

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 142382

**ШТАМ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BIOVAR VICEAE IMB
B-7837 ЯК ОСНОВА БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ДЛЯ
ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЮ І ЯКОСТІ ЗЕРНА СОЧЕВИЦІ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **10.06.2020.**

Заступник Міністра розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України

Д.О. Романович



(21) Номер заявки: **u 2019 01836**
(22) Дата подання заявки: **25.02.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.06.2020**
(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **10.06.2020, Бюл. № 11**

(72) Винахідники:
Новікова Тетяна Петрівна, UA,
Карпенко Віктор Петрович, UA,
Коць Сергій Ярославович, UA,
Воробей Надія Анатоліївна, UA,
Калініченко Антоніна Володимирівна, UA,
Петриченко Василь Флорович, UA,
Гнатюк Тетяна Тарасівна, UA,
Житкевич Наталія Всеволодівна, UA,
Патика Володимир Пилипович, UA

(73) Власники:
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, UA,
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА МОН УКРАЇНИ,
вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаська обл., 20305, UA

(54) Назва корисної моделі:

ШТАМ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BIOVAR VICEAE IMB B-7837 ЯК ОСНОВА БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЮ І ЯКОСТІ ЗЕРНА СОЧЕВИЦІ

(57) Формула корисної моделі:

Штам *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* IMB B-7837 як основа бактеріального добрива для підвищення урожаю і якості зерна сочевиці.

Державне підприємство
«Український інститут інтелектуальної власності»
(Укрпатент)

Цей паперовий документ ідентичний за документарною інформацією та реквізитами електронному документу з електронним підписом уповноваженої особи Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України.

Паперовий документ містить 2 арк., які пронумеровані та прошиті металевими люверсами.

Для доступу до електронного примірника цього документа з ідентифікатором 1584090620 необхідно:

1. Перейти за посиланням <https://sis.ukrpatent.org>.
2. Обрати пункт меню Сервіси – Отримати оригінал документу.
3. Вказати ідентифікатор електронного примірника цього документу та натиснути «Завантажити».

Уповноважена особа Укрпатенту

10.06.2020



І.Є. Матусевич



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142382** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
C05F 11/08 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A01N 63/20 (2020.01)
A01P 21/00
C12R 1/41 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 01836**
(22) Дата подання заявки: **25.02.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.06.2020**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.06.2020, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):
Новікова Тетяна Петрівна (UA),
Карпенко Віктор Петрович (UA),
Коць Сергій Ярославович (UA),
Воробей Надія Анатоліївна (UA),
Калініченко Антоніна Володимирівна (UA),
Петриченко Василь Флорович (UA),
Гнатюк Тетяна Тарасівна (UA),
Житкевич Наталія Всеволодівна (UA),
Патика Володимир Пилипович (UA)
(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA),
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА МОН
УКРАЇНИ,
вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаська обл., 20305 (UA)

(54) **ШТАМ RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BIOVAR VICEAE IMB B-7837 ЯК ОСНОВА БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ УРОЖАЮ І ЯКОСТІ ЗЕРНА СОЧЕВИЦІ**

(57) Реферат:

Штам Rhizobium leguminosarum biovar viceae IMB B-7837 як основа бактеріального добрива для підвищення урожаю і якості зерна сочевиці.

UA 142382 U

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до мікробіологічних засобів підвищення урожайності бобових культур і стосується запропонованого штаму бактерій *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* T2 для виготовлення бактеріальних добрив під сочевицю.

5 Як бобова культура сочевиця збагачує ґрунт азотом і є добрим попередником для зернових культур. Мікросимбіонтом сочевиці є маловивчена група швидкорослих бульбочкових бактерій *Rhizobium leguminosarum biovar viceae*. Передпосівний обробіток насіння сочевиці ризобіфітом (мікробним препаратом на основі високоефективного штаму *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* 728) є обов'язковим агротехнічним заходом [2,3].

10 Протягом багатьох років під сочевицю використовували еталонний виробничий штам *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* 724. (зберігається у колекції Всеросійського НДІ сільськогосподарської мікробіології (С.Петербург) під номером 724, а також у колекції Інституту фізіології рослин і генетики (ІФРІГ) НАН України (Київ) під номером 728, яка має статус національного надбання.

