

Даний винахід відноситься до продукту(ів), що містить(ять) живий(і) мікроорганізм(и), прийнятний(і) для обробки ґрунту, до мікроорганізмів, які розмножуються при різноманітних кліматичних та природних умовах, а також до способу одержання таких продуктів і способу обробки ґрунту та рослин за допомогою цих продуктів.

Більш докладно, винахід стосується способу одержання продуктів з будь-якого - мікроорганізму, вказаного нижче, а також з їх сумішей.

Крім того, винахід відноситься до способу створення культур мікроорганізмів, що використовуються. Об'єкт даного винаходу також представляє собою мікроорганізми самі по собі.

Більш докладно, винахід стосується способу для обробки ґрунту та рослин за допомогою продукту, що містить, принаймні, один з мікроорганізмів *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. (NCAIM /P/ B 001294) *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ P 001302), *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301), а також продуктів, які розмножуються та існують у навколишньому середовищі даних рослин, таких, що містять вказані мікроорганізми, та способу їх одержання.

Природне середовище ґрунту представляє собою екосистему рослин та мікроорганізмів, що здатна до саморегуляції у природних умовах, існування такої моделі визначає усі інші параметри. Коли завдяки діяльності людини змінюється баланс, що розвинувся в процесі еволюції (глибока оранка, природні та штучні добрива, використання агентів для захисту рослин, тощо), в структурі та функціях цієї моделі можуть виникати непередбачувані зміни. Для розвитку популяцій мікроорганізмів, що необхідні для оптимального культивування даної вирощуваної культури, на різних ґрунтах та у різних кліматичних умовах та для селекції необхідний період часу, що триває багато років. Проте детермінантні мікроорганізми сприятливої популяції мікроорганізмів можуть бути введені у ґрунт, а умови, необхідні для оптимальної культивування можуть бути створені протягом одного-двох днів. Результатом цього є більш високий врожай, якого досягають при відсутності шкідливого порушення природної екосистеми. Корисні та домінуючі мікроорганізми, що існують у навколишньому середовищі даної рослини та є важливими з економічної точки зору, можуть бути визначені за допомогою лабораторних дослідів, після цього їх можна індивідуально розмножувати та одержувати за допомогою промислових способів, при цьому вони це забезпечує відновлення ґрунту у відношенні власних пропорцій.

В екосистемі ґрунту та мікроорганізмів можуть бути відкриті важливі закономірності. У безпосередньому навколишньому середовищі кореневої системи живих рослин (ризосфері) та пророслого насіння (сперматосфері) може бути визначена різна кількість мікроорганізмів та можуть також бути ідентифіковані різноманітні мікроорганізми. Розмноження бактерій в навколишньому середовищі коріння зазнає впливу багатьох факторів. Ці фактори залежать від району, якості ґрунту, складу популяції мікроорганізмів та від кліматичних умов.

Джерело вуглецю, що знаходиться у ґрунті, поступає у рослини, головним чином, та у переважній більшості рослин при використанні сонячної енергії та за допомогою фотосинтезу.

Цикл азоту є більш складним, ніж такий для вуглецю. На процес перетворення азоту здійснюють вплив біологічні та хімічні процеси. У природних умовах газоподібний азот у так званій інертній формі є переважним, а так званий зв'язаний азот (нітрат, нітрит, амоній) присутній в обмеженій кількості.

За мінералізацію газоподібного азоту, перш за все, відповідає біологічне зв'язування азоту. Оскільки кількість молекулярного азоту над одним гектаром складає приблизно до $6-7 \times 10^8$ тонн, то це означає невичерпане джерело для зв'язування азоту. Інтереси дослідників спрямовані на організми, що здатні до зв'язування азоту, тобто на організми, які можуть відновлювати молекулярний азот до амонію, оскільки, поряд з іншими, знання стосовно цих мікроорганізмів та адекватне використання їх властивостей можуть забезпечити сприятливим для навколишнього середовища шляхом усунення голоду.

Деякі бактерії, що зв'язують азот, здатні фіксувати азот при відсутності живих організмів, але значна кількість бактерій здатна до фіксації азоту тільки у поєднанні з іншими організмами, вищими рослинами.

Цикл фосфору, на противагу до азоту, є практично закритим у природних умовах. Надходження та вихід є однаковими, потік є незначним, повітря не є забруднене фосфором. Таким чином, цей елемент акумулюється у воді, морях, та тільки незначна його кількість повертається назад на Землю (наприклад, у формі гуано).

У живих клітинах, що містяться у ґрунті, фосфор акумулюється в органічних сполуках, їх мінералізація проходить при високій швидкості ($3-8 \text{ г/м}^2/\text{рік}$). Розчинність фосфорних сполук, що виникають, - і, таким чином, їх доступність для рослин -, є різною, тільки 5% від середнього вмісту 400-1200 мг фосфору, що визначається у кожному 1 кг ґрунту, є доступними. Період кругообігу деяких фосфорних сполук складає 500-2000 років.

Шляхом введення груп мікроорганізмів, що розкладають фосфорні сполуки у ґрунт, складні фосфорні сполуки, які є недоступними для рослини, можуть бути переведені у розчин. Якщо мікроорганізми вносять у функцію ґрунту, мінеральний склад ґрунту стає задовільним, і при цьому не є необхідним використання добрив, що містять фосфат, або їх використання може бути значно знижене.

Для росту рослини потребують - особливо у момент дозрівання врожаю - значної кількості калію. Хлібороби вносять калій у ґрунт шляхом підживлення добривами, що містять калій. Таке добриво може бути доступним за калійної мінеральної сировини при використанні мікроорганізмів, що вивільняють іони калію.

