



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **79361**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09861**

(22) Дата подання заявки: **15.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.04.2013**

(46) Публікація відомостей **25.04.2013, Бюл.№ 8**  
про видачу патенту:

(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)**

## (54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ РОСТОВОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ

(57) Реферат:

Спосіб підвищення ростової активності бактерій *Bradyrhizobium japonicum* включає приготування окремо чистих посівних культур *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* та їх сумісне культивування. Посівні культури *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* (співвідношення бактерій становить 1:1) сумісно культивують у поживному середовищі.

**UA 79361 U**



Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології, а саме до способів регулювання ростової активності мікроорганізмів.

Відомий спосіб культивування бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* у напівсинтетичному поживному середовищі на основі горохового відвару [1].

5 Проте, для покращення формування ефективного симбіозу рослин та бульбочкових бактерій при застосуванні препаратів на їх основі необхідно підвищити ростову активність цих мікроорганізмів.

В основу корисної моделі поставлена задача підвищити ростову активність бактерій *Bradyrhizobium japonicum*.

10 Поставлена задача вирішується шляхом сумісного культивування бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* та асоціативних азотфіксувальних бактерій *Azospirillum brasilense* на спеціально підбраному середовищі такого складу, мас. %:

дріжджі кормові (сухі)	0,3
глюкоза	1,0
меляса	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,015
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CaCO}_3$	0,05
вода дистильована	до 100.

Спосіб підвищення ростової активності бульбочкових та асоціативних азотфіксувальних бактерій передбачає виконання наступних етапів:

15 1. Приготування посівної культури *Bradyrhizobium japonicum* [2, 3].

Бактерії *Bradyrhizobium japonicum* вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці при 220 об./хвилину при температурі  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 72 годин у 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
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,05
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CaCO}_3$	0,03
вода дистильована	до 100.

2. Приготування посівної культури *Azospirillum brasilense* [4, 5].

20 Бактерії *Azospirillum brasilense* вирощували в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці при 220 об./хвилину при температурі  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 48 годин у рідкому поживному середовищі такого складу, мас. %:

кукурудзяний екстракт	3,0
меляса	3,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,01
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,025
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CaCO}_3$	0,03
вода дистильована	до 100.

3. Сумісне культивування *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense*.

25 Бактерії вирощували разом в умовах періодичного культивування на мікробіологічній качалці при 220 об./хвилину за температури  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 72 годин у рідкому поживному середовищі такого складу, мас. %:

дріжджі кормові (сухі)	0,3
глюкоза	1,0
меляса	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,015
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CaCO}_3$	0,05

вода дистильована до 100.

Посівний матеріал обох штамів бактерій вносять у поживне середовище у співвідношенні 1:1 (початкова концентрація клітин становить 0,272 млрд./см<sup>3</sup>).

У результаті сумісного культивування *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* чисельність бульбочкових бактерій у змішаній культурі перевищувала титр цих мікроорганізмів у чистій культурі в середньому на 52 %.

Суть корисної моделі пояснюється такими прикладами.

Приклад 1

Одним із показників сумісності мікроорганізмів є симбіотичний індекс (S.I.). При S.I.=1 вважається, що взаємодія між популяціями бактерій відсутня, при S.I.>1 відбувається стимуляція однієї культури іншою.

Для визначення показників ростової активності *B. japonicum* і *A. brasilense* у чистих та змішаних культурах, до поживних середовищ із бактеріями одного виду вносили різну кількість інокулюму бактерій Іншого виду. Так, при мінімальній (min) концентрації бактеріальних клітин, їх початковий титр становив 0,082 млрд./см<sup>3</sup>, середній (mid) титр становив 0,272 млрд./см<sup>3</sup>, а при максимальній (max) же концентрації мікробних клітин, їх початкова кількість у поживному середовищі становила 0,680 млрд./см<sup>3</sup>.

