



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105726** (13) **U**
(51) МПК
C05F 11/08 (2006.01)
C05F 11/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: а 2014 13663	(72) Винахідник(и): Волкогон Віталій Васильович (UA), Дімова Світлана Борисівна (UA), Комок Максим Сергійович (UA), Волкогон Катерина Іванівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.12.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.04.2016	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.08.2015, Бюл.№ 16	(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: 11.04.2016, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ З ОПТИМІЗОВАНИМ ВМІСТОМ ФІТОГОРМОНІВ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення мікробних препаратів з оптимізованим вмістом фітогормонів здійснюється шляхом послідовного виконання наступних етапів: приготування мікробної складової препарату; визначення вмісту фітогормонів (ауксинів і цитокінінів) у мікробній складовій препараті загальноприйнятими методами: твердофазного імуноферментного аналізу, високоефективної рідинної хроматографії, високоефективної тонкошарової хроматографії; оптимізації вмісту фітогормонів у препараті.

UA 105726 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до виробництва бактеріальних препаратів, призначених для підвищення урожайності сільськогосподарських рослин.

Як відомо, мікроорганізми формують з рослинами азотфіксуючі симбіози та асоціації. При цьому успіх передпосівної бактеризації насіння за використання бактеріальних препаратів залежить від стартових умов взаємодії інтродукованих мікроорганізмів з корінням ювенільних рослин. На цей процес як позитивно, так інгібуюче може впливати низка чинників.

Сьогодні накопичено достатньо експериментальних даних, які свідчать, що ростові речовини - фітогормони (у першу чергу ауксини та цитокініни), займають особливе місце у регуляції взаємовідносин бобових рослин та бульбочкових бактерій, а також асоціативних азотфіксаторів і злакових рослин [1-3].

Найближчим за технічною суттю аналогом, що прийнятий за прототип, є спосіб одержання бактеріального препарату комплексної дії з додаванням водної витяжки біогумусу як джерела фізіологічно активних сполук [4].

Проте вказаний спосіб потребує вдосконалення, а саме - оптимізації вмісту речовин фітогормональної природи у складі мікробних препаратів, що дозволить отримувати препарати з високою та стабільною ефективністю. Передпосівна інокуляція насіння біопрепаратами з оптимальною кількістю фітогормонів дасть можливість активізувати формування симбіозів та асоціацій мікроорганізмів з рослинами.

Задачею корисної моделі є створення способу виготовлення мікробних препаратів з оптимізованим вмістом фітогормональних речовин.

Спосіб виготовлення мікробних препаратів з оптимізованим вмістом фітогормонів здійснюється шляхом послідовного виконання наступних етапів: приготування мікробної складової препарату згідно з технічними умовами; визначення вмісту фітогормонів (ауксинів і цитокінінів) у мікробній складовій препарату загальноприйнятими методами: твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ); оптимізації вмісту фітогормонів у препараті за рахунок добору оптимального варіанту додаткового фітогормонального забезпечення.

Поставлена задача вирішується додаванням до мікробної складової необхідних фітогормонів у кількостях, що попередньо встановлюються шляхом біотестування в умовах вегетаційних дослідів.

Порівняно з розглянутим прототипом цей спосіб забезпечує оптимізацію вмісту фітогормонів у біопрепаратах і підвищує їх ефективність.

Суть корисної моделі підтверджується наступними прикладами:

Приклад 1. Ризогумін - біологічний препарат на основі бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8, застосовується для покращення азотного живлення та стимуляції росту і розвитку рослин сої. Біотестування Ризогуміну з різним вмістом індолілоцтової кислоти (ІОК) та цитокінінів (зеатинрибозид) проводили в умовах вегетаційного дослідів, за результатами якого визначали оптимальний вміст вказаних фітогормонів у біопрепараті.

Проводили передпосівну інокуляцію насіння Ризогуміном, який містив стандартну кількість бульбочкових бактерій сої і мав різний (залежно від варіанту) вміст фітогормонів. Перед закладкою дослідів перевіряли вміст зазначених фітогормонів у експериментальних партіях біопрепарату методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Культуру бульбочкових бактерій вирощували протягом трьох діб при 28 °С на мікробіологічній коливальці при 180 об./хв. на рідкому поживному середовищі такого складу, (г/дм³): сахароза - 2,0; манніт - 3,0; глюкоза - 10,0; (NH₄)₂SO₄-1,0; KH₂PO₄-0,5; K₂HPO₄-0,5; MgSO₄ × 7H₂O-0,2; CaCO₃ (стерилізований) - 0,1; (NH₄)₂MoO₄-0,05; 150 см³ люпинового відвару; рН 6,8-7,0. Для виготовлення експериментальних біопрепаратів використовували бактеріальну суспензію з титром 2×10⁹ клітин/см³.

Досліджували особливості формування та ефективність соєво-ризобіального симбіозу при використанні препаратів з додатковим фітогормональним забезпеченням від 0,55 до 18,52 мкг/г ауксинів та від 0,20 до 3,8 мкг/г цитокінінів. Контролями слугували варіанти з обробкою насіння водою та інокуляцією суспензією *B. japonicum* М 8, яка мала фоновий вміст ауксинів - 1,7 мкг/см³ та цитокінінів - 0,9 мкг/см³.

Всі експериментальні варіанти препарату забезпечували достовірний приріст кількості бульбочок у порівнянні з контролем без бактеризації (табл. 1). Водночас, найбільшою мірою на процес утворення бульбочок впливали експериментальні партії препарату з додатковим фітогормональним забезпеченням ауксинів 9,39 та 4,83 мкг/см³. У цих варіантах спостерігали збільшення кількості бульбочок на 33 % і 35 %, відповідно. Дія різних інокулянтів сприяла також достовірному збільшенню маси бульбочок (табл. 1).

- По відношенню до показників маси бульбочок у варіанті з використанням бактеріальної суспензії приріст відмічено при інокуляції препаратом, що додатково включав 4,83 мкг/см³ ауксинів і 1,08 мкг/см³ цитокинінів. При дослідженні азотфіксувальної активності симбіотичної системи встановлено, що лише три варіанти досліду із додатковим вмістом ауксинів у межах від 2,55 до 9,39 мкг/см³ і цитокинінів - від 0,61 до 2,01 мкг/см³ забезпечували достовірний приріст по відношенню до показників позитивного контролю (табл. 1). У цих варіантах досліду спостерігали збільшення нітрогеназної активності на 29 % - 50 %.

