



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59561 (13) U  
(51) МПК  
C05F 11/08 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИРОЩУВАННЯ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ AZOTOBACTER CHROOCCOSUM T79

1

(21) u201011344

(22) 23.09.2010

(24) 25.05.2011

(46) 25.05.2011, Бюл.№ 10, 2011 р.

(72) МОРГУН ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ, КОЦЬ  
СЕРГІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ, КИРИЧЕНКО ОЛЕНА  
ВАСИЛІВНА

(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) Спосіб вирощування ярої пшениці з викорис-  
танням штаму *Azotobacter chroococcum* T79, при  
якому проводять передпосівну обробку насіння  
бактеріальним інокулянтом (рідка культура мікро-  
організмів), який **відрізняється** тим, що як бакте-  
ріальний інокулянт для передпосівної обробки  
насіння застосовують суспензію азотфіксувальних  
бактерій *Azotobacter chroococcum* T79, яка містить  
не менше  $10^8$  клітин/мл.

Корисна модель належить до сільського гос-  
подарства, зокрема, до способів використання  
мікробіологічних технологій у рослинництві, а са-  
ме, при вирощуванні ярої пшениці з метою підви-  
щення її продуктивності та збереження екологічно-  
го стану ґрунтів.

Підвищення урожайності сільськогосподарсь-  
ких культур у значній мірі залежить від забезпе-  
чення їх елементами мінерального живлення і, в  
першу чергу, азотними сполуками. Джерелом еко-  
логічно чистого біологічного азоту в ґрунті є мікро-  
організми, які здатні до фіксації молекулярного  
азоту атмосфери [1, 2]. Використання у практиці  
землеробства біологічних препаратів, які створено  
на основі азотфіксувальних мікроорганізмів є од-  
ним із технологічних прийомів підвищення урожаю  
культурних рослин, у тому числі й ярої пшениці [3-  
8].

Ґрунтові мікроорганізми, які належать до роду  
*Azotobacter* характеризуються рядом позитивних  
ефектів, серед яких визначальними є здатність до  
фіксації молекулярного азоту, синтез сполук гор-  
мональної природи, вітамінів, антибіотичних речо-  
вин [9-12]. Отже, перспективним є дослідження  
можливості використання нових штамів даних бак-  
терій у практиці рослинництва й біологічного зем-  
леробства. Нашими попередніми дослідженнями  
показана можливість застосування нового штаму  
*Azotobacter chroococcum* T79, виділеного у відділі  
симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рос-  
лин і генетики НАН України методом аналітичної  
селекції з чорноземного ґрунту Полтавської облас-  
ті, для одержання бактеріального добрива під сою  
[13].

Метою даного способу є підвищення продук-  
тивності ярої пшениці та біологічних характеристик  
ґрунту (рістстимулювальної активності, розвитку  
агрономічно корисної групи мікроорганізмів, здат-  
них до фіксації молекулярного азоту в ризосфері  
рослин) при використанні штаму *A. chroococcum*  
T79. Завдання вирішуються шляхом обробки на-  
сіння перед посівом суспензією бактерій *A.*  
*chroococcum* T79.

Спосіб, що заявляється, має наукову новизну,  
оскільки передбачає застосування штаму *A.*  
*chroococcum* T79 (суспензія бактеріальних клітин  
містить не менше  $10^8$  клітин/мл) для передпосівної  
обробки насіння, на відміну від зареєстрованих і  
дозволених для використання в Україні для іноку-  
ляції насіння зернових культур бактеріальних пре-  
паратів ризоагрин (біоагент *Agrobacterium*  
*radiobacter* 204) і ризоентерин (біоагент  
*Enterobacter aerogenes* 30) [3, 4], з метою підви-  
щення продуктивності ярої пшениці та покращення  
біологічних характеристик ґрунту, зокрема рістак-  
тивуючої здатності та чисельності агрономічно  
корисних ризосферних азотфіксувальних мікроор-  
ганізмів.

Ефективність інокуляції насіння пшениці ярої  
штамом *A. chroococcum* T79 оцінювали у вегета-  
ційних і польових дослідках.

Приклад 1. Ефективність бактеризації насіння  
пшениці ярої штамом *A. chroococcum* T79 у веге-  
таційних умовах.

Веgetаційні досліди проводили протягом 2003-  
2004 рр. у посудинах Вагнера на ґрунтовому суб-  
страті, який містив основні макроеlementи - фос-  
фор, азот, калій відповідно 0,28, 1,32, 0,81 % (2003

(19) UA (11) 59561 (13) U

р.) та 0,25, 0,28, 0,21 % (2004 р.), рН відповідно - 6,9 та 6,6. Досліди проводили при природних температурах та освітленні на вегетаційному майданчику Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Об'єктом дослідження була пшениця яра сортів Рання 93 і Колективна 3.

