



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 107857

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 04311
(22) Дата подання заявки: 05.04.2013
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2015
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.10.2014, Бюл.№ 19
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2015, Бюл.№ 4
(72) Винахідник(и):
Козар Сергій Федорович (UA),
Усманова Тетяна Оскарівна (UA),
Євтушенко Тетяна Анатоліївна (UA)

(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА
АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Чернігівська
обл., 14027 (UA)
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 5292507, 08.03.1994
D. C. Jordan. NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. IJSEB, Jan.1982, p.136-139
Inoculant for Biofertilizers. NCA Biofertilizer Project Group. March 2006. Знайдено в Інтернет 26.03.2014: [онлайн]
http://www.fnca.mext.go.jp/english/bf/bfm/pdf/4_1_Rhizobium0414.pdf WB-Machine 06.01.2013
Panlada Tittabutra, Waraporn Payakaponga, Neung Teaumroonga, Paul W. Singletonb, Nantakorn Boonkerd. Growth, Survival and Field Performance of *Bradyrhizobial* Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. ScienceAsia 33 (2007): 69-77

(54) СПОСІБ ПІДТРИМАННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

(57) Реферат:

Винахід належить до способу підтримання життєздатності *Bradyrhizobium japonicum*, що включає приготування поживного середовища з добавкою-стабілізатором, його стерилізацію та культивування бульбочкових бактерій сої в приготованому середовищі, де як добавку-стабілізатор використовують альгінат натрію та культивують у ньому *Bradyrhizobium japonicum* в умовах періодичного культивування.

UA 107857 C2

Винахід належить до галузі сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до способів підтримання життєздатності *Bradyrhizohium japonicum* та може бути використаний при виготовленні бактеріальних препаратів, які застосовуються в технологіях вирощування сої.

Відомо, що штами *Bradyrhizohium japonicum* [1-4] використовуються при виготовленні мікробних препаратів для передпосівної обробки сої [5].

Найбільш близьким до винаходу аналогом, що прийнятий за прототип є рідкий бактеріальний інокулянт для бактеризації насіння сої [5].

Проте термін зберігання вітчизняних рідких препаратів на основі бульбочкових бактерій, які адаптовані до ґрунтово-кліматичних умов України, становить 20 діб, що в декілька разів менше у порівнянні з порошкоподібними на основі торфу.

В основу винаходу поставлено задачу подовжити термін зберігання рідкого інокулянту до 4-5 місяців (при титрі не меншому 1 млрд. кл./мл препарату), при цьому забезпечивши високу функціональну активність *Bradyrhizohium japonicum*.

Поставлена задача вирішується шляхом культивування *Bradyrhizohium japonicum* у середовищі, в яке вноситься добавка-стабілізатор.

Спосіб підтримання життєздатності *Bradyrhizohium japonicum* складається з наступних етапів:

- 1) приготування рідкого поживного середовища для вирощування *Bradyrhizohium japonicum*;
- 2) внесення в рідке поживне середовище добавки-стабілізатора альгінату натрію (АН) в кількості від 0,1 до 0,3 % від об'єму середовища;
- 3) стерилізація поживного середовища з альгінатом натрію за температури 120° С упродовж 30 хвилин;
- 4) культивування *Bradyrhizohium japonicum* у приготованому стерильному поживному середовищі зі стабілізатором в умовах періодичного культивування за температури 28±2 °С упродовж 72 годин.

Даний спосіб забезпечує збереження життєздатності *Bradyrhizohium japonicum* та підтримання їх функціональної активності впродовж 4-5 місяців, а також формування більш активного рослинно-ризобіального симбіозу і збільшення урожайності у порівнянні з прототипом, який зберігався 4 місяці.

Суть винаходу пояснюється такими прикладами.

Приклад 1.

Бактерії *Bradyrhizohium japonicum* М-8 культивували в рідкому поживному середовищі наступного складу, мас. %: відвар насіння гороху - 10,0, глюкоза - 1,0, сахароза - 0,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,1, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05, K_2HPO_4 - 0,05, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02, CaCO_3 - 0,03, вода дистильована до 100. В поживне середовище вносили альгінат натрію (АН) в таких концентраціях: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 % (Фіг. 1).

Встановлено, що при культивуванні бульбочкових бактерій з АН у концентрації від 0,1 % до 0,3 %, їх чисельність була достатньою для виготовлення рідких бактеріальних препаратів. Збільшення вмісту стабілізатору в поживному середовищі до 0,5 % призводило до істотного зниження титру мікроорганізмів.

Приклад 2.

