



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58822 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A01N 63/00
C12N 1/14 (2006.01)
C05F 11/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНОГО ФІТОГОРМОНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ РОСЛИН

1

(21) u201011838

(22) 06.10.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) ДРАГОВОЗ ІГОР ВОЛОДИМИРОВИЧ, ЛЕОНОВА НАТАЛІЯ ОСИПІВНА, БІЛЯВСЬКА ЛЮДМИЛА ОЛЕКСІЇВНА, ІУТИНСЬКА ГАЛИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ЯВОРСЬКА ВІКТОРІЯ КАЗИМИРІВНА

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОННОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) 1. Спосіб отримання фітогормонального препарату, що передбачає культивування мікроорганізма-продуцента у рідкому поживному середовищі, який **відрізняється** тим, що як мікроорганізм-продуцент використовують азотфіксувальний високоефективний штам мікросимбіонтів сої *Bradyrhizobium japonicum*.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що азотфіксувальний високоефективний штам мікросимбіонтів сої *Bradyrhizobium japonicum* є вибраним з групи, що включає *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 та *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035.

Корисна модель відноситься до галузі біотехнології, а саме до мікробіологічного способу отримання фітогормонального препарату для рослин, що має рістстимулювальну активність. Зокрема, заявлена корисна модель відноситься до способу виробництва фітогормонів стимулюючої дії при використанні мікроорганізмів-продуцентів, які є азотфіксувальними високоефективними штамми мікросимбіонтів сої *Bradyrhizobium japonicum*.

Застосування рістстимулювальних препаратів на основі фітогормонів є ефективним заходом підвищення продуктивності рослин. Використання таких препаратів дозволяє цілеспрямовано корегувати найважливіші фізіологічні процеси у рослинному організмі та ефективно впливати на реалізацію генетичного потенціалу рослин. В зв'язку з цим особливо перспективними є рістрегуляторні препарати на основі природної сировини, що отримані, зокрема, шляхом мікробіологічного синтезу. При цьому мікробний синтез фітогормонів є досить перспективним способом їх високоефективного та рентабельного виробництва, що дозволяє суттєво зменшити витрати на отримання продукту та виробляти його у необхідних для рослинництва кількостях.

Як відомо, фітогормони відіграють певну роль у формуванні симбіотичних відносин між бактеріями

та рослинами, позитивно впливаючи на функціонування мікробно-рослинної системи. Ризосферні мікроорганізми синтезують широкий спектр біологічно-активних сполук, які включають сполуки фітогормональної та імунomodуючої природи, вітаміни, антибіотики, тощо. Але при цьому здатність вказаних бактерій до синтезу фітогормональних сполук, зокрема, із стимулювальною активністю, не є однаковою для різних мікроорганізмів і коливається у широких межах в залежності від виду та штамів мікроорганізму, від ефективності формування симбіотичних зв'язків.

Є відомим спосіб отримання регулятора росту рослин "Віталій" (UA43005, опубл. 15.06.2004), який передбачає культивування асоціації метанотворювальних мікроорганізмів на поживному середовищі меласній барді. Спосіб є технологічним і забезпечує отримання фітогормонального препарату при використанні відходів виробництва спирту. Основним недоліком способу є низький рівень фітогормонів-стимуляторів в кінцевому продукті.

Є відомим також спосіб отримання регулятора росту рослин при культивуванні штамів гриба-ендофіта *Cylindrocarpum magnusianum* 1MB F-100004 (UA53006, опубл. 15.01.2003) та штамів мікроміцета *Mycelia sterilia* 1MB F-100005 (UA61190, опубл. 17.11.2003). Обидва способи

(19) UA (11) 58822 (13) U

передбачають культивування зазначених штамів на рідкому поживному середовищі, відокремлення біомаси грибів від культуральної рідини шляхом центрифугування та етанольну екстракцію отриманого фільтрату. Основним недоліком описаного способу є вузький спектр фітогормонів в кінцевому продукті та невисокий рівень їх вмісту, що також обмежує можливості його використання.

