



УКРАЇНА

(19) UA (11) 89120 (13) C2
(51) МПК (2009)
C12N 1/00
A01C 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ БОБОВИХ РОСЛИН НА ОСНОВІ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ ТА ЛИПКОГЕНА ЕПАА

1

(21) а200806665

(22) 15.05.2008

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) ЛЕОНОВА НАТАЛІЯ ОСИПІВНА, ВОЦЕЛКО СВІТЛАНА КОСТЯНТИНІВНА, ТИТОВА ЛЮДМИЛА В'ЯЧЕСЛАВІВНА, ГЕРГАЛО ІРИНА СТЕПАНІВНА, ІУТИНСЬКА ГАЛИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ПАТИКА ВОЛОДИМИР ПИЛИПОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛІТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA U 3216912.05.2008.

UA C2 60348, 15.10.2003.

UA C2 24856, 15.10.2002.

UA C2 39774, 15.04.2004.

UA C1 26648, 11.10.1999.

Стимулятор роста и биопротектор БИОСИЛ, пестициды: ДИФЕЗАН, ГЛИСОЛ, инсектициды: ЦИТКОР, СУМИ-8. Сайт Агробизнес.ру. Знайденно в интернеті 19.08.2009, <http://agrobiznes.ru/agro/11782>, WBMachine Feb 01.2003.

Козак Н. Микробный полисахарид – ксантан. Знайденно в интернеті: http://www.polymers-money.com/journal/content/science/2006/02/24/mikrobnj_polisaharid_ksantan_2974.html.

2

Куренков В.Ф. Водорастворимые полимеры акриламида. Статьи Соросовского обозревателя журнала.Химия. 1997 г.

Булаченко Л.В. Біологічні властивості фосфат мобілізуючих бактерій і їх вплив на формування бобово-ризобіального симбіозу у рослин сої. 03.00.07-мікробіологія.- К.,2004.

Ніколаєнко І.В. Агроекологічні аспекти вирощування гороху в умовах східного лісостепу України. 03.00.16-екологія.- К., 2002.

(57) 1. Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій, яка характеризується тим, що містить суспензію бульбочкових бактерій та липкоген в об'ємному співвідношенні 1:1, причому липкоген являє собою суміш екзополісахаридполіакриламиду (ЕПАА) в кількості 30 % та екзополісахариду ксантану в кількості 70 %, де ЕПАА є співполімером, отриманим полімеризацією акриламиду і вказаного ксантану при співвідношенні компонентів 7:3 відповідно.

2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що додатково містить регулятор росту рослин.

3. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що як регулятор росту рослин містить Івін.

4. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що як регулятор росту рослин містить Біосил.

Винахід належить до мікробіології та біотехнології, а саме до мікробіологічних засобів підвищення урожайності культурних рослин і стосується підвищення якості препаратів мікробного походження, призначених для інокуляції насіння бобових рослин, з використанням композицій на основі співполімеру ЕПАА - екзополісахаридполіакриламиду.

Створення біотехнологій виробництва інокулянтів для рослинництва включає розробку прийомів, які дозволяють підвищити їх якість. Однією з необхідних вимог до якості мікробних препаратів є їх здатність зберігати високий титр біоагента протягом тривалого часу. Зміна компонентного складу середовища для зберігання мікроорганізмів може бути дієвим прийомом управління якістю і

впровадженням бактеріальних препаратів. На сьогодні інформація про вплив гелеутворюючих компонентів середовища на життєздатність *B. japonicum* в літературі відсутня.

Відомий спосіб приготування ущільнювача поживних середовищ [Патент UA 60348 C2 C12N1/20, опубл. 15.10.2003, Бюл. №10], в якому показана доцільність і ефективність заміни частини агар-агару вітчизняним препаратом ЕПАА при приготуванні щільних поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів.

Завданням даного винаходу є:

1. Створення композиції, яка б забезпечувала збереження життєздатності бульбочкових бактерій протягом 2-3 місяців.

(13) C2

(11) 89120

(19) UA

2. Створення композиції з липкогенними властивостями, яка б при нанесенні на насіння сприяла кращому закріпленню ризобій, а також утворювала плівку навколо насіння, в якій і були б закріплені самі бактерії.

Поставлене завдання досягається створенням композиції, яка складається з ЕПАА та екзополісахариду ксантану, що містить 70% ЕПС ксантану та від 1% до 30% ЕПАА.

ЕПАА - це липкоген у формі гелю (концентрація ЕПАА становить від 7,3-7,8%), та має такі характеристики: рН - 6,5-9,5, в'язкість - 134,7мПас, молекулярна маса в межах $0,05-1 \cdot 10^6$ кДа.