Таблиця 1

Вплив експериментальних препаратів на формування та активність соєво-ризобіального симбіозу

Варіанти досліду	Кількість бульбочок на корінні, од. / рослину	Маса бульбочок, г / рослину	Нітрогеназна активність, нмоль C ₂ H ₄ / рослину/год.
Без інокуляції, контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Суспензія В. јароіісііі М-8	17,7±2,5	0,16±0,02	324,13±50,97
Експериментальні препарати, що містять, крім суспензії В. јароіісііі М-8 з фоновим вмістом фітогормонів, додатково ауксинів/цитокинінів, мкг/см ³			
18,52/3,88	17,0±1,3	0,12±0,01	284,41±48,48
9,39/2,01	23,6±2,4	0,19±0,02	419,47±35,98
4,83/1,08	23,8±1,6	0,21±0,01	486,20±47,03
2,55/0,61	21,3±3,3	0,17±0,01	457,60±47,04
1,41/0,38	18,3±1,9	0,18±0,03	374,98±35,92
0,94/0,26	20,3±5,2	0,17±0,01	338,43±42,99
0,55/0,20	18,4±2,5	0,18±0,03	362,27±21,49

Примітка: тут і далі жирним шрифтом виділено показники, що достовірно відрізняються від контрольних

- Отже, визначення симбіотичних показників у ході тестування свідчить про позитивну дію експериментальних препаратів, що додатково містили ауксинів від 4,83 до 9,39 і цитокинінів - від 1,08 до 2,01 мкг/см³.

- При визначенні впливу експериментальних препаратів на ріст і розвиток рослин сої встановлено, що їх застосування сприяло достовірному збільшенню довжини стебел рослин сої у порівнянні з показниками рослин контрольного варіанту. По відношенню до даних варіанту з обробкою насіння бактеріальною суспензією достовірний приріст довжини стебел спостерігали за дії препаратів з додатковим фітогормональним забезпеченням у межах від 0,55 до 9,39 мкг/см³ ауксинів і від 0,20 до 2,01 мкг/см³ цитокинінів (табл. 2).

- Дослідження впливу біопрепаратів на накопичення надземної маси рослин свідчить про позитивну їх дію за додаткового забезпечення ауксинами від 4,83 до 9,39 мкг/см³ і цитокинінами - від 1,08 до 2,01 мкг/см³ (табл. 2). Дія цих інокулянтів забезпечувала приріст надземної маси на 21 % і 13 % відповідно.

При вивченні впливу експериментальних препаратів на формування маси коренів встановлено, що варіанти за цим показником достовірно не відрізнялися.

Таблиця 2

Вплив експериментальних препаратів на ріст та формування вегетативної маси рослин сої

Варіанти досліду	Висота рослин, см	Маса рослин, г/рослину	Маса коренів, г/рослину
Без інокуляції, контроль	34,0±2,6	0,84±0,04	0,18±0,06
Суспензія В. јароіісііі М-8	37,4±3,2	0,91±0,04	0,21±0,04
Експериментальні препарати, що містять, крім суспензії В. јароіісііі М-8 з фоновим вмістом фітогормонів, додатково ауксинів / цитокинінів, мкг/см ³			
18,52/3,88	41,9±3,9	0,89±0,06	0,21±0,01
9,39/2,01	48,6±5,1	1,10±0,08	0,26±0,03
4,83/1,08	52,9±4,2	1,03±0,04	0,25±0,03

Таблиця 2

Вплив експериментальних препаратів на ріст та формування вегетативної маси рослин сої

2,55/0,61	53,1±5,5	0,95±0,03	0,22±0,03
1,41/0,38	49,6±4,0	0,92±0,06	0,23±0,01
0,94/0,26	46,9±4,9	0,96±0,07	0,22±0,02
0,55/0,20	50,2±3,8	0,93±0,05	0,25±0,04

Дослідження вмісту хлорофілів у листках рослин сої свідчить про зростання вмісту хлорофілу а в усіх варіантах з інокуляцією (табл. 3). Найбільші показники спостерігали у варіанті з використанням експериментальних препаратів, що мали додаткове фітогормональне забезпечення ауксинів у межах від 2,55 до 9,39 мкг/см³ і цитокинінів - від 0,61 до 2,01 мкг/см³. У цих варіантах спостерігали перевищення контрольних показників на 20 %, 23 % та 22 % відповідно. За вмістом хлорофілу b варіанти достовірно не відрізнялися. Достовірний приріст суми хлорофілів відмічено лише у трьох варіантах з додатковим забезпеченням фітогормонів: ауксинів - від 2,55 до 9,39 мкг/см³ і цитокинінів - від 0,61 до 2,01 мкг/см³ (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив експериментальних препаратів на вміст хлорофілів а і b в листках сої

Варіанти досліджу	Хлорофіл, мг / на 100 г листової маси		
	а	б	а+б
Без інокуляції, контроль	156,37±9,08	40,52±8,94	196,89±8,74
Суспензія В. јаропісум М-8	163,74±8,60	27,64±7,27	191,38±7,74
Експериментальні препарати, що містять, крім суспензії В. јаропісум М-8 з фоновим вмістом фітогормонів, додатково ауксинів / цитокинінів, мкг/см ³ :			
18,52/3,88	170,97±9,60	38,68±17,92	209,66±8,58
9,39/2,01	188,23±4,32	32,19±4,52	220,42±8,83
4,83/1,08	192,79±4,19	36,98±19,37	229,78±19,94
2,55/0,61	190,01±6,21	36,13±14,27	226,14±10,48
1,41/0,38	179,96±9,12	30,25±15,95	210,20±24,43
0,94/0,26	167,08±7,56	36,19±4,20	203,26±5,84
0,55/0,20	176,58±8,42	42,18±10,89	218,76±20,96

Відомо, що фітогормони, особливо цитокинінової природи, підвищуючи активність ферментів азотного циклу, позитивно впливають на азотний обмін рослин. У ході тестування відзначали достовірне підвищення активності ферменту глутамінсинтетази у варіантах з інокуляцією (табл. 4). Найвищі показники активності ферменту спостерігали у варіантах із додатковим забезпеченням ауксинів від 2,55 до 9,39 мкг/см³ і цитокинінів - від 0,61 до 2,01 мкг/см³. Відповідно, в усіх варіантах з інокуляцією відмічено достовірне підвищення вмісту водорозчинного білка в листках сої у межах від 0,63 % до 1,66 % у порівнянні з контрольними показниками. Найвищі показники спостерігали при застосуванні експериментальних препаратів, які забезпечили найбільшу активність глутамінсинтетази.