15 Недоліком штаму *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* 724 є те, що при бактеризації ним насіння сочевиці спостерігається не досить висока азотфіксуюча активність симбіотичного апарату і урожайність цієї цінної культури, що ймовірно пов'язано з неадаптованістю штаму до ґрунтово-кліматичних умов зазначених областей, де висівається наразі сочевиця. По-друге - при культивуванні штам *R. bv. viceae* 724 набирає відносно невисокий титр - $3,0 \cdot 10^9$ КУО/мл
20 препарату [5], внаслідок чого втрачає свою конкурентоздатність з навколишнім мікробіомом ґрунту.

Задачею корисної моделі є одержання нового штаму бульбочкових бактерій сочевиці з високою азотфіксуючою, конкурентною здатністю, титром препарату, який дозволяв би підсилити процес симбіотичної азотфіксації, підвищити продуктивність і покращити якість зерна і біомаси цієї культури.

25 Ця задача вирішується завдяки запропонованому штаму *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* IMB B-7837.

Штам ідентифіковано за визначником бактерій Бергі [4]

30 Штам *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* IMB B-7837 депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під № IMB B-7837.

Морфолого-культуральні властивості.

Штам характеризується наступними культурально-морфологічними властивостями: культура бактерій не спороносна, грам-негативна, клітини мають форму дрібних паличок, розміром 1,2-2,6 мкм, палички рухливі. Містить гранули β -гідроксибутирату. Бактерії пігмент не
35 продукують. Культура швидкоросла.

Поживні середовища для вирощування і зберігання бульбочкових бактерій, зокрема *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* T2:

1. Гороховий агар I, г/л: горох-100,0; цукроза - 20,0 г; агар-агар-20 г; pH - 6,8-7,0; стерилізація при 120 °C (1 атм.) 20 хв. Колонії на гороховому агарі появляются на третю добу, однотипні,
40 круглі, білуваті, сильно випуклі, 2-2,5 мм в діаметрі.

2. Бобовий агар II, г/дм³: бобовий відвар - 1 дм³; цукроза - 2,0 г; KH_2PO_4 -1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,3 г; агар-агар - 15-20 г; pH - 7,0; стерилізація при 120 °C (1 атм.) 20 хв.

3. Люпиновий агар, г/л: K_2HPO_4 -0,5; KH_2PO_4 -0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; NaCl-0,2; CaSO_4 -0,1; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ сліди, маніт - 20,0; Люпинова мука -10,0; агар-агар - 20,0; pH - 6,8-7,0.

45 4. Манітно-дріжджовий агар (МДА), г/л: маніт - 10,0; KH_2PO_4 -0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; агар-агар - 16,0; pH - 6,8-7,0; стерилізація при 120 °C (1 атм.) 20 хв.

При розсіві штрихом на МДА колонії з'являються на 3-4 добу, мають округлу форму, випуклі, білі, напівпрозорі, однотипні, слизисті, 3-3,5мм в діаметрі. При зростанні у рідкому середовищі з перемішуванням культури досягають значної густини через 2 або 3 доби інкубації.

50 Фізіолого-біохімічні властивості.

Симбіонт. Макросимбіонт - бобова рослина сочевиця *Ervum lens* L.

Відношення до кисню - аероб, але здатний рости при зниженому вмісті кисню. Температурний діапазон росту: 25-35 °C. Оптимальна температура росту: 28 °C. При 40 °C ріст відсутній. Діапазон pH 5,5-8,5. Оптимальна pH 7,0.

55 У якості джерела вуглецю штам T2 може використовувати глюкозу, сахарозу, маніт, ксилізу, мальтозу, рамнозу, сорбіт, лактозу, галактозу, а також ацетати, N-ацетилглюкозамін, пірувати, підкислює середовище. Клітковину і крохмаль не засвоює. Поряд із засвоєнням азоту з атмосфери може використовувати амонійний та нітратний азот. Відновлює нітрати до нітритів. На МПА не росте.