Найближчим аналогом до запропонованого способу є заявка на винахід № а200901173 (дата подання 13.02.2009). У запропонованій заявці описується застосування штаму *Streptomyces avermitilis* IMB Ac-5015 для отримання фітогормонів. При цьому зазначений штам вирощують у рідкому середовищі методом глибинного культивування, після чого здійснюють етанольну екстракцію фітогормональних сполук з попередньо осадженої біомаси мікроорганізмів. Зазначений спосіб забезпечує отримання ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти. Недоліком використання вказаного штаму у способі отримання фітогормональних сполук є багаторічність здійснення способу, що зумовлює значні втрати та відносно низький вихід кінцевого продукту.

Задача запропонованої корисної моделі полягає у спрощенні способу отримання фітогормональних сполук, що не вимагає проведення етанольної екстракції, при одночасному забезпеченні отримання широкого спектру фітогормональних сполук з рістстимулювальною активністю.

Вирішення вказаної задачі забезпечується за рахунок культивування мікроорганізмів-продуцентів, а саме високоефективних азотфіксуювальних штамів мікосимбіонтів сої *B. japonicum*, на стандартному рідкому середовищі для культивування бульбочкових бактерій. При цьому у переважному втіленні корисної моделі використовують високоефективні азотфіксуювальні штам *B. japonicum* УКМ В-6018 та УКМ В-6035.

Під високоефективними азотфіксуювальними штамми розуміють такі, що характеризуються високою нодуляційною активністю, високою симбіотичною ефективністю (маса бульбочок, надземна та коренева маса), високою нітрогеназною активністю у симбіозі та високою конкурентоздатністю стосовно інших мікроорганізмів. Авторами заявленої корисної моделі було несподівано виявлено, що високоефективні азотфіксуювальні штам *B. japonicum*, на відміну від малоефективних штамів того самого виду, володіють здатністю до ефективного синтезу широкого спектру фітогормонів (ауксинів, цитокінінів гіберелінів та абсцизової кислоти) у вигляді екзометаболітів, що дає змогу використовувати культуральне середовище мікосимбіонтів як рістстимулювальний препарат для рослин без обов'язкового здійснення процедури етанольної екстракції фітогормональних сполук.

Фізико-хімічний аналіз фітогормональних сполук, які виділялися в поживне середовище в процесі культивування штамів *B. japonicum*, показав переважачу кількість сполук, які є рістстимуляторами фітогормонами, зокрема, ауксинової природи - індолілоцтової кислоти та індол-3-карбоксилової кислоти, цитокінінової природи -

зеатинрибозиду, ізопентиладенозину рибозильованого, зеатину, ізопентеніладеніну та гіберелової кислоти. Було продемонстровано, що зазначені штам *B. japonicum* переважно синтезують фітогормональні сполуки у вигляді екзометаболітів у культуральне середовище, у той час, як вміст зазначених фітогормонів у самих бактеріальних клітинах є невисоким і коливається у межах від 0,004 до 2,0 мкг/г абсолютно сухої біомаси. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що вказані фітогормони не відіграють суттєвої регуляторної та фізіологічної ролі у самих бактеріальних клітинах.

Варто зазначити високу здатність високоефективних штамів *B. japonicum* до синтезу зеатинрибозиду, який є транспортною формою цитокінінів, що, ймовірно, має певну фізіологічну доцільність при взаємодії з рослиною-господарем, оскільки відомо, що рибозилування є одним із способів інактивації цитокінінів у рослинах, при цьому їх фізіологічна активність дуже низька або повністю відсутня. І саме в такий спосіб регулюється пул ендогенних фізіологічно активних цитокінінів в рослинних тканинах.

Використані для дослідів штам *B. japonicum* високоефективних мікосимбіонтів (високоефективні штам *B. japonicum* до синтезу зеатинрибозиду, який є транспортною формою цитокінінів, що, ймовірно, має певну фізіологічну доцільність при взаємодії з рослиною-господарем, оскільки відомо, що рибозилування є одним із способів інактивації цитокінінів у рослинах, при цьому їх фізіологічна активність дуже низька або повністю відсутня. І саме в такий спосіб регулюється пул ендогенних фізіологічно активних цитокінінів в рослинних тканинах.

Використані для дослідів штам *B. japonicum* високоефективних мікосимбіонтів (високоефективні штам *B. japonicum* до синтезу зеатинрибозиду, який є транспортною формою цитокінінів, що, ймовірно, має певну фізіологічну доцільність при взаємодії з рослиною-господарем, оскільки відомо, що рибозилування є одним із способів інактивації цитокінінів у рослинах, при цьому їх фізіологічна активність дуже низька або повністю відсутня. І саме в такий спосіб регулюється пул ендогенних фізіологічно активних цитокінінів в рослинних тканинах.