Культуру бактерій вирощували на живильному безазотистому середовищі Ешбі [3] при температурі 28°C протягом 3 діб. Готували інокуляційну суспензію, яка містила  $10^8$  кл/мл. Насіння дослідного варіанту за годину до посіву інокулювали суспензією *A. chroococcum* T79, контрольного варіанту - обробляли водою.

Отримані результати свідчать про позитивний вплив передпосівної бактеризації насіння обох сортів пшениці штамом *A. chroococcum* T79 на розвиток рослин і формування ними вегетативної маси (табл. 1). Максимально ефективною була дія штаму на ризогенез рослин у фазу кушіння пшениці.

Встановлено, що бактеризація насіння пшениці обох сортів *A. chroococcum* T79 сприяє підвищенню урожаю рослин (табл. 2), яке відбувається за рахунок збільшення довжини і маси колосу відповідно на 13 і 8 % та 5 і 27 %, кількості та маси зерен у колосі відповідно на 16 і 9 та 24 і 30 %, що свідчить про можливість регулювання продуктивним потенціалом рослин при використанні прийому передпосівної бактеризації насіння.

Дослідження впливу *A. chroococcum* T79 при передпосівній обробці насіння на біологічні показники ґрунту, зокрема, ристактивуючу здатність ризосферного ґрунту (табл. 3) та кількість агрономічно корисних азотфіксуючих мікроорганізмів у ризосферній зоні рослин (табл. 4) показало позитивну зміну даних показників, що свідчить про накопичення у ризосфері рослин речовин ристактивуючої дії, відсутність токсичного впливу на ґрунт бактерій-інтродуцентів і активний розвиток мікроорганізмів, здатних до фіксації молекулярного азоту.

Таблиця 1

Вплив передпосівної інокуляції насіння пшениці ярої штамом *A. chroococcum* T79 на формування вегетативної маси рослинами

Варіант	Рання 93				Колективна 3			
	надземна частина		корінь		надземна частина		корінь	
	г	%	г	%	г	%	г	%
фаза кушіння								
Контроль (вода)	1,63±0,19	100	0,28±0,04	100	1,47±0,07	100	0,30±0,02	100
<i>A. chroococcum</i> T79	2,52±0,25*	155	0,49±0,06*	175	1,57±0,07	107	0,37±0,02*	123
фаза виходу в трубку								
Контроль (вода)	8,33±0,75	100	1,42±0,03	100	2,53±0,02	100	0,90±0,03	100
<i>A. chroococcum</i> T79	11,31±0,78*	136	1,50±0,15	106	2,95±0,07*	117	0,93±0,03	103

Примітки: див. табл. 1-6: \* - різниця порівняно до контролю вірогідна ( $p < 0,05$ )

Таблиця 2

Структура урожаю пшениці ярої за умов передпосівної інокуляції насіння штамом *A. chroococcum* T79

Варіант	Довжина колосу		Маса колосу		Кількість зерен у колосі		Маса зерен у колосі	
	см	%	г	%	штук	%	г	%
	сорт Рання 93							
Контроль (вода)	6,2±0,2	100	1,27±0,04	100	22,0±1,1	100	0,86±0,04	100
A. chroococcum T79	7,0±0,1*	113	1,37±0,03	108	25,5±1,5*	116	0,94±0,08	109
	сорт Колективна 3							
Контроль (вода)	6,1±0,1	100	0,52±0,01	100	11,4±0,2	100	0,40±0,01	100
A. chroococcum T79	6.4±0.1	105	0.66±0.02*	127	14.1±0.4*	124	0.52±0.02*	130

Таблиця 3

Вплив бактеризації насіння пшениці штамом  
A. chroococcum T79 на чисельність азотфіксувальних мікроорганізмів у ризосферній зоні рослин

Варіант	сорт Рання 93							
	фаза розвитку рослин							
	кущіння		виходу в трубку		молочно-воскової стиглості зерна		повної стиглості зерна	
	10 <sup>9</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%
Контроль (вода)	9,1 ± 0,9	100	24,7 ± 0,9	100	66,9 ± 1,6	100	1,5 ± 0,1	100
A. chroococcum T79	12,9 ± 0,9*	142	33,2 ± 1,7*	134	79,0 ± 13,0	118	1,7 ± 0,1	113
	сорт Колективна 3							
	фаза розвитку рослин							
	10-денні сходи		кущіння		трубкування - початок колосіння		повної стиглості зерна	
	10 <sup>10</sup> кл/мл	%	10 <sup>12</sup> кл/мл	%	10 <sup>12</sup> кл/мл	%	10 <sup>9</sup> кл/мл	%
Контроль (вода)	38,3 ± 2,4	100	11,9 ± 1,2	100	12,4 ± 1,0	100	48,8 ± 6,7	100
A. chroococcum T79	94,6 ± 6,0*	247	15,8 ± 2,0	133	16,3 ± 0,4*	131	87,9 ± 9,6*	180