Отримують ЕПАА полімеризацією акриламід у водному розчині бактеріальних полісахаридів (ксантану) при співвідношенні вказаних компонентів 7:3 в присутності окисно-відновних ініціаторів [Пат UA 24856 СО 8F 120/56, опубл. 25.12.98, Бюл. №6].

Наступні приклади служать ілюстрацією винаходу.

Приклад 1.

Застосування композицій ЕПАА, як компонента поживного середовища, для збільшення життєздатності бульбочкових бактерій.

Слід зазначити, що раніше була встановлена низька ефективність ЕПС як прилиплювача, тому на його основі нами створені композиції з липкогеном ЕПАА.

В роботі використовували препаративні композиції на основі гелевих наповнювачів: природного екзополісахариду (ЕПС) ксантану, що синтезується *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, та ЕПАА, отриманих при різних співвідношеннях акриламід (АА) і полісахариду (ЕПС):

- 1) А - ЕПС;
- 2) В - ЕПАА (співвідношення АА і ЕПС складає 7:3);
- 3) С - ЕПАА (співвідношення АА і ЕПС складає 8:2);
- 4) Д - ЕПАА (співвідношення АА і ЕПС складає 1:1)
- 5) Е - 30% В + 70% ЕПС;

Як посівний матеріал, використовували 4-добову культуру бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, яку вирощували на рідкому живильному середовищі Ісварана наступного складу (г/л): NaCl - 0,1; K_2HPO_4 - 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $FeCl_3$ - 0,01; маніт - 10,0; глюконат кальцію - 1,5; дріжджовий екстракт - 2,0; рН 7,2. Титр культури визначали методом прямого підрахунку під мікроскопом.

В стерильні флакони вносили гелеві композиції ЕПАА і суспензію бульбочкових бактерій (в співвідношенні 1:1), перемішували і залишали на довготривале зберігання (1, 2, 3 місяці) при кімнатній температурі. В контрольний варіант замість гелевої композиції вносили стерильну водогінну воду.

Серед вищенаведених були визначені композиції липкогенів, які забезпечують краще виживання ризобій сої протягом 80 діб зберігання у порівнянні з контролем (рідка культура ризобій без липкогенів). Виходячи з отриманих даних (Фіг.1), найкращий результат серед варіантів із застосуванням ЕПАА, як липко гена, отриманий при використанні композиції Е.

При внесенні цієї композиції в інокулюм титр життєздатних клітин *B. japonicum* УКМ В-6035 після зберігання протягом 80 діб перевищував контроль у 2,3 рази і становив $4,2 \cdot 10^{10}$ клітин/мл. У контрольному варіанті титр життєздатних ризобій зменшувався за період зберігання у 2,7 рази.

Приклад 2.

Застосування композиції Е у поєднанні з деякими регуляторами росту рослин, як компонента поживного середовища, для збільшення життєздатності бульбочкових бактерій.

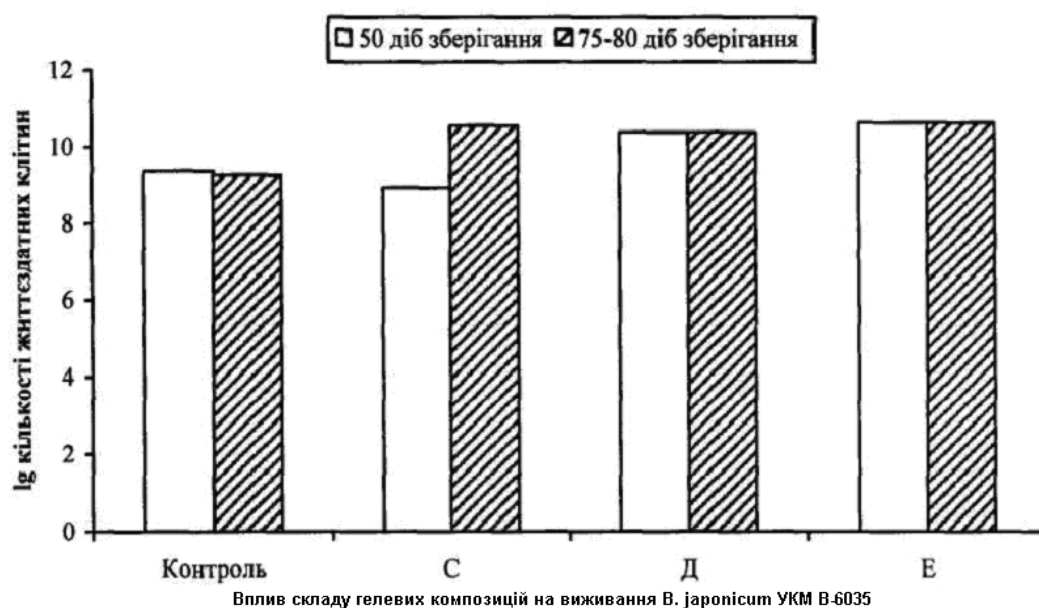
В стерильні флакони вносили вищевказану композицію Е, суспензію бульбочкових бактерій (в співвідношенні 1:1) та регулятори росту рослин Івін та Біосил у концентрації $1 \cdot 10^{-10}$ мл препарату /мл середовища. Зразки перемішували і залишали на довготривале зберігання (1, 2, 3 місяці) при кімнатній температурі. В контрольний варіант замість гелевої композиції вносили стерильну водогінну воду.