Таблиця 4

Вплив експериментальних препаратів на азотний обмін рослин сої

Варіанти досліджу	Активність глутамінсинтетази, (мкмоль Р /мг/хв.)	Вміст водорозчинного білка в листках	
		мг/г	%
Без інокуляції, контроль	3,55±0,49	46,25±3,23	4,63±0,32
Суспензія В. јаропісум М-8	5,34±1,48	53,79±3,28	5,38±0,33
Експериментальні препарати, що містять, крім суспензії В. јаропісум М-8 з фоновим вмістом фітогормонів, додатково ауксинів / цитокинінів, мкг/см ³ :			
18,52/3,88	5,39±1,26	52,62±1,39	5,26±0,14
9,39/2,01	6,48±1,04	60,08±1,28	6,01±0,13

Таблиця 4

Вплив експериментальних препаратів на азотний обмін рослин сої

4,83/1,08	6,88±1,02	62,94±1,68	6,29±0,17
2,55/0,61	6,46±0,96	60,29±1,84	6,03±0,18
1,41/0,38	6,08±0,34	57,51±1,35	5,75±0,14
0,94/0,26	5,83±0,72	55,17±2,48	5,52±0,25
0,55/0,20	5,50±0,83	56,27±2,40	5,63±0,24

Проаналізовані дані свідчать, що найбільшу стимулювальну дію щодо формування та функціонування рослинно-бактеріального симбіозу виявлено за додаткового фітогормонального забезпечення експериментальних партій препаратів на рівні 4,83 мкг/см³ ауксинів та 1,08 мкг/см³ цитокінінів. У варіанті із застосуванням цього інокулянту спостерігали значне підвищення нодуляційної здатності ризобій сої, нітрогеназної активності бульбочок, активності глутамінсинтетази, вмісту суми хлорофілів та водорозчинного білка в листках дослідних рослин.

Отже, оптимізований біопрепарат, крім бактеріальної суспензії з титром 2×10^9 клітин/см³, повинен додатково містити 4,83 мкг/см³ ауксинів і 1,08 мкг/см³ цитокінінів.

Приклад 2. У вегетаційному досліді вивчали ефективність інокуляції насіння сої суспензією бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 (прототип) та цією ж суспензією в поєднанні з розчином фітогормонів (модель мікробного препарату Ризогуміну з оптимізованим вмістом фітогормонів - корисна модель). Розрахунковий вміст ауксинів (ІОК) та цитокінінів (зеатинрибозиду) в експериментальному препараті перевіряли методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Фоновий вміст фітогормонів у бактеріальній суспензії складав 1,7 мкг/см³ ауксинів та 0,9 мкг/см³ цитокінінів.

Додаткове фітогормональне забезпечення препарату знаходилося на рівні 4,83 мкг/см³ ІОК та 1,08 мкг/см³ цитокінінів (оптимізацію складу препарату за вмістом фітогормонів описано в прикладі 1). У ґрунт перед посівом вносили суміш Прянішнікова з 0,1 дози азоту, зважаючи на те, що штам *B. japonicum* М-8 здатен формувати з соєю активний бобово-ризобіальний симбіоз, який забезпечує рослини сої доступними сполуками азоту.

Дослідження, проведені протягом початкового періоду розвитку рослин сої, показали, що оптимізований за вмістом фітогормонів бактеріальний препарат має суттєво більший вплив на формування та активність соєво-ризобіального симбіозу, що підтверджено результатами, отриманими при визначенні показників кількості (фіг. 1), маси кореневих бульбочок сої (табл. 5) і їх нітрогеназної активності (фіг. 2).

Фіг. 1. Вплив біопрепаратів на нодуляційну активність сої (кількість бульбочок на коренях) (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *B. japonicum* М-8 (прототип); 3 - препарат на основі *B. japonicum* М-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

Таблиця 5

Вплив передпосівної інокуляції насіння на динаміку формування маси бульбочок сої

Варіанти дослідів	Маса бульбочок, мг/рослину		
	фаза гілкування	фаза бутонізації	фаза цвітіння
Без інокуляції, контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Препарат на основі <i>B. japonicum</i> М-8 (прототип)	67,0±6,8	199,7±15,3	276,5±11,1
Препарат на основі <i>B. japonicum</i> М-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель)	78,8±5,3	290,3±19,3	307,8±13,4

Фіг. 2. Вплив передпосівної інокуляції на нітрогеназну активність бульбочок сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *B. japonicum* М-8 (прототип); 3 - препарат на основі *B. japonicum* М-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

При дослідженні нітрогеназної активності симбіотичної системи встановлено, що застосування додаткової кількості фітогормонів забезпечило інтенсифікацію процесів симбіотичної азотфіксації.

При вивченні динаміки росту сої встановлено, що інокуляція сприяла активізації ростових процесів рослин, а застосування додаткової кількості фітогормонів інтенсифікувало наростання маси макросимбіонта у порівнянні з традиційною інокуляцією (фіг. 3).

При дослідженні активності синтезу фотосинтетичних пігментів встановлено, що у варіантах з інокуляцією достовірно збільшувався вміст хлорофілу а та загальний вміст хлорофілів у листках сої (табл. 6). Найбільший вміст хлорофілу а відмічали у варіанті з використанням оптимізованого за вмістом фітогормонів препарату. Відповідно, у цьому ж варіанті спостерігати найбільші показники загального вмісту фотосинтетичних пігментів.