Таблиця 4

Вплив інокуляції насіння пшениці ярої A. chroococcum T79  
на ріст активуючу здатність ризосферного ґрунту (тест-об'єкт - крес-салат)

Варіант	сорт Рання 93				сорт Колективна 3			
	Довжина проростка		Маса проростка		Довжина проростка		Маса проростка	
	мм	%	мг	%	мм	%	мг	%
	фаза кущіння							
Контроль (вода)	28,4 ± 0,4	100	10,4 ± 0,2	100	27,7 ± 1,5	100	7,5 ± 0,5	100
A. chroococcum T79	26,5 ± 0,7	93	11,0 ± 0,1*	106	37,9 ± 3,7*	137	11,6 ± 1,4*	155
	фаза трубкування - початку колосіння							
Контроль (вода)	45,7 ± 0,5	100	19,7 ± 0,5	100	69,7 ± 2,7	100	13,0 ± 1,3	100
A. chroococcum T79	47,9 ± 0,4*	105	20,5 ± 0,1	104	84,9 ± 2,6*	122	23,3 ± 1,0*	179
	фаза молочно-воскової стиглості зерна							
Контроль (вода)	55,2 ± 1,2	100	22,8 ± 1,3	100	-	-	-	-
A. chroococcum T79	57,8 ± 1,0	105	23,9 ± 1,0	105	-	-	-	-
	фаза повної стиглості зерна							
Контроль (вода)	73,0 ± 3,5	100	29,2 ± 0,7	100	53,0 ± 0,7	100	15,5 ± 0,6	100
A. chroococcum T79	80,8 ± 2,6*	ПО	30,6 ± 1,0	105	60,5 ± 0,9*	114	18,0 ± 0,5*	116

Примітка: "-" - визначення не проводили

Приклад 2. Оцінка ефективності передпосівної бактеризації насіння пшениці ярої штамом A. chroococcum T79 у польових умовах.

Польові дослідження проводили на базі науково-виробничого відділу Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (смт. Глеваха, Київська обл.) на світло-сірому опідзоленому легкосуглинковому ґрунті. Площа дослідних ділянок становила 10 м<sup>2</sup>. Об'єктом дослідження була пшениця яра сорт Рання 93.

Ефективність дії бактеріального добрива на основі A. chroococcum T79 порівнювали з бактеріальним препаратом ризоагрин (біоагент Agrobacterium radiobacter 204), зареєстрованим і дозволеним для виробництва і використання в Україні, зокрема для бактеризації насіння пшениці.

Культури A. chroococcum T79 і A. radiobacter 204 вирощували на рідких живильних середовищах Ешбі та манітно-дріжджовому агарі [3] відповідно протягом 3 діб у колбах-качалках при 160 об/хв. і температурі 28°C. Бактеризацію насіння проводили перед посівом у дозі 100 мл суспензії мікроорганізмів на гектарну норму насіння при титрі культури не менше як 10 кл/мл. У контрольному варіанті насіння обробляли водою.

Показано (табл. 5), що дослідні рослини (інокуляція азотобактером) характеризувались інтенсивним ростом і формуванням вегетативної маси, яка перевищувала контроль на 48 і 23 %. Азотфіксувальна активність при цьому лише на 16 і 11 % була більшою за контроль, що може вказувати на більш суттєву дію даного штаму як продуцента

біологічно активних речовин (гормонів, вітамінів, тощо), що здійснюють пряму гормональну дію на рослини. Максимальний ефект бактеризації насіння азотобактером порівняно до агробактерій відмічено у фазу трубкування рослин. Різниця за показниками надземної маси рослин і азотфіксувальної активності ризосферних мікроорганізмів між двома дослідними варіантами становила 37 і 14 % відпо-

відно. Інокуляція насіння *A. radiobacter* 204 порівняно до *A. chroococcum* T79 забезпечила активний розвиток рослин і функціональну здатність ризосферного мікробного комплексу у фазу колосіння пшениці: різниця за показниками надземної маси рослин і азотфіксувальної активності мікроорганізмів становила відповідно 24 і 22 % (табл. 5).

