змивають стерильною водопровідною водою (5 мл води на пробірку). Вирощування маточних культур проводять у колбах, ємністю 750 мл з 100 мл середовища на круговій качалці з 180-200 об/хв., при +28-30° C протягом 24-48 годин. Після вирощування культуру мікроскопують, визначають чистоту методом штриха на чашках Петрі.

Склад середовища для колб (в %):

кукурудзяний екстракт	1,8-2,2
маляса	2,75-3,25
вода водопровідна	93-97.

Показник pH середовища до стерилізації доводять до 6,8-7,2 40 %-м розчином їдкого натру.

Маточні культури зберігають у холодильнику не більше 5-7 діб.

1.4. Приготування посівного матеріалу.

- 15 Вирощеною маточною культурою засівають живильне середовище в колбах з розрахунку 4-5 % до об'єму середовища (склад якого є аналогічним складу середовища для маточної культури).

Вирощування посівного матеріалу проводять у колбах ємністю 750 мл зі 100 мл середовища на круговій качалці з 180-200 об/хв. При +28 - +30 °C протягом доби.

2. Культивування в ферментерах.

- 20 У підготовлене живильне середовище в ферментерах стерильно вносять 24-годинну культуру азоспірил з розрахунку 4-6 % до об'єму середовища. Культивування проводять при +28 - +30 °C протягом 48 годин.

Після одержання бактеріальної суспензії (рідкого концентрату Діазобактерину) контролюють її чистоту мікроскопуванням та висівом методом штриха на чашках Петрі.

- 25 Зовнішній вигляд та колір Діазобактерину.

Діазобактерин являє собою живильне середовище з розмноженими у ньому клітинами азоспірил (рідкий концентрат). Колір - світло-коричневий. У 1 мл препарату міститься не менше 2 млрд. клітин бактерій.

Фізико-хімічні властивості Діазобактерину.

вміст абсолютно сухих речовин 4,5-5,5 %

щільність при 20 °C 1,016-1,020 г/см³

pH рідкого концентрату 6,5-8,5.

- 30 При застосуванні Діазобактерину для передпосівної обробки насіння озимого жита, гречки та кормових злакових трав підвищується урожайність с.-г. культур на 10-50 %, покращується якість одержаної продукції, зокрема збільшується вміст білка в зерні і поліпшується амінокислотний склад.

Можливість здійснення корисної моделі підтверджують приклади конкретного застосування біопрепарату Діазобактерину.

- 35 Приклад 1.

У табл. 1 наведено результати застосовування Діазобактерину як у випадку без внесення мінеральних добрив, так і при внесенні різних доз мінерального азоту при вирощуванні жита озимого. З представленої таблиці видно, що у варіанті без внесення добрив і з внесенням тільки Р₉₀К₉₀ застосування Діазобактерину дало змогу підвищити активність процесу фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин у 1,8-3 рази, при цьому урожайність зерна підвищилася на 5,1-5,8 ц/га (10,7-13,4 %). Найбільш ефективним є використання інокуляції по фону N₉₀Р₉₀К₉₀ з роздрібним внесенням мінерального азоту (перед посівом - 30, відновлення вегетації - 30, вихід у трубку - 30 кг/га). У цьому випадку урожайність зерна збільшилася на 9,6 ц/га або на 20 %. Застосування Діазобактерину по фону Р₉₀К₉₀ сприяє отриманню такої ж урожайності, як і за внесенням N₄₅ Р₉₀К₉₀, але без інокуляції. Отже, вплив біопрепарату в даних умовах є еквівалентним дії мінерального азоту в дозі 45 кг/га в діючій речовині. Відповідно до

цього, дозу мінерального азоту при вирощуванні жита за використання Діазобактерину можна зменшити без зниження урожайності культури. Збільшення вмісту білкового і небілкового азоту в зерні озимого жита під впливом Діазобактерину пояснюється тим, що поряд з азотфіксувальною функцією, азоспірили є також продуцентами біологічно активних сполук, під впливом яких посилюється ріст коренів, збільшується їх біомаса, а зрештою і поглинальна здатність.

Приклад 2.

Одним із важливих показників якості зерна поряд з вмістом білка є його амінокислотний склад. Сумарна кількість амінокислот у варіантах із застосуванням Діазобактерину зростала у порівнянні з контрольним варіантом на 18-40 % в залежності від норм добрив та років досліджень. Слід відмітити також істотне збільшення вмісту незамінних амінокислот - ізолейцину, лейцину, лізину, валіну, фенілаланіну, треоніну (див. рис.).