Фіг. 3. Вплив передпосівної інокуляції на формування надземної маси рослин сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *V.japonicum* M-8 (прототип); 3 - препарат на основі *V.japonicum* M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

Таблиця 6

Вплив бактеризації *V. japonicum* M-8 та фітогормонів на вміст хлорофілів а і b у листках рослин сої

Варіанти досліду	Вміст хлорофілів, мг / на 100 г листової маси		
	a	b	a+b
Без інокуляції, контроль	108,6±4,8	40,3±2,7	148,9±8,78
Препарат на основі <i>V.japonicum</i> M-8 (прототип)	157,0±2,9	48,2±0,9	205,2±2,4
Препарат на основі <i>V. japonicum</i> M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель)	170,9±2,9	41,2±4,4	212,1±6,3

Забезпечення рослин сої додатковою кількістю фітогормонів активно впливало на їх азотний обмін. Встановлено, що у варіантах з інокуляцією значно зростав вміст водорозчинного білка в листках (фіг. 4). Порівняння за цим показником варіантів свідчить про стимулюючий вплив оптимізованого за вмістом фітогормонів препарату.

Фіг. 4. Вплив передпосівної інокуляції насіння на вміст водорозчинного білка в листках сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *V.japonicum* M-8 (прототип); 3 - препарат на основі *V.japonicum* M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

Отже, в ході досліджень встановлено, що додаткове фітогормональне навантаження на рівні 4,83 мкг/см³ ІОК та 1,08 мкг/см³ цитокинінів забезпечує активізацію симбіотичної взаємодії та сприяє інтенсифікації росту і розвитку рослин сої.

Таким чином, при виготовленні мікробного препарату Ризогуміну з оптимізованим вмістом фітогормонів до бактеріальної суспензії необхідно додавати таку кількість ауксинів та цитокинінів, яка б гарантувала визначене (у прикладі 1) та підтверджене (у прикладі 2) фітогормональне забезпечення препарату.

Приклад 3. Мікрогумін - біологічний препарат на основі азотфіксувальних бактерій *Azospirillum brasilense* 410, що застосовується для покращення азотного живлення та стимуляції росту і розвитку рослин ячменю ярого. Біотестування Мікрогуміну з різним вмістом ІОК та цитокинінів проводили в умовах вегетаційного досліду, за результатами дослідження визначали оптимальний вміст вказаних фітогормонів у біопрепараті.

Перед закладкою досліду перевіряли розрахунковий вміст зазначених фітогормонів у експериментальних партіях біопрепарату методом ТІФА.

Бактерії *A. brasilense* 410 вирощували протягом 3 діб при 28 °С на мікробіологічній коливальці при 180 об./хв. на рідкому поживному середовищі такого складу (г/дм³): кукурудзяний екстракт - 20; меляса - 30; вода водопровідна - 950; рН до стерилізації - 7,0.

Для виготовлення експериментальних біопрепаратів використовували бактеріальну суспензію з титром 4,0×10⁹ клітин / см³.

Вивчали вплив додаткового забезпечення бактеріальної суспензії (препарату) ауксинами і цитокинінами на накопичення маси рослин та активність азотфіксації в кореневій зоні (табл. 7).

Досліджували ефективність додаткового фітогормонального забезпечення від 1,22 мкг до 4,03 мкг ауксинів та від 0,30 мкг до 0,82 мкг цитокинінів на 1 см³ препарату. Контролями слугували варіанти з обробкою насіння водою та інокуляцією суспензією *A. brasilense* 410, яка містила фоновий вміст ауксинів - 0,75 мкг/см³ та цитокинінів - 0,22 мкг/см³.

Найвищі показники маси рослин та активності азотфіксації в кореневій зоні рослин виявлено у варіанті з інокуляцією експериментальним біопрепаратом, що мав додаткове

фітогормональне забезпечення на рівні 2,63 мкг/см³ ауксинів та 0,56 мкг/см³ цитокінінів. Отримані при тестуванні дані дають підстави вважати вказане навантаження оптимальним. Отже, оптимізований біопрепарат, крім бактеріальної суспензії з титром 4×10^9 клітин/см³, повинен додатково містити 2,63 мкг/см³ ІОК і 0,56 мкг/см³ цитокінінів.

5

Таблиця 7

Характеристика експериментальних партій Мікрогуміну і їх вплив на накопичення біомаси ячменю ярого та активність асоціативної азотфіксації

Варіанти дослідів	Вміст сухої речовини у надземній масі, г / 5 рослин	Азотфіксувальна активність, нмоль C ₂ H ₄ / 5 рослин за годину
Без інокуляції, контроль	0,51	1,8
Суспензія A. brasilense 410	0,64	40,0
Експериментальні препарати, що містять, крім суспензії A. brasilense 410 з фоновим вмістом фітогормонів, додатково ауксинів / цитокінінів, мкг/см ³ :		
4,03/0,82	0,76	34,4
3,56/0,73	0,79	105,0
3,10/0,64	0,81	213,3
2,63/0,56	0,90	223,6
2,16/0,47	0,80	94,4
1,69/0,39	0,80	65,2
1,22/0,30	0,72	43,3
HIP ₀₅	0,10	8,9

Примітка: жирним шрифтом виділено показники, що достовірно відрізняються від показників позитивного контролю (інокуляція суспензією A. brasilense 410).

Приклад 4. У вегетаційному досліді визначали ефективність передпосівної інокуляції насіння ячменю ярого бактеріальною суспензією Azospirillum brasilense 410 (мікробний препарат Мікрогумін - прототип) та цією ж суспензією в поєднанні з розчином фітогормонів (модель мікробного препарату Мікрогуміну з оптимізованим вмістом фітогормонів - корисна модель). Вміст ІОК та цитокінінів у експериментальному препараті визначали методом ТІФА.

Фоновий вміст фітогормонів у бактеріальній суспензії складав 0,75 мкг/см³ ІОК та 0,22 мкг/см³ цитокінінів. При поєднаному застосуванні суспензії A. brasilense 410 та розчину фітогормонів фітогормональне забезпечення препарату було на рівні 2,63 мкг/см³ ІОК та 0,56 мкг/см³ цитокінінів (оптимізацію складу препарату за вмістом фітогормонів виконано як і в досліді, описаному в прикладі 3). У ґрунт перед посівом вносили суміш Прянішнікова з половиною дози азоту, зважаючи на інокуляцію асоціативними азотфіксувальними бактеріями A. brasilense 410, здатними поліпшувати азотне живлення рослин ячменю.