Крохмаль не гідролізує. Не розкладає целюлозу. Желатину не розріджує. Молоко з лакмусом не пептонізує, слабо підлугує.

Ознаки штаму стійкі. Штам T2 не патогенний, зберігається на МДА (рН 7,0) або бобовому (гороховому) агарі при 6-8 °С і пересівається 1 раз на 4-6 місяці.

5 Оцінку симбіотичних властивостей штаму T2 - азотфіксувальної активності, ефективності симбіозу та якості (амінокислотний склад) білка надземної маси сочевиці проводили в умовах вегетаційних та польових дослідів.

Приклад. Ефективність штаму *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* T2 перевіряли у вегетаційних дослідів на стерильному вермикуліті (суміш Гельрігеля з 0,5 нормами азоту) та у польових дослідів на чорноземі опідзоленому важкосуглинковому дослідного поля Уманського національного університету садівництва та Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААНУ (2017-2018 рр.).

10 Для виготовлення препарату на сипучому носії (вермикуліт) досліджували штами *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* вирощували при 27 °С протягом 2-3 діб у пробірках на агаризованому гороховому середовищі, потім змивали стерильною водою і готували суспензію для качал очних колб і 5-й літрових бутлїв.

15 Рідку культуру вирощують в качалочних колбах і 5-й літрових бутлїях протягом 2-х діб. Титр $5-8 \cdot 10^9$ КУО/мл. Посівну культуру використовують для приготування рідкої робочої культури в 5-й літрових бутлїях. Бутлї отряхували на мікробіологічній качалці упродовж 42-50 годин. Титр не менше $4-6 \cdot 10^9$ КУО/мл/ мл. Після мікробіологічного контролю культуральну рідину з бутлїв використовували для змішування з вермикулітом.

20 Високодисперсний вологоємкий мінеральний носій вермикуліт розфасовували у пакети (130 г вермикуліту / на 1 га), виготовлені з термостійкої непрозорої плівки та стерилізували в паровому автоклаві за 1,2 атм, 1,5 години. Після охолодження сипучу фракцію нейтрального стерильного неорганічного матеріалу (вермикуліт) у стерильних умовах збагачували добавками в однаковій пропорції 1:1:1:1 (кукурудзяний екстракт, меляса, глюкоза, стерильна водопровідна вода) до вологості 70-75 %. Після цього в пакети з вермикулітом вносили стерильно культуру бульбочкових бактерій сочевиці 50 мл (рідка суспензія з вихідним титром $5 \cdot 10^9$ КУО/мл після культивування в бутлїях). Приготовлене таким чином бактеріальне добриво витримували (підрожували) при кімнатній температурі (17-21 °С) 5-7 діб, (в подальшому пакети зберігаються при 5-15 °С у темному сухому приміщенні окремо від ядохімікатів).

30 Розрахункову кількість виготовленого препарату використовували для інокуляції насіння у вегетаційному досліді. Інокуляційне навантаження складало 10^5 КУО/насінину. Ефективність препарату на основі запропонованого штаму бульбочкових бактерій T2 перевіряли за інокуляції сочевиці сорту Лінза (оригіатор сорту - Інститут зернових культур НААНУ, Красноградська дослідна станція ІСГСЗ НААН України) в умовах польових дослідів.

35 Нітрогеназну активність штаму визначали в інтактних бульбочках рослин ацетиленовим методом на газовому хроматографі "Agilent 6850" [1].

40 Як видно з Табл. 1 в умовах вегетаційного дослідів *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* T2 вступав в ефективний симбіоз з сочевицею сорту Лінза, активно фіксував атмосферний азот і за азотфіксуючою активністю перевищував штам еталон виробничий *R. leguminosarum* bv. *viceae* 724 у 2,5 рази. Урожай надземної маси сочевиці зростав при цьому на 40,3 % у порівнянні з контролем і на 14,2 - порівняно зі штамом еталонним виробничим 724.

Таблиця 1

Надземна маса та азотфіксувальна активність сочевиці сорту Лінза у вегетаційному досліді, 2018 р.