У наших дослідженнях показано, що застосування Діазобактерину сприяє збереженню посівів озимого жита від сходів до збирання. Так, наприкінці вегетації, на ділянках з інокуляцією Діазобактерином рослин озимого жита збереглося, в середньому, на 8,6 % більше, ніж у контрольному варіанті.

Таким чином, застосування Діазобактерину дозволяє суттєво посилити активність процесу фіксації молекулярного азоту в кореневій зоні рослин озимого жита, підвищити рівень загального і біологічного азоту, вміст незамінних амінокислот у зерні цієї культури, зберегти рослини від сходів до збирання і, зрештою, підвищити урожайність культури.

Приклад 3.

У таблиці 2 наведено результати досліджень ефективності Діазобактерину в технології вирощування гречки на різних сортах цієї культури. Як свідчать одержані дані, передпосівна обробка насіння гречки біопрепаратом забезпечувала суттєвий приріст урожайності зерна, який складав від 18 до 50 % в залежності від сорту. Урожайність під впливом Діазобактерину підвищується завдяки збільшенню кількості суцвіть, при цьому бактеризовані рослини гречки на 3-5 днів раніше зацвітають. У зв'язку з цим збільшується період активного формування зерна, що позначається на виповненості зернин і на загальній продуктивності.

Приклад 4.

У таблиці 3 представлено результати вивчення впливу Діазобактерину на амінокислотний склад зерна гречки. Так, у білках зерна, отриманого з бактеризованих рослин, уміст валіну зростає на 12 %, треоніну на 168 %. Суттєво підвищується також уміст замінних амінокислот - аланіну (на 28,2 %), аргініну (на 15,5 %), гістидину (на 185,9 %) і гліцину (на 3,3 %). Якщо співвідношення "незамінні/замінні" амінокислоти у контрольному варіанті становило 0,685, то у варіанті з інокуляцією - 0,709 (табл. 3). Відмічені зміни у співвідношенні амінокислот у зерні гречки при інокуляції дуже бажані, оскільки крупа є дієтичним продуктом і використовується для дитячого харчування.

Приклад 5.

У таблиці 4 представлено результати дослідження впливу Діазобактерину на урожайність пажитниці однорічної. Ефективність передпосівної бактеризації знижується в часі, за укосами зеленої маси трави (від 54 % до 6 %), проте в сумі за вегетаційний період приріст урожайності культури від застосування Діазобактерину склав 35 %.

Приклад 6.

Діазобактерин суттєво впливає на азотний метаболізм рослин пажитниці однорічної, про що свідчать результати досліджень, наведені в таблиці 5. Крім позитивного впливу на формування урожайності, біопрепарат сприяє зниженню в рослинах вмісту нітратів, які залучаються до синтезу амінокислот та білків. Відповідно до цього, в інокульованих рослинах вміст нітратів є нижчим, а білків - вищим.

Таблиця 1

Вплив Діазобактерину на урожайність
та вміст азоту в зерні озимого жита сорту Верхняцьке 32

Варіанти досліду	Урожайність, т/га	Загальний азот, %	Білковий азот, %	Активність азотфіксації, мкг азоту/м за годину
Без добрив, без інокуляції	4,34			143
Інокуляція діазобактерином	4,92			260
P ₉₀ K ₉₀ (фон)	4,76	1,07	0,85	116
Фон + інокуляція	5,27	1,58	1,23	346
Фон + N ₄₅	5,14	1,21	0,76	159
Фон + N ₄₅ + інокуляція	5,60	1,21	1,04	318
Фон + N ₉₀	4,78	1,51	0,74	178
Фон + N ₉₀ + інокуляція	5,74	1,78	1,48	285
НІР ₀₅	0,2	0,05	0,07	83,2

Таблиця 2

Ефективність інокуляції Діазобактерином різних сортів гречки

Сорти	Варіант досліду	Урожайність, ц/га	Прибавка	
			ц/га	%
Вікторія	Без інокуляції (контроль)	14,6	-	-
	Обробка насіння Діазобактерином	22,0	7,4	50,1
Галея	Без інокуляції (контроль)	11,0	-	-
	Обробка насіння Діазобактерином	13,8	2,8	25,5
НІР ₀₅		1,3		
Аеліта	Без інокуляції (контроль)	17,7	-	-
	Обробка насіння Діазобактерином	21,0	3,2	18,1
НІР ₀₅		2,6		