Дослідження, проведені протягом ювенільного періоду розвитку рослин ячменю, свідчать, що сумісне застосування бактеріальної суспензії A. brasilense 410 та розчину фітогормонів має стимулюючий вплив на процес азотфіксації, що підтверджено результатами, отриманими при визначенні показників потенційної азотфіксувальної активності в ризосферному ґрунті та на коренях рослин ячменю (фіг. 5 і 6).

Фіг. 5 Вплив передпосівної інокуляції на потенційну активність азотфіксації ризосферного ґрунту ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі A. brasilense 410 (прототип); 3 - препарат на основі A. brasilense 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

У ході тестування встановлено, що оптимальне фітогормональне забезпечення препарату на рівні 2,63 мкг/см³ ІОК та 0,56 мкг/см³ цитокінінів сприяє активізації процесів асоціативної азотфіксації.

Фіг. 6 Вплив передпосівної інокуляції на потенційну активність азотфіксації на коренях ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі A. brasilense 410 (прототип); 3 - препарат на основі A. brasilense 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

При визначенні накопичення надземної та кореневої маси дослідних рослин (фіг. 7, табл. 8) встановлено, що застосування оптимізованого за вмістом фітогормонів препарату суттєво стимулює ріст рослин ячменю як у порівнянні з контролем, так і з варіантом передпосівної обробки насіння бактеріальною суспензією (без додаткової кількості фітогормонів).

Фіг. 7 Вплив передпосівної інокуляції на формування надземної маси рослин ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *A. brasilense* 410 (прототип); 3 - препарат на основі *A. brasilense* 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

Таблиця 8

Вплив передпосівної інокуляції на формування маси коренів ячменю ярого

Варіанти досліду	Маса коренів, мг		
	фаза сходів	фаза появи третього листка	фаза кущіння
Без інокуляції, контроль	11,1±0,5	38,1±1,3	77,3±4,1
Препарат на основі <i>A. brasilense</i> 410 (прототип)	13,4±0,6	43,5±2,1	84,1±2,9
Препарат на основі <i>A. brasilense</i> 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (прототип)	14,3±0,7	48,2±2,0	92,4±3,6

5

Таким чином, додаткове фітогормональне забезпечення бактеріальної суспензії на рівні 2,63 мкг/см³ ІОК та 0,56 мкг/см³ цитокінінів забезпечувало найбільшу стимуляцію процесів росту і розвитку рослин ячменю.

10 При визначенні активності денітрифікації на коренях та в ризосферному ґрунті рослин ячменю встановлено, що як застосування бактеріальної суспензії *A. brasilense* 410 (прототип), так і поєднання суспензії азоспірил з оптимальною кількістю фітогормонів (корисна модель) сприяє зниженню газоподібних втрат азоту (табл. 9 і 10). Причому поєднане застосування бактеріальної суспензії та фітогормонів забезпечувало найбільше зниження процесу денітрифікації.

15 Результати досліджень процесів азотфіксації і денітрифікації в ризосфері ячменю ярого опосередковано свідчать про те, що внесений мінеральний азот при застосуванні біопрепарату спрямовується не на забруднення довкілля, а на конструктивні потреби рослин (на розвиток рослин та формування урожаю). Таким чином, застосування бактеризації з дослідженою кількістю фітогормонів оптимізує процеси біологічної трансформації азоту в ґрунті - зростає надходження даного елемента в рослину і знижуються його непродуктивні витрати.

20

Таблиця 9

Вплив передпосівної інокуляції насіння на потенційну активність денітрифікації на коренях ячменю ярого

Варіанти досліду	Активність денітрифікації, нмоль N ₂ O/г коренів за годину		
	фаза сходів	фаза появи третього листка	фаза виходу в трубку
Без інокуляції, контроль	262,4±10,7	353,6±23,6	1136,3±40,8
Препарат на основі <i>A. brasilense</i> 410 (прототип)	247,3±13,2	321,7±17,2	1058,3±72,1
Препарат на основі <i>A. brasilense</i> 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель)	236,7±9,6	313,3±7,3	878,5±60,1

Таблиця 10

Вплив передпосівної інокуляції насіння на потенційну активність денітрифікації ризосферного ґрунту ячменю ярого

Варіанти досліду	Активність денітрифікації, нмоль N ₂ O/г ґрунту за годину		
	фаза сходів	фаза появи третього листка	фаза виходу в трубку
Без інокуляції, контроль	22,9±1,1	37,3±3,7	25,7±3,1
Препарат на основі A. brasilense 410 (прототип)	20,9±0,6	30,4±1,8	21,1±2,6
Препарат на основі A. brasilense 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель)	20,8±0,3	29,8±2,7	18,7±2,5

Стимуляція асоціативної азотфіксації та процесів росту і розвитку рослин ячменю ярого за дії додаткової кількості фітогормонів позитивно позначалася на фізіологічному стані досліджуваних рослин. Підтвердженням цього є результати визначення вмісту хлорофілів а і b в листках, як свідчення потенційної інтенсифікації процесу фотосинтезу (табл. 11). У варіантах з бактеризацією відмічали достовірний приріст вмісту як хлорофілу а, так і загального вмісту хлорофілів. Водночас, найвищі показники вмісту фотосинтетичних пігментів відмічали у варіанті з сумісним застосуванням бактеріальної суспензії та фітогормонів.

Таблиця 11

Вплив передпосівної інокуляції на вміст хлорофілів а і b у листках рослин ячменю ярого

Варіанти досліду	Вміст хлорофілів, мг / на 100 г листової маси		
	а	b	а+b
Без інокуляції, контроль	91,8±2,2	61,9±2,0	153,7±3,8
Препарат на основі A. brasilense 410 (прототип)	103,1±1,4	63,5±0,5	166,6±2,6
Препарат на основі A. brasilense 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель)	110,5±1,3	68,7±5,0	179,2±4,4

Зазначені особливості перебігу процесів біологічної трансформації сполук азоту в корневих сферах рослин ячменю ярого, а також зміни у формуванні фотосинтетичного апарату позначалися не лише на динаміці наростання надземної та кореневої маси, а й впливали на вміст білка в листках ячменю. Підвищений його вміст спостерігали у варіантах з бактеризацією (фіг. 8). Водночас, найінтенсивніше накопичення білкових сполук у листках дослідних рослин відмічали за сумісного впливу бактеріальної суспензії A. brasilense 410 та оптимальної кількості фітогормонів.