Використаний у корисній моделі азотфіксуювальний штам *B. japonicum* УКМ В-6035 (UA 3324, опубл. 27.12.1994) характеризується наступними культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками: клітини 5-7 добової культури мають паличковидну форму розміром 0,3 мкм у ширину та 1,3 мкм у довжину. Клітини рухомі завдяки наявності полярного джгутика (монотрих). Культура грамнегативна, спор не утворює. Облігатний аероб. При посіві штрихом на агаризоване горохове середовище з глюкозою або манітом ріст

бактерій слабкий, штрих білуватий слизистий. За фізіологічними властивостями штам відноситься до повільнорослих бульбочкових бактерій, колонії з'являються на поверхні агару на 7-8-у добу. Мають округлу форму, випуклі, блискучі, слизисті, в діаметрі - 1,0-1,2 мм. Біля колоній на поверхні агару може утворюватись райдужний ореол. Культура пігментів не утворює, молоко з лакмусом підлугує, не пептонізуючи, желатину не розріджує. На середовищах з органічним азотом (МПА) штам не росте, але добре розвивається на поживних середовищах із солями амонію. Штам має активну нітратредуктазу і відновлює нітрати, засвоює глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, маніт, дульцит. Крохмаль не гідролізує. Сахарозу засвоює слабо. Штам має гідрогеназу (Hup⁺) і частково реутилізує енергію водню, який виділяється при симбіотичній азотфіксації у бульбочках сої. Штам не чутливий до антибактеріальної дії екстрактивних речовин з оболонок насіння ряду сортів сої. Характеризується пектиназою активністю та стійкістю до умов недостатнього зволоження та хлоридно-сульфатного засолення ґрунтів в інтервалі від 0,1 до 3,0 %. Витримує забруднення важкими металами: Pb²⁺ - до 30 ГДК; Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ - 10 ГДК, а їх сумішню - 5 ГДК.

Температурний інтервал росту штаму УКМ В-6035 - від 18 до 36 °С, температурний оптимум - 26-28 °С. Ріст бактерій спостерігається в діапазоні рН від 4,5 до 8,5. Оптимум рН - 6,5-7,5. Ознаки штаму стійкі. Він не патогенний. Культуру зберігають на манітно-дріжджовому агарі, або на бобовому агарі з манітом чи глюкозою при температурі 4-6 °С, пересіваючи 1 раз в 6 місяців.

Штам утворює на коренях сої активні бульбочки. Випробовувався на 5 сортах сої протягом 4 років. Підвищує урожай зерна сої на 2-5 ц/га. Захищений Патентом України № 3324.

Продукти, що синтезуються штамом - амоній з азоту повітря в симбіозі з хазяїном, рістстимулювальні речовини типу фітогормонів, вітаміни групи В та органічні кислоти.

Штам високоефективний, технологічний.

Генетичні особливості штаму - прототроф, чутливий до антибіотиків. При культивуванні фаголізу не виявлено.

Використаний у корисній моделі азотфіксувальний штам В. *jaronicum* УКМ В-6018 характеризується наступними культурально-морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками: клітини 5-7-добової культури штаму УКМ В-6018 мають паличковидну форму розміром 0,6-0,8 мкм в ширину та 1,2-3,0 мкм в довжину. Клітини рухомі завдяки наявності полярного джгутика (монотрих). Культура грамнегативна, спор не утворює. Облігатний аероб. При посіві штрихом на агаризоване горохове середовище з глюкозою або з манітом ріст бактерій слабкий, штрих білуватий слизистий.

За фізіологічними властивостями штам відноситься до повільнорослих бульбочкових бактерій, колонії з'являються на поверхні агару на 7-8-у добу. Вони мають округлу форму, опуклі, блискучі, слизисті, в діаметрі 1-1,2 мм. Біля колоній на по-

верхні агару може утворюватись райдужний ореол. Культура пігментів не утворює, молоко з лакмусом підлугує, не пептонізуючи, желатину не розріджує. На середовищах з органічним азотом (МПА) штам не росте, але добре розвивається на поживних середовищах із солями амонію. Штам має активну нітратредуктазу і відновлює нітрати, засвоює глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, маніт, дульцит. Крохмаль не гідролізує. Сахарозу засвоює слабо. Штам не чутливий до антибактеріальної дії екстрактивних речовин з оболонок насіння ряду сортів сої. Характеризується пектиназою активністю та стійкістю до умов недостатнього зволоження. Витримує забруднення важкими металами: Pb²⁺ - до 30 ГДК; Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ - 10-20 ГДК, а їх сумішню - 7 ГДК.