Варіант	Надземна маса рослин, г/посудину	Надбавка до контролю		Надбавка до 724		Кількість бульбочок, шт.	Маса кореня 1 рослини, г	Азотфіксувальна активність, мкмоль C_2H_4 ·Росл ⁻¹ год. ⁻¹
		г/посудину	%	г/посудину	%			
Контроль, без інокуляції	6,23±2,0	0	0	0	0	0,9±0,02	0,53±0,04	0,102±0,08
Штам еталон виробничий 724	9,14±2,5	2,91	31,84	0	0	2,7±0,02	0,64±0,03	0,48±0,01
Запропонований штам T2	10,44±2,1	4,21	40,32	1,30	14,22	5,5±0,03	0,78±0,03	1,20±0,07

45

Посів сочевиці у польових дослідах проводили у рекомендовані для цієї зони терміни (рано навесні) з шириною міжрядь 15 см й глибиною загортання насіння 5-6 см, а за нестачі води - на 7-8 см. Норма висіву насіння 100-120 кг/га або 2-2,5 млн/га, дрібнонасінну - 2,5-3,0 млн/га (80-100 кг/га).

- 5 Штам, що пропонується за ефективністю суттєво перевищує базовий штам 724. Упродовж вегетації сочевиці (фази бутонізації, цвітіння і наливу бобів) запропонований штам Т2 формував більшу кількість бульбочок 37; виробничий 724 - відповідно 31; вміст леггемоглобіну - 2,79 і 5,36 мг/г сирої маси бульбочок відповідно. Надбавка урожаю зерна сочевиці при інокуляції новим штамом (Табл. 2) складала 0,36 т/га (20,11 %) - за відношенням до контролю і 0,25 т/га (13,96 %) - за відношенням до виробничого штаму. Азотфіксуюча активність симбіотичного препарату у сочевиці перевищувала виробничий штам у 1,6 рази (Табл.2).

Таблиця 2

Ефективність штаму *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* Т2 при інокуляції сочевиці сорту Лінза в польових дослідах 2018 р.

Варіант	Урожай зерна, т/га	Надбавка до контролю		Надбавка до штаму 724		Кількість бульбочок, шт.	Вміст леггемоглобіну, мг/г сирої маси бульбочок	Азотфіксуюча активність, мкмоль C_2H_4 -росл. ⁻¹ год. ⁻¹ 1 корінь
		т/га	%	т/га	%			
Контроль, без інокуляції	1,43	0	0	0	0	16	1,76	0,82±0,01
Штам еталон виробничий 724	1,54	0,11	7,14	0	0	31	2,79	3,15±0,03
Запропонований штам Т2	1,79	0,36	20,11	0,25	13,96	37	5,36	5,03±0,03
НІР _{0,5} , т/га	0,07							

Джерела інформації:

- 15 1. Експериментальна ґрунтова мікробіологія: монографія /В.В. Волкогон, О.В. Надкернична, Л.М. Токмакова та ін.]; за наук. ред. В.В. Волкогона. - К.: Аграр. наук., 2010. - С. 235-245.
2. Лихочвор В.В., Петриченко В.Ф., Іващук П.В., Корнійчук О.В. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур /за ред. В.В.Лихочвора, В.Ф.Петриченка. - 3-є вид., випр., допов. - Львів: НВФ "Українські технології", 2010. - 1088 с
- 20 3. Коць С.Я., Моргун В.В., Патыка В.Ф. и др. Биологическая фиксация азота: бобово-ризобиальный симбиоз: монография: в 4-х т. - К.: Логос, Т. 1.- 2010.- 508 с.
4. Bergey's manual of systematic bacteriology /Boore D.R., Castenholz R.W. editors, Vol. 2: Garrity G.M., editor-in-chief. - 2nd ed. - New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. - 2, Part. C. - 1388 p.).
- 25 5. Авторское свидетельство СССР № 1446132, кл. 4 C05F 11/08, C12 N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1/41) Патент Штам *Rhizobium galegae* MC-1 № 159 (Бюл. № 47, 23.12.88 р.).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 30 Штам *Rhizobium leguminosarum biovar viceae* IMB В-7837 як основа бактеріального добрива для підвищення урожаю і якості зерна сочевиці.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,

вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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