Таким чином, у вегетаційному досліді встановлено, що додаткове фітогормональне забезпечення суспензії A. brasilense 410 на рівні 2,63 мкг/см³ ІОК та 0,56 мкг/см³ цитокінінів забезпечує активізацію асоціативної азотфіксації та стимулює ріст і розвиток рослин ячменю. У варіанті із сумісним застосування бактеріальної суспензії A. brasilense 410 та фітогормонів спостерігали стимуляцію фізіологічних процесів рослин ячменю, про що свідчить зростання вмісту суми хлорофілів та водорозчинного білка в листках дослідних рослин.

Фіг. 8 Вплив передпосівної інокуляції на вміст водорозчинного білка в листках ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі A. brasilense 410 (прототип); 3 - препарат на основі A. brasilense 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (корисна модель))

Отже, для виготовлення мікробного препарату Мікрогуміну з покращеними характеристиками до бактеріальної суспензії необхідно додавати таку кількість ауксинів та цитокінінів, яка б гарантувала визначене (у прикладі 3) та підтверджене (у прикладі 4) фітогормональне забезпечення препарату.

Джерела інформації:

1. Тагиев В.Д. Влияние гетероауксина на активность и вирулентность клубеньковых бактерий люцерны // Изв. АН СССР, сер. биол. - 1965. - № 2. - С. 291-292.

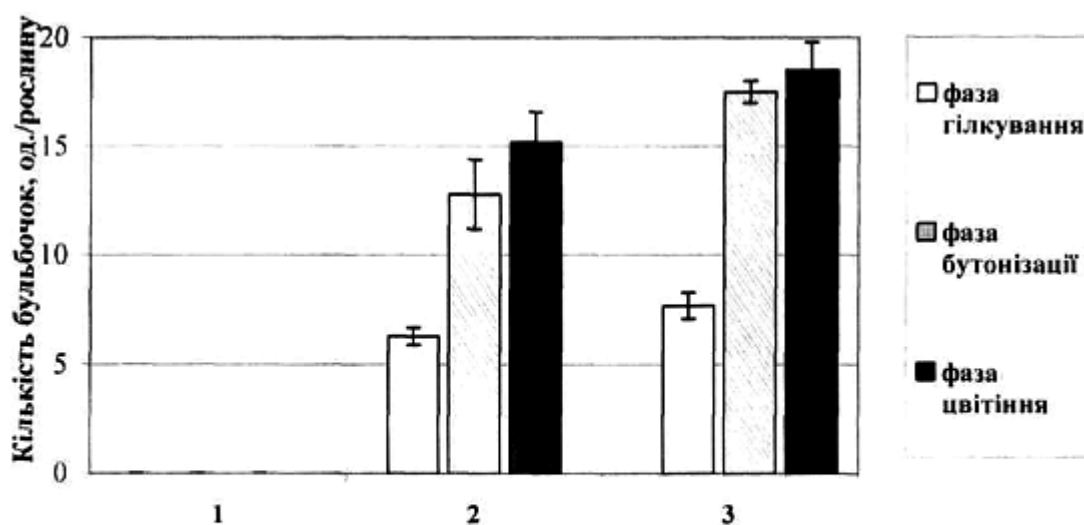
2. Волкогон В.В. Влияние стимуляторов роста растений на активность процесса ассоциативной азотфиксации // Микробиол. ж. - 1997. - 59, № 4. - С. 70-78.

3. Волкогон В.В., Дульнев П.Г., Ковтун Е.П. и др. Влияние фитогормонов и их синтетических аналогов на активность ассоциативной азотфиксации // Микробиология. - 1996. - 65, № 6. - С. 850-854.

4. Пат. 47304 Україна, МПК⁶ C05F 11/08. Спосіб одержання бактеріальних препаратів / Волкогон В.В., Лохова В.І., Носовець К.І.; заявник і патентовласник: Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН. - № 2001107418; заявл. 31.10.2001; опубл. 17.06.2002, Бюл. № 6.

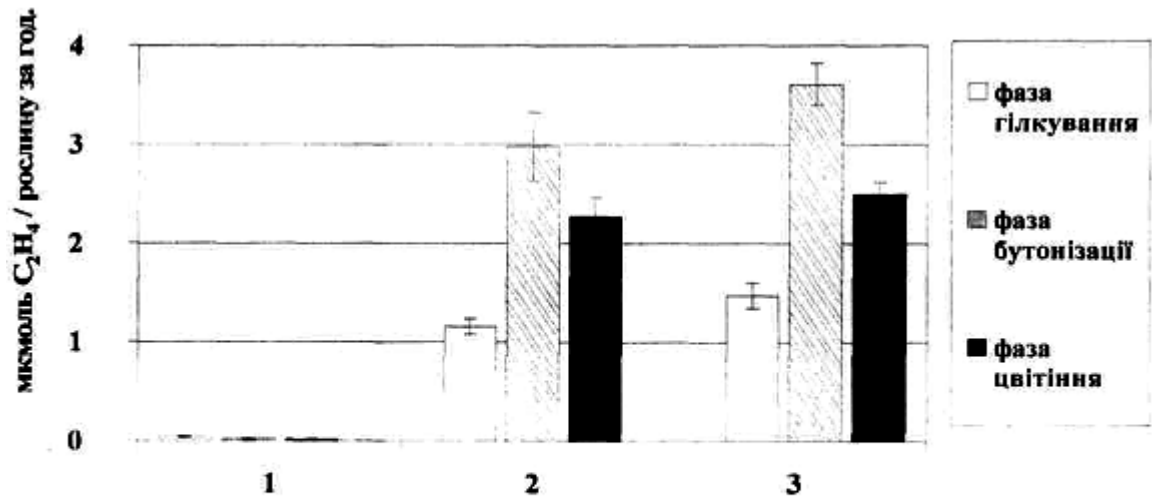
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення мікробних препаратів з оптимізованим вмістом фітогормонів, що включає приготування мікробної складової препарату, який **відрізняється** тим, що у приготовленій бактеріальній суспензії визначають вміст фітогормонів (ауксинів і цитокінінів) і штучно доводять їх концентрацію до рівня, оптимального для формування мікробно-рослинних симбіозів і асоціацій та розвитку рослин.