Таблиця 3

Вплив Діазобактерину на амінокислотний склад зерна гречки сорту Вікторія

Амінокислоти	Вміст амінокислот, нмоль/100 мг		Збільшення вмісту амінокислот, %
	контроль	інокуляція	
Незамінні, у тому числі:	101,63	99,84	-
валін	17,47	19,57	12,0
ізолейцин	13,87	9,11	-
лейцин	22,47	17,09	-
лізин	14,53	13,58	-
метіонін	7,86	6,49	-
треонін	9,98	26,81	168,6
фенілаланін	15,45	7,19	-
Замінні, у тому числі:	148,4	140,84	-
аланін	10,63	13,63	28,2
аспарагінова кислота	16,36	13,63	-
аргінін	23,17	26,77	15,5
гістидин	9,91	28,34	185,9
гліцин	15,25	15,75	3,3
глутамінова кислота	43,21	17,67	-
пролін	5,56	2,47	-
серин	16,27	16,24	-
тирозин	8,04	6,34	-
Співвідношення "незамінні/замінні"	0,685	0,709	

Таблиця 4

Вплив Діазобактерину на урожайність зеленої маси пажитниці однорічної

Укоси	Варіанти досліду	Урожайність, т/га	Приріст до контролю	
			т/га	%
1-й	Контроль	13,9	-	-
	Інокуляція	21,5	7,6	54,7
2-й	Контроль	9,3	-	-
	Інокуляція	11,9	2,6	27,9
3-й	Контроль	6,6	-	-
	Інокуляція	7,0	4	6,1
Всього	Контроль	29,9	-	-
	Інокуляція	40,4	10,5	35,1

Таблиця 5

Вплив інокуляції пажитниці на урожайність культури та особливості азотного метаболізму рослин

Варіанти досліду	Урожайність (суха маса), т/га	Вміст нітратів, мг/кг	Вміст білка, %
Контроль	4,98	340	12,4
Діазобактерин	6,15	205	13,9
HIP ₀₅	0,87		

5 Джерела інформації:

1. Патент України № 54923, МПК C05F 11/08, C12N 1/20, C12R 1/125, A01N 63/00, A01C 1/06, A01P 21/00. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва.

2. Патент України №56032, МПК C05F 11/08, C12N 1/20, C12R 1/01, C12P 19/04. Спосіб виготовлення препарату на основі азотфіксуючих бактерій-продуцентів екзополісахаридів.

3. Патент України №72856, МПК C12N 1/20, C05F 11/08, C05N 63/00, C12R 1/065, A01P 21/00, A01C 1/06. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва.

4. Патент України №48836, МПК C12N 1/20. Консорціум штамів агробактерій для виготовлення бактеріального добрива під шовковицю.

5. Патент України № 48835, МПК A01G 29/00. Спосіб підвищення урожайності листової маси шовковиці.

6. Патент України № 40548, МПК A01C 1/00, C05F 11/08. Спосіб передпосівної обробки насіння озимого жита.

7. Патент України № 40542, МПК C05F 11/08, C12N 1/20. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для виробництва бактеріального добрива під гречку.

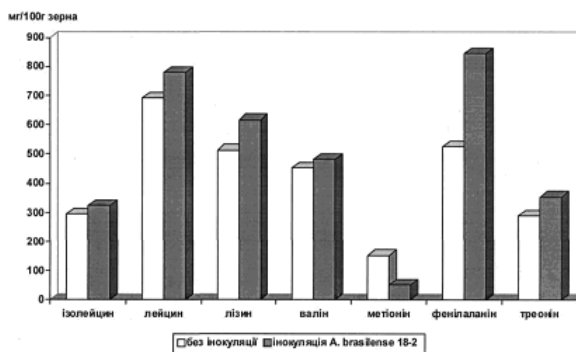
8. Волкогон В.В. Эффективность бактериализации злаковых трав азоспириллами - 1997. - 73-78.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення біологічного препарату Діазобактерину для передпосівної обробки насіння озимого жита, гречки та кормових злакових трав, що включає приготування посівного матеріалу *Azospirillum brasilense* та культивування його в ферментері, який **відрізняється** тим, що живильне середовище для вирощування азоспірил готують при наступному співвідношенні компонентів, %:

кукурудзяний екстракт	1,8-2,2
маляс	2,75-3,25
вода водопровідна	93-97,

а культивування у ферментері проводять протягом 48 годин за температури +28 - +30°C.



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601