Через певні проміжки часу (50, 75-80 діб) визначали кількість життєздатних ризобій сої методом граничних розведень із наступним висівом на агаризоване середовище. Результати враховували через 7 діб.

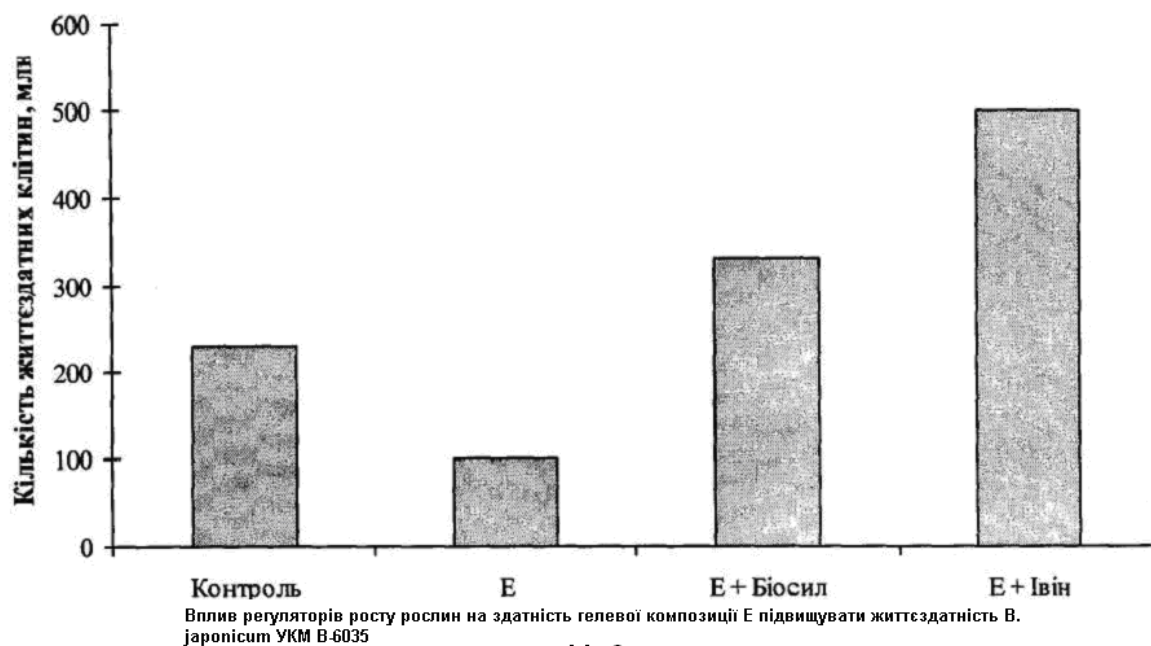
При додаванні в гелевий препарат регуляторів росту рослин Івіну та Біосилу (Фіг.2) життєздатність бульбочкових бактерій сої через 50 діб зберігання препарату перевищувала контрольний показник відповідно в 2,2 рази та 1,4 рази.

Отже, вищенаведені приклади продемонстрували, що найефективнішою для забезпечення життєздатності клітин бульбочкових бактерій виявилась композиція, яка містить 30% ЕПАА, отриманого співполімеризацією акриламід у екзополісахариду ксантану при їх співвідношенні 7:3, та 70% екзополісахариду ксантану. Перевага також віддається вказаній композиції, яка додатково містить регулятор росту рослин, вибраний з Івіну та Біосилу.

Для обробки посівного матеріалу готують робочий розчин композиції Е або композиції Е у поєднанні з Івіном або Біосилом та суспензією бульбочкових бактерій у розрахунку на 1 гектарну норму насіння. Для цього 0,6л композиції Е (або композиції Е + Івін, або композиції Е + Біосил) змішують з 0,1л культури бульбочкових бактерій. Приготовлений робочий розчин розводять питною водою до кінцевого об'єму 2л і цією суспензією обробляють 1 гектарну норму насіння.



Фіг. 1



Фіг. 2