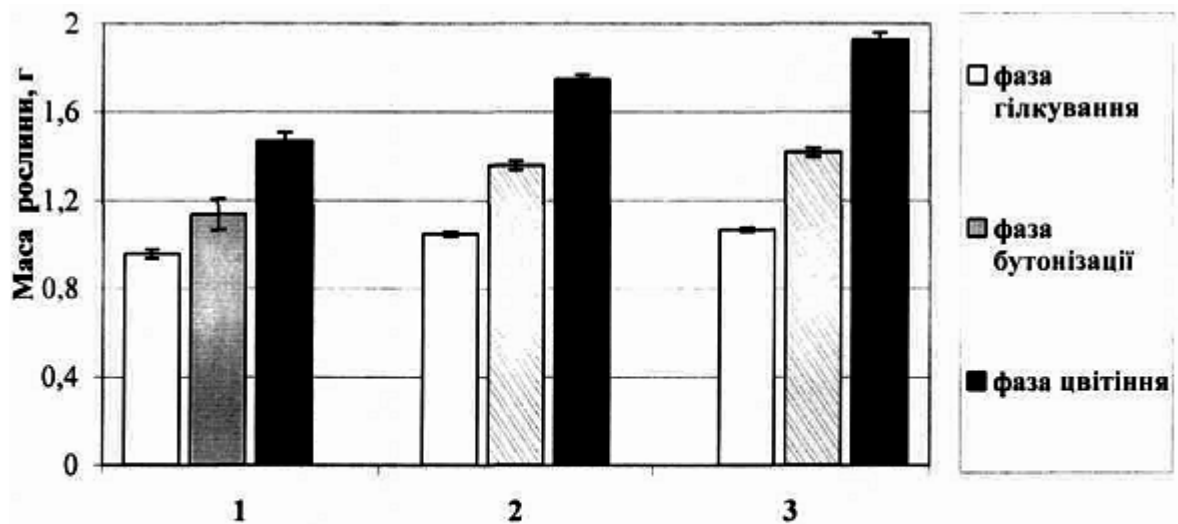
Вплив біопрепаратів на нодуляційну активність сої (кількість бульбочок на коренях) (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *V. jarrowii* M-8 (прототип); 3 - препарат на основі *V. jarrowii* M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 1



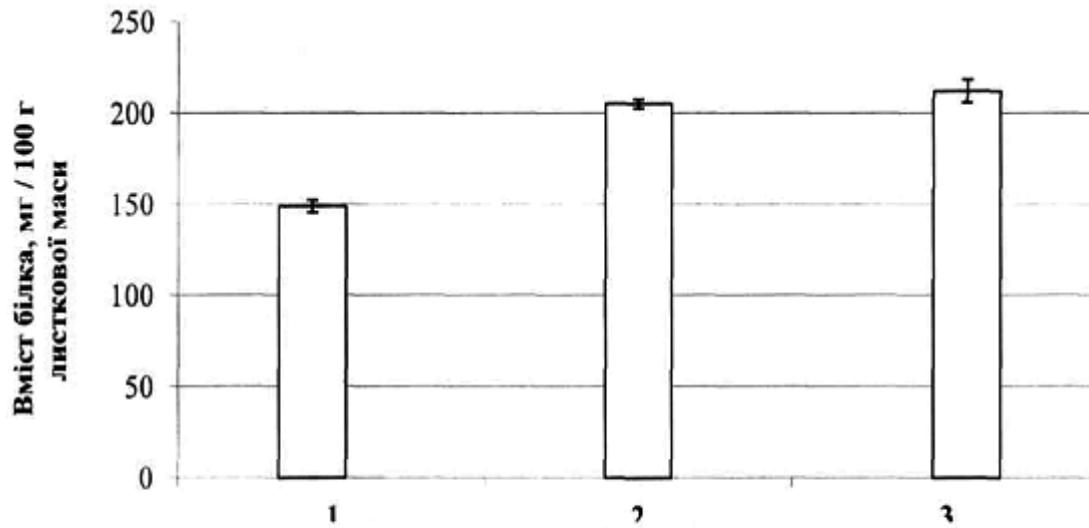
Вплив передпосівної інокуляції на нітрогеназну активність бульбочок сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *B. japonicum* M-8 (прототип); 3 - препарат на основі *B. japonicum* M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 2



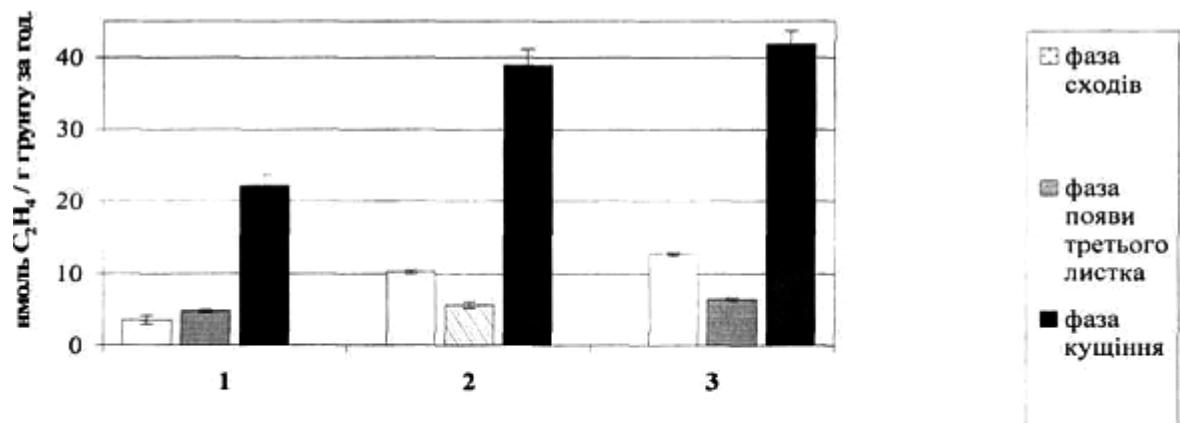
Вплив передпосівної інокуляції на формування надземної маси рослин сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *B. japonicum* M-8 (прототип); 3 - препарат на основі *B. japonicum* M-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 3