Життєздатність ризобій, культивованих у поживному середовищі з альгінатом натрію перевіряли протягом п'яти місяців. Для прикладу використовували різні штами: *Bradyrhizohium japonicum* М-8 і *Bradyrhizohium japonicum* 634 б. Встановлено, що титр бульбочкових бактерій сої, культивованих без альгінату натрію, вже через 3 місяці був нижче 1,0 млрд. кл./мл (Фіг. 2).

Через місяць зберігання культури, титр *Bradyrhizohium japonicum* 634б, культивованих без альгінату натрію, на 10 % був вищим, ніж у варіанті зі стабілізатором (Фіг. 3). Після другого місяця зберігання альгінат натрію сприяв кращій збереженості бульбочкових бактерій: чисельність життєздатних клітин у цьому варіанті перевищувала контроль на 22 %. При подальшому зберіганні культури *Bradyrhizohium japonicum* 634б за використання альгінату натрію, титр бактерій знижувався повільніше, ніж без нього: через 4 місяці зберігання чисельність ризобій у контрольному варіанті була нижче 1,0 млрд. кл. /мл, за використання стабілізатору титр мікроорганізмів був вище 1,0 млрд. кл. /мл на два місяці довше.

Приклад 3.

Вплив інокулянту, отриманого пропонованим способом на нодуляційну активність і ефективність *Bradyrhizohium japonicum* вивчали в польових дослідах. Встановлено, що у фазі стеблуння найбільше бульбочок утворилось у варіантах із бактеризацією *Bradyrhizohium japonicum*, культивованих у середовищі з АН (табл. 1), у фазі цвітіння - у варіанті з бактеризацією свіжеотриманою культурою ризобій, вирощених без стабілізатора (але цей показник істотно не відрізнявся від варіантів з АН), у фазі наливу бобів - у варіанті з

- бульбочковими бактеріями, культивованими з АН (зберігання 4 місяці). Маса бульбочок у фазах стеблуння, цвітіння і наливу бобів була найвищою за обробки насіння сої свіже отриманою культурою *B. japonicum*, вирощеними з АН. У всі фази розвитку рослин варіант із бактеризацією бульбочковими бактеріями через 4 місяці зберігання не поступався за чисельністю свіже отриманій культурі без стабілізатора.

Таблиця 1

Вплив бактеризації на утворення бульбочок на коренях рослин сої сорту Полтава та їх азотфіксувальну активність, польовий дослід

Варіанти	Фази вегетації рослин		
	стеблуння	цвітіння	наливу бобів
1	2	3	4
Кількість бульбочок на коренях рослин сої, од./рослину			
Контроль - без бактеризації	0	0	0
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип)	5,7	60,1	71,5
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії)	7,0	66,1	80,6
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип), зберігання 4 місяці	2,8	41,9	43,1
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії), зберігання 4 місяці	6,9	67,2	79,1
Маса бульбочок на коренях рослин сої, мг/рослину			
Контроль - без бактеризації	0	0	0
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип)	291,1	1616,9	6844,9
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії)	315,4	1926,9	6286,9
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип), зберігання 4 місяці	159,1	848,6	4199,8
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії), зберігання 4 місяці	288,3	1774,1	7147,3

Продовження таблиці 1

1	2	3	4
Азотфіксувальна активність, мкг N / рослину			
Контроль - без бактеризації	0	0	0
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип)	1,53	8,77	5,5
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії)	1,43	9,63	4,05
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип), зберігання 4 місяці	0,47	5,2	2,37
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії), зберігання 4 місяці	1,37	11,57	5,37

Приклад 4.

- 10 Вплив бактеризації на врожайність сої вивчали в польових умовах. У польових дослідках було перевірено ефективність передпосівної бактеризації сої бактеріями, культивованими в середовищі з АН та без нього (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив передпосівної бактеризації на врожайність зерна сої, польовий дослід

Варіанти дослідів	Урожайність, т/га	Приріст урожайності	
		т/га	%
Контроль - без бактеризації	1,83	-	-
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип)	3,41	1,58	87
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії)	3,35	1,52	83
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (прототип), зберігання 4 місяці	2,12	0,29	16
Бактеризація <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (інокулянт із подовженим терміном дії), зберігання 4 місяці	3,36	1,53	84

У результаті проведених досліджень встановлено позитивний вплив передпосівної обробки насіння сої на врожайність рослин: бактеризація насіння культурою *B. japonicum* з АН сприяла збільшенню врожайності рослин до 84 %.

Джерела інформації:

1. Пат. 39545 Україна, МПК (2006) 7 C 12 N 1/20, C 05 F 1/08. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* M-8 KIRCHNER, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої / Толкачов М. З., Патица В. П., Каменева І.О., Грітчина Л.Ю.; заявник і патентовласник Південний філіал Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук.-2000105680, заявл. 06.10.2000; опубл. 15.06.2001, бюл. №5.-5 с.