Температурний інтервал росту штаму УКМ В-6018 - від 18 до 36 °С, температурний оптимум - 26-28 °С. Ріст бактерій спостерігається в діапазоні рН від 4,7 до 8,5. Оптимум рН - 6,5-7,5. Ознаки штаму стійкі. Він не патогенний для теплокровних. Культуру зберігають на манітно-дріжджовому агарі, або на бобовому агарі з манітом чи глюкозою при температурі 4-6 °С, пересіваючи 1 раз в 6 місяців.

Штам утворює активні бульбочки на різних сортах сої. В порівнянні з еталоном дає прибавки урожаю зерна на рівні 6-15 % при одночасному збільшенні вмісту білку в урожаї на 15-27 %.

Продукти, що синтезуються штамом - амоній з азоту повітря в симбіозі з хазяїном, рістстимулювальні речовини типу фітогормонів, вітаміни групи В та органічні кислоти.

Штам високоефективний, технологічний.

Генетичні особливості штаму - прототроф, чутливий до антибіотиків. При культивуванні фаголізу не виявлено.

Запропонована корисна модель може бути проілюстрована приведеними нижче прикладами.

Приклад 1. Отримання культурального середовища штамів *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 та УКМ В-6018 та дослідження його на вміст фітогормонів.

Культивування В. *jaronicum* УКМ В-6018 та В. *jaronicum* УКМ В-6035 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл в періодичних умовах (при 220 об./хв.) та при температурі 28-30 °С, рН 6,6-7,0 протягом 72-96 годин на рідкому поживному середовищі Ісварана наступного складу(г/л): NaCl - 0,1; K₂HPO₄ - 0,5; MgSO₄·7H₂O-0,2; FeCl₃ - 0,01; маніт - 10,0; глюконат кальцію - 1,5; дріжджовий екстракт - 2,0; рН 7,2.

Для порівняння використовували малоефективний штам мікросимбіонтів сої *Bradyrhizobium japonicum* 21110, а також активні штами вільноіснуючих діазототрофів селекції ІМВ НАНУ: *Azotobacter chroococcum* УКМ-6003 та *A. chroococcum* УКМ-6082.

Отримане в результаті культивування середовище в подальшому аналізували на вміст фітогормональних сполук фізико-хімічним методом. Дані наведені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Питоме продукування ауксинів, цитокінінів та АБК у культуральне середовище бульбочковими бактеріями роду *Bradyrhizobium japonicum* та вільноіснуючими діазотрофами *Azotobacter chroococcum*

Фітогормони		Питоме продукування фітогормонів у культуральне середовище мкг/г абсолютно сухої біомаси				
		<i>B. japonicum</i> УКМВ-6018	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	<i>B. japonicum</i> 21110	<i>A. chroococcum</i> УКМВ-6003	<i>A. chroococcum</i> УКМВ-6082
Ауксини	ІОК	<8,88	>772,76	<3,84	<13,98	<29,32
	Індол-3-карбоксилова кислота	<4,60	сл.	сл.	сл.	<2,33
Цитокініни	Зеатинрибозид	<855,01	>672,55	<135,91	<73,97	<28,59
	Ізопентеніл-аденозин рибозильований	<352,44	сл.	<8,03	сл.	<0,55
	Зеатин	<345,00	<60,29	<22,02	<18,28	сл.
	Ізопентеніл-аденін	<1,71	<4,94	-	<1,42	сл.
Абсцизова кислота		<3,65	<71,88	<2,33	<10,88	<7,74

Як видно з наведених даних, високоефективні штами *B. japonicum*, що використовуються як продуценти фітогормональних сполук згідно з даною корисною моделлю, характеризуються високим вмістом фітогормонів з рістстимулювальною активністю (ауксини, цитокініни). Так, сумарна кількість фітогормонів для високоефективних штамів *B. japonicum* УКМ В-6018 та УКМ В-6035 складає ~ 1571,28 та 1582,42 мкг/г абсолютно сухої біомаси, відповідно, у той час, як у штамів, які використовуються для порівняння, цей показник коливається у межах від 68,5 до 172,13 мкг/г.