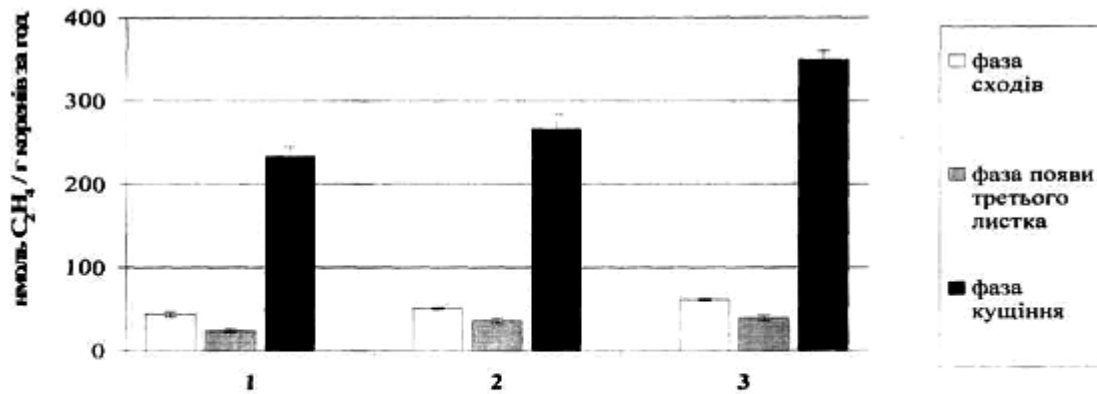
Вплив передпосівної інокуляції насіння на вміст водорозчинного білка в листках сої (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *B.japonicum* М-8 (прототип); 3 - препарат на основі *B.japonicum* М-8 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 4



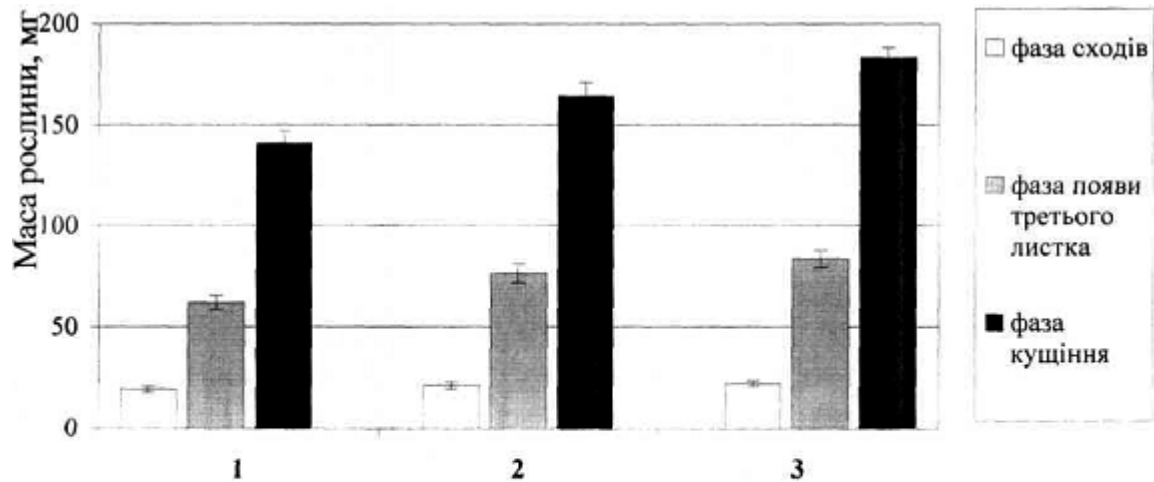
Вплив передпосівної інокуляції на потенційну активність азотфіксації ризосферного ґрунту ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *A. brasilense* 410 (прототип); 3 - препарат на основі *A. brasilense* 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 5



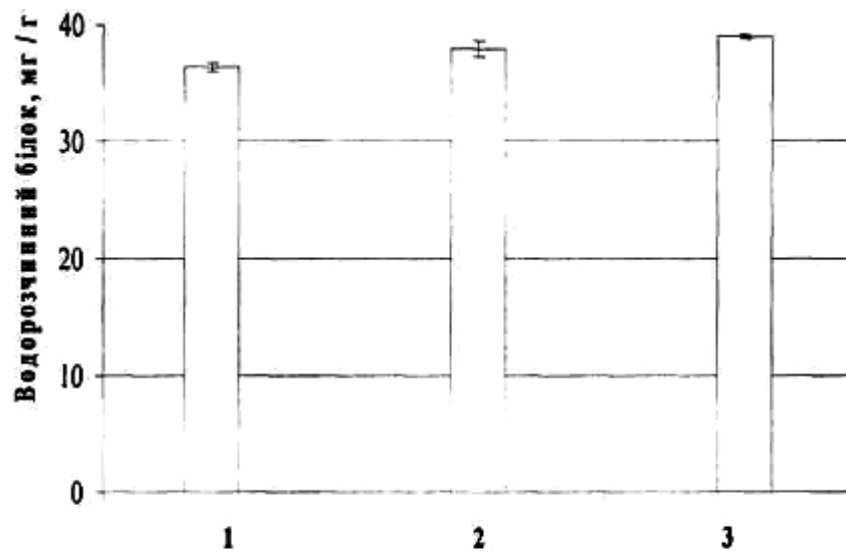
Вплив передпосівної інокуляції на потенційну активність азотфіксації на коренях ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *A. brasilense* 410 (прототип); 3 - препарат на основі *A. brasilense* 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 6



Вплив передпосівної інокуляції на формування надземної маси рослин ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *A. brasilense* 410 (прототип); 3 - препарат на основі *A. brasilense* 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Фіг. 7



Вплив передпосівної інокуляції на вміст водорозчинного білка в листках ячменю ярого (1 - без інокуляції, контроль; 2 - препарат на основі *A. brasilense* 410 (прототип); 3 - препарат на основі *A. brasilense* 410 з оптимізованим вмістом фітогормонів (винахід))

Fig. 8

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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