Таблиця 5

Вплив передпосівної бактеризації насіння пшениці ярої сорту Рання 93 штамом *Azotobacter chroococcum* T79 на формування надземної маси рослин і нітрогеназну активність ризосферних мікроорганізмів

Варіант	Маса надземної частини рослини		Нітрогеназна активність ризосферних мікроорганізмів	
	г	%	нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (рослину·годину)	%
	фаза виходу в трубку			
Контроль	2,08±0,20	100	0,68±0,11	100
<i>A. chroococcum</i> T19	3,08±0,25*	148	0,79±0,03	116
<i>A. radiobacter</i> 20 A	2,31±0,20	111	0,69±0,06	102
Варіант	Маса надземної частини рослини		Нітрогеназна активність ризосферних мікроорганізмів	
	г	%	нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (рослину·годину)	%
	фаза колосіння			
Контроль	3,35±0,46	100	0,79±0,04	100
<i>A. chroococcum</i> T79	4,12±0,39	123	0,88±0,06	111
<i>A. radiobacter</i> 204	4,91±0,47*	147	1,05±0,13*	133

Результатом позитивного впливу передпосівної бактеризації насіння пшениці ярої сорту Рання 93 штамом *A. chroococcum* T79 стало підвищення зернової продуктивності: урожай зерна збільшився на 9,2 % порівняно до контролю, що становило 2,98 ц/га і на 14,1 % або 4,38 ц/га порівняно до варіанту з використанням *A. radiobacter* 204 (табл. 6). Урожай у варіанті з застосуванням для перед-

посівної інокуляції насіння пшениці *A. radiobacter* 204 знаходився на рівні контролю, однією з причин чого може бути низький рівень азотфіксувальної активності ризосферних мікроорганізмів і накопичення рослинами маси у фазу трубкування пшениці коли відбувається закладка генеративних органів рослин.

Таблиця 6

Урожай пшениці ярої сорту Рання 93 за умов передпосівної бактеризації насіння (пряме комбайнування)

Варіант	Урожай, ц/га	Прибавка урожаю			
		ц/га		%	
		до контролю	до <i>A. radiobacter</i> 204	до контролю	до <i>A. radiobacter</i> 204
Контроль	32,53	0	+1,4	0	+5
<i>A. chroococcum</i> T79	35,51*	+2,98	+4,38	+9,2	+14,1
<i>A. radiobacter</i> 204	31,13	-1,4	0	-5	0
HCP <sub>0,05</sub>		2,71			

Таким чином, результати вегетаційних і польових досліджень вказують на перспективність використання нового штаму *A. chroococcum* T79 для передпосівної обробки насіння ярої пшениці з метою підвищення урожаю рослин і збереження та поліпшення родючості ґрунту.

Джерела інформації:

1. Черемисов Б.М. О быстром переходе мирового земледелия на биологическую фиксацию азота атмосферы (концепция БАРС) // Вест. Рос. акад. с.-х. наук. - 2006. - № 2. - с. 39-41.

2. Умаров М.М. Азотфиксация в биосфере и биотехнологический потенциал диазотрофов // Бюл. Моск о-ва испыт. природы, отд. биол. - 2007. - 112, прил. 1. - с. 150-155.

3. Патица В.П. Стан і перспективи досліджень мікробної азотфіксації // Онтогенез рослин, біоло-

гічна фіксація молекулярного азоту та азотний метаболізм. Тернопіль, 2001. с. 111-115.

4. Смірнов В.В., Патица В.П., Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Антипчук Л.Ф. Мікробні біотехнології в сільському господарстві // Агроекологічний журнал. 2002. № 3. с. 3-9.

5. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В., Шерстобоева О.В., Мельничук Т.М., Калініченко А.В., Гриник І.В. Біологічний азот. Київ: Світ, 2003 424 с.

6. Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М. та ін. Мікробні препарати у землеробстві: теорія і практика. - К.: Аграрна наука, 2006. - 312 с.

7. Тихонович І.А., Круглов Ю.В. Биопрепараты в сельском хозяйстве (методология и практика использования микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). - М.: Россельхозакадемия, 2005. - 154 с.

8. Salantur A, Ozturk A., Akten S. Growth and yield response of spring wheat to inoculation with rhizobacteria // *Plant Soil and Environment*. 2006. 52, N3. P. 111-118.

9. Burgmann H., Meier S., Bunge M., et al. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community // *Environ. Microbiol.* 2005. - 7, N 11. - P. 1711-1724.

10. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцев Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы - продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2006. - 42, № 2. - с. 133-143.

11. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцев Т.А., Нетрусов А.И. Гормоны и гормоноподобные

соединения микроорганизмов // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2006. - 42, № 3. - с. 261-268.

12. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко О.В. Рост-стимулирующие ризобактерии и их практическое применение // *Физиология и биохимия культур. растений*. - 2009. - 41, № 3. - с. 187-207.

13. Коць С.Я., Титова Л.В., Кириченко С.В., Омельчук С.В., Жемойда А.В. Штам бактерій *Azotobacter chroococcum* T79 для одержання бактеріального добрива під сою Патент України на винахід № 62820A C05F11/08, C12N1/20. 15.12.2003., Бюл. № 12.