Встановлено, що для бактерій *B. japonicum* М-8 симбіотичний індекс перевищував 1 в усіх варіантах, що свідчить про доцільність їх культивування у змішаних культурах (табл. 1). Проте, найвищий показник (2,90) було отримано за культивування бульбочкових бактерій у співвідношенні з азоспірилами 1:1 при внесенні їх у середній концентрації. У *A. brasilense* № 26 симбіотичний індекс був найвищим за їх культивування з середньою кількістю ризобій у співвідношенні 3:1.

Таблиця 1

Симбіотичний індекс *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* № 26 за їх культивування в чистих і змішаних культурах

Концентрація клітин <i>B. japonicum</i> М-8	Співвідношення кількості <i>B. japonicum</i> М-8 до <i>A. brasilense</i> № 26	Симбіотичний індекс	
		<i>B. japonicum</i> М-8	<i>A. brasilense</i> № 26
min	1:1	2,0	1,57
	1:3	2,67	1,51
	1:8	1,62	0,81
mid	3:1	2,20	1,97
	1:1	2,90	1,89
	1:2,5	2,20	1,27
max	8:1	2,21	1,89
	2,5:1	1,79	1,11
	1:1	1,57	0,86

Аналогічні дані отримано за культивування *B. japonicum* М-8 із *A. brasilense* 410 (табл. 2). В усіх варіантах симбіотичний індекс був вище 1, як для *B. japonicum* М-8, так і для *A. brasilense* 410, що свідчить про взаємний стимулювальний вплив досліджуваних штамів бактерій один на одного.

Таблиця 2

Симбіотичний індекс *B. japonicum* М-8 і *A. brasilense* 410 за їх культивування в чистих і змішаних культурах

Концентрація клітин <i>B. japonicum</i> М-8	Співвідношення кількості <i>B. japonicum</i> М-8 до <i>A. brasilense</i> 410	Симбіотичний індекс	
		<i>B. japonicum</i> М-8	<i>A. brasilense</i> 410
min	1:1	3,77	3,44
	1:3	3,34	3,32
	1:8	2,99	2,78
mid	3:1	3,56	3,64
	1:1	3,73	4,16
	1:2,5	2,66	2,76

Продовження таблиці 2

Симбіотичний індекс *B. japonicum* M-8 і *A. brasilense* 410 за їх культивування в чистих і змішаних культурах

Концентрація клітин <i>B. japonicum</i> M-8	Співвідношення кількості <i>B. japonicum</i> M-8 до <i>A. brasilense</i> 410	Симбіотичний індекс	
		<i>B. japonicum</i> M-8	<i>A. brasilense</i> 410
max	8:1	4,19	3,32
	2,5:1	4,22	3,66
	1:1	3,95	3,18

Для *B. japonicum* 6346 симбіотичний індекс перевищував 1 в усіх варіантах, що свідчить про доцільність їх культивування із *A. brasilense* № 26 (табл. 3).

5

Таблиця 3

Симбіотичний індекс *B. japonicum* 6346 і *A. brasilense* № 26 за їх культивування в чистих і змішаних культурах

Концентрація клітин <i>B. japonicum</i> 6346	Співвідношення кількості <i>B. japonicum</i> 6346 до <i>A. brasilense</i> № 26	Симбіотичний індекс	
		<i>B. japonicum</i> 6346	<i>A. brasilense</i> № 26
min	1:1	3,57	1,90
	1:3	3,06	1,88
	1:8	3,02	1,40
mid	3:1	2,28	2,30
	1:1	3,79	2,07
	1:2,5	3,47	2,19
max	8:1	1,64	3,96
	2,5:1	1,66	3,39
	1:1	2,00	3,19

Аналогічні дані отримано за культивування *B. japonicum* 6346 із *A. brasilense* 410 (табл. 4).