2. Пат. 36700 Україна МПК (2006) C12N1/19, C05F11/00. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* 36, активний симбіотичний азотфіксатор, який підвищує урожайність сої і рекомендований для приготування бактеріальних препаратів / Толкачов М.З., Дідович СВ., Абдурашитов С.Ф.; заявник і патентовласник Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук. -№ u 200803755; заявл. 25.03.2008; опубл. 10.11.2008, бюл. № 21.-4 с.

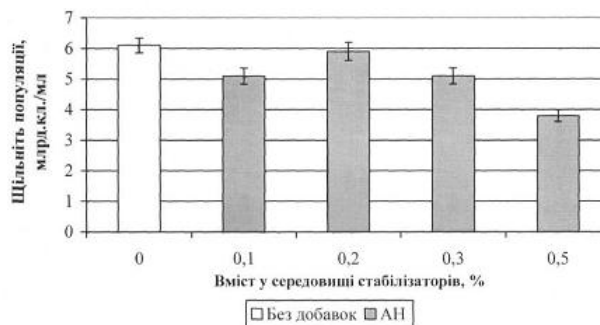
3. Пат. 85943 Україна МПК (2009) C12N1/20, C05F11/08, C12R1/01. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* для одержання бактеріального добрива під сою / Ковалевська Т.М., Надкернична О.В., Крутило Д.В., Горбань В.П.; заявник і патентовласник Інститут сільськогосподарської мікробіології Української академії аграрних наук. - № а 200803755; заявл. 25.06.2007; опубл. 10.03.2009, бюл. №5.-4 с.

4. Пат. 64086 Україна МПК C05F11/08, C12N1/20. Штам бактерій *Bradyrhizobium japonicum* T21-2 (1МВ В-7322) для одержання бактеріального добрива під сою / Коць С.Я., Воробей Н.А., Мащенко П.М., Маліченко СМ., Якимчук Р.А.; заявник і патентовласник Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії аграрних наук. - №и 201104725; заявл. 18.04.2011; опубл. 25.10.2011, бюл. № 20.-5 с.

5. Методологія і практика використання мікробних препаратів у технологіях вирощування сільськогосподарських культур / [В.В. Волкогон, А.С. Заришняк, І.В. Гринник та ін.]. - К.: Аграр. наука, 2011.-156 с.

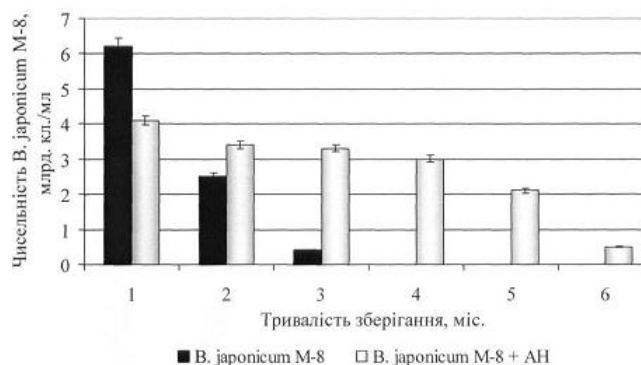
ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Спосіб підтримання життєздатності *Bradyrhizobium japonicum*, що включає приготування поживного середовища з добавкою-стабілізатором, його стерилізацію та культивування бульбочкових бактерій сої в приготованому середовищі, який **відрізняється** тим, що як добавку-стабілізатор використовують альгінат натрію у кількості від 0,1 до 0,3 % від об'єму середовища та культивують у ньому *Bradyrhizobium japonicum* в умовах періодичного культивування за температури 28±2 °С упродовж 72 годин.



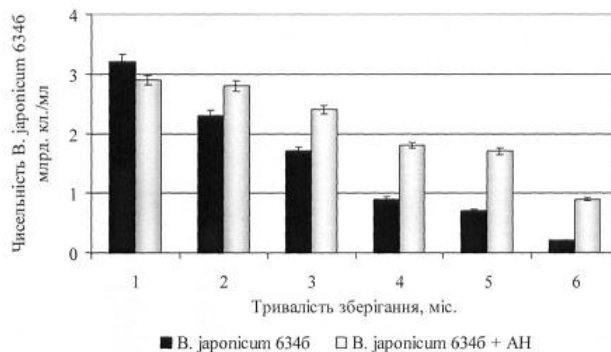
Щільність популяції *V. jaronicum* M-8 при глибинному вирощуванні в середовищі з альгінатом натрію

Фіг. 1



Чисельність *V. jaronicum* M-8 у рідкому середовищі з альгінатом натрію

Фіг. 2



Чисельність *V. jaronicum* 6346 у рідкому середовищі з альгінатом натрію

Фіг. 3

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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