Слід зауважити, що всі досліджувані мікроорганізми були здатними продукувати гібереліни (дані не наведені) у культуральне середовище. Але порівняно з ауксинами та цитокінінами вони були присутніми у незначній кількості (не більше 7-19 мкг/г абсолютно сухої біомаси).

Приклад 2. Рістстимулювальна активність фітогормонального препарату, отриманого в результаті культивування *B. japonicum* УКМ В-6018.

Дослідження рістстимулювальної активності фітогормонального препарату згідно з корисною моделлю проводили на 6-денних проростках рослин озимої пшениці сорту Альбатрос одеський та гібриду кукурудзи Титан 220СВ, вирощених методом водної культури. Оцінку проводили у порівнянні з регулятором росту рослин "Біоагростим-екстра", що випускається ІБОНХ НАН України та МНТЦ "Агробіотех". При цьому використовували розведення культурального середовища 1:50, 1:100 та 1:300 високоефективних мікросимбіонтів сої *B. japonicum* УКМ В-6018 та УКМ В-6035. Одержані результати продемонстрували високу рістстимулювальну активність препаратів культурального середовища високоефективних штамів мікросимбіонтів сої *B. japonicum* УКМ В-6018 (Таблиця 2 та Таблиця 3) та *B. japonicum* УКМ В-6035 (дані не представлені).

Таблиця 2

Рістстимулювальна активність препарату "Біоагростим-екстра" та культурального середовища високоактивного штаму *B. japonicum* УКМ В-6018 на 6-денних проростках рослин озимої пшениці сорту Альбатрос одеський

Варіанти	Кількість пророслих зернин, шт.	Паростки			Корені		
		Загальна маса, г	Середня маса 1 паростка, г	%	Загальна маса, г	Середня маса коренів з 1 рослини, г	%
Контроль	29	1,666	0,057	100	1,069	0,037	100
Біоагростим-екстра	24	1,436	0,060	105	0,988	0,041	111
Культуральне середовище, розведення 1:50	24	1,368	0,057	100	1,176	0,049	132
Культуральне середовище, розведення 1:100	27	1,740	0,064	112	1,377	0,051	138
Культуральне середовище, розведення 1:300	25	1,568	0,063	111	1,294	0,052	141

Таблиця 3

Рістстимулювальна активність препарату "Біоагростим-екстра"
та різних розведень культурального середовища високоактивного штаму
B. japonicum УКМ В-6018 на 6-денних проростках гібриду кукурудзи Титан 220СВ

Варіанти	Кількість пророслих насінин, шт.	%	Паростки			Корені		
			Маса 50 паростків, г	Середня маса 1 паростка, г	%	Маса 50 коренів, г	Середня маса коренів з 1 рослини, г	%
Контроль	53	100	9,510	0,190	100	9,700	0,194	100
Біоагростим-екстра	67	126	9,765	0,195	103	10,213	0,204	105
Культуральне середовище, розведення 1:50	72	136	9,892	0,198	104	11,040	0,221	114
Культуральне середовище, розведення 1:100	68	128	11,975	0,239	126	9,674	0,193	99,5
Культуральне середовище, розведення 1:300	39	74	10,488	0,210	111	9,725	0,194	101

Таким чином, запропонований спосіб отримання фітогормонального препарату, який ґрунтується на використанні високоефективних штамів мікросимбіонтів сої *Bradyrhizobium japonicum*, є простим та забезпечує отримання кінцевого продукту із високим вмістом фітогормонів з рістстимулювальною активністю. Культуральні середовища зазначених штамів можна застосовувати для створення композиційних препаратів для стимуляції росту, розвитку та підвищення продуктивності

рослин. Такі препарати на основі продуктів мікробного синтезу посідають чільне місце при вирощуванні екологічно-чистої продукції рослинництва, а отримані біотехнологічні продукти є сполуками природного походження, що суттєво та актуально для потреб екологічного землеробства. Окрім того, отримані мікробіологічним шляхом препарати є менш вартісними, ніж ті, що отримані шляхом хімічного синтезу.