Таблиця 4

Симбіотичний індекс *B. japonicum* 6346 і *A. brasilense* 410 за їх культивування в чистих і змішаних культурах

Концентрація клітин <i>B. japonicum</i> 6346	Співвідношення кількості <i>B. japonicum</i> 6346 до <i>A. brasilense</i> 410	Симбіотичний індекс	
		<i>B. japonicum</i> 6346	<i>A. brasilense</i> 410
min	1:1	2,89	1,83
	1:3	3,35	1,52
	1:8	3,40	1,58
mid	3:1	3,90	2,00
	1:1	4,83	1,97
	1:2,5	4,01	1,87
max	8:1	3,93	2,14
	2,5:1	3,24	1,74
	1:1	3,77	1,82

10 Приклад 2

Бактерії *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* вирощували при температурі 28±2 °C у рідкому середовищі для сумісного культивування протягом 72 годин на підвісних мікробіологічних качалках. При культивуванні бактерій у чистих культурах початкова концентрація клітин становила 0,272 млрд./мл. При сумісному культивуванні посівний матеріал обох штамів бактерій вносили в поживне середовище у співвідношенні 1:1 (початкова концентрація клітин становила 0,272 млрд./мл).

15

Встановлено, що при сумісному культивуванні *Bradyrhizobium japonicum* із *Azospirillum brasilense* ростова активність бульбочкових бактерій збільшується в середньому у 1,5 рази (табл. 5, 6).

Таблица 5

Ростова активність *Bradyrhizobium japonicum* М-8

Варіант	Чисельність мікроорганізмів, млрд./мл
<i>B. japonicum</i> М-8 (культивовані у чистій культурі)	2,7±0,23
<i>B. japonicum</i> М-8 культивовані сумісно з <i>A. brasilense</i> № 26	4,1±0,27
<i>B. japonicum</i> М-8 культивовані сумісно з <i>A. brasilense</i> 410	3,9±0,20

5

Таблица 6

Ростова активність *Bradyrhizobium japonicum* 6346

Варіант	Чисельність мікроорганізмів, млрд./мл
<i>B. japonicum</i> 6346 (культивовані у чистій культурі)	1,9±0,15
<i>B. japonicum</i> 6346 культивовані сумісно з <i>A. brasilense</i> № 26	2,9±0,15
<i>B. japonicum</i> 6346 культивовані сумісно з <i>A. brasilense</i> 410	2,7±0,20

Джерела інформації:

1. Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии. Методы исследования клубеньковых бактерий / [ред. Л. М. Доросинский]. - Л.: 1981. - 47 с.
2. Пат. 39545 Україна, МПК (2006) 7 C 12 N 1/20, C 05 F 1/08. Штам бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* М-8 KIRCHNER, який використовують для приготування бактеріального препарату, що підвищує урожайність сої / Толкачов М. З., Патика 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.
3. А. с. 1034358 СССР, МПК<sup>5</sup> C05F 11/08, C 12N1/20. Штамм клубеньковых бактерий сои 634 б, используемых для изготовления бактериального препарата нитрагина под сою / Новикова А. Т., Берестецкий О.А., Абхазава А.А., Георгадзе Л.И.; заявитель Всесоюзный научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. - № 3374602; заявл. 04.01.1982; опубл. 07.04.1984.
4. Пат. 40542 Україна, МПК (2006) C12N 1/20, C05F 11/08. Штам бактерій *Azospirillum brasilense* для виробництва бактеріального добрива під гречку / Лохова Валентина Іванівна; Надкернична Олена Володимирівна; заявник і патентовласник Український науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології УААН.-4323845/SU, заявл. 02.11.1987.
5. Волкогон В. В. Мікробіологічні аспекти оптимізації азотного удобрення сільськогосподарських культур / В. В. Волкогон. - К.: Аграрна наука, 2007. - 144 с.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб підвищення ростової активності бактерій *Bradyrhizobium japonicum*, що включає приготування окремо чистих посівних культур *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* та їх сумісне культивування, який **відрізняється** тим, що посівні культури *Bradyrhizobium japonicum* і *Azospirillum brasilense* (співвідношення бактерій становить 1:1) сумісно культивують у поживному середовищі наступного складу, мас. %:

дріжджі кормові (сухі)	0,3
глюкоза	1,0
меляса	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,015
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,015
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CaCO}_3$	0,05
вода дистильована	до 100.

10

---

 Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська
 

---



---

 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