Стосовно рослин можуть бути корисними мікроорганізми, які підвищують біосинтез фізіологічно активних сполук у ґрунті, такими важливими сполуками, за винятком перерахованих вище, є фітогормони, ауксини (індол-3-оцтова кислота), етилен, гібереліни, кінетини, тощо. Деякі групи *Pseudomonas* у присутності заліза у незначній кількості здатні до утворення так званих сидерофорів, які можуть акумулювати залізо. Наслідком цього є те, що інші фітопатогенні бактерії та гриби, оскільки вони не можуть використовувати залізо з сидерофорів, зазнають інгібування з причини відсутності заліза, з іншого боку, ці сидерофори на ґрунтах, де відсутнє залізо, значно стимулюють ріст рослин, оскільки, зв'язуючи залізо, вони безпосередньо забезпечують ним рослину.

Для вирішення описаних вище проблем було розроблено декілька технічних версій; при цьому деякі

мікроорганізми описані у спеціальній літературі більш детально.

Угорські винахідники розкрили спосіб приготування порошкоподібних нитрифікаційних культур [угорський патент HU 143.391], культур *Azobacter chroococcum* та *Rhizobium meliloti* [угорський патент HU 188.434], культури водоростей [угорський патент HU 195.068] та культури *Azotobacter chroococcum*, а також препаратів культур мікроорганізмів *Bacillus megaterium* [угорський патент HU 207.751]. *Azobacter chroococcum* був задепонований під депозитним номером №00238, *Bacillus megaterium* - під серійним номером NCAIM /P/ B 1140. Більш докладно, в угорських патентах HU 188.434 та HU 207.751 автори описують ферментативне виробництво вказаних вище задепонованих мікроорганізмів. Згідно з угорським патентом HU 213.163 автори доповнили культуру мікроорганізмів за патентом HU 207.751 карбоксиметилцелюлозою. Угорські винахідники в HU1671/96 описують культури мікроорганізмів, що містять *Azospirillum lipoferum* ssp., *Azobacter vinelandii* sp., *Pseudomonas fluorescens* ssp. та *Bacillus megaterium* ssp.

Застосування та ефект мікроорганізмів, що використовуються у згаданих вище процедурах, обмежені тим фактом, що різні умови культивування, ґрунти різного складу, різні кліматичні умови, короткий період виживання, умови навколишнього середовища та ризосфера різних рослин не завжди створюють оптимальні умови.

Основна мета винаходу полягає у приготування препаратів таких культур фунтових мікроорганізмів, які з огляду на вирощувані рослини та з економічної точки зору забезпечують сприятливий ефект та які у той самий час можуть зберігати життєздатність, розмножуватися та проявляти свій сприятливий вплив на різноманітних ґрунтах та стосовно різноманітних рослин, при різних кліматичних умовах та умовах культивування.

Несподівано було виявлено, що розмноження та збереження життєздатності мікроорганізмів, що вирощуються у лабораторних умовах, та які сприятливо впливають на розвиток рослини, і при цьому фіксація азоту, мобілізація фосфату, стимулювання росту рослини, покращення структури ґрунту варіюють в залежності від характеру ґрунту, температурних умов та самої рослини у своєму безпосередньому оточенні. У ході експериментів було підтверджено, що, хоча це і є несподіваним, інші групи мікроорганізмів можуть розмножуватися у ризосфері різноманітних рослин або поблизу неї та виявляти тут свій вплив протягом тривалого періоду часу.

Таким чином, були проведені експерименти стосовно культивування рослин для ізоляції таких мікроорганізмів, які справляють сприятливий ефект на навколишнє середовище даної рослини, що є важливим з економічної точки зору. Крім того, були також виконані експерименти по ізоляції мікроорганізмів, при цьому такі мікроорганізми можуть мобілізувати іони калію. Такі мікроорганізми, що ізолювані з ґрунту та які піддавали лабораторним перетворенням шляхом мутаційних процедур, можна розмножувати під час внесення у ґрунт, при низькій температурі, при цьому вони виявляють свій вплив на інші організми, хоча це звучить несподівано для спеціаліста.

У ході експериментів ми встановили, що певні мікроорганізми, які продукують полісахариди, несподіваним чином змінюють структуру ґрунту сприятливим з сільськогосподарської точки зору чином, поліпшуючи стійкість до посухи.

Підсумком та метою нашої експериментальної роботи було ізолювати такі мікроорганізми, які передають азот, фосфор, калій рослинам, біосинтезують рослинні ростові гормони, біосинтезують полісахариди, поліпшуючи структуру ґрунту, та які є здатними до розмноження у період сівби та у країнах з більш холодним кліматом, а також здатні до виявлення свого впливу на різноманітних ґрунтах та рослинах. Крім того, нашою метою було створення таких препаратів, в яких вміст мікроорганізмів у навколишньому середовищі рослини, у ризосфері, або безпосередньо серед рослинних клітин, шляхом фіксації та мобілізації життєво необхідних елементів, а також шляхом продукції рослинних факторів росту та полісахаридів у навколишньому середовищі даної рослини поліпшує розвиток даної рослини або родини рослин, внаслідок чого ми можемо уникати використання добрива, і це забезпечує захист навколишнього середовища.

Об'єктом даного винаходу є спосіб вирощування приведених мікроорганізмів, -препарати, що їх містять, крім того, застосування препарату(ів), що містить(ять) мікроорганізм(и), та конкретні мікроорганізми.

Даний винахід ґрунтується на визнанні того факту, що для створення препаратів особливо прийнятними є наступні мікроорганізми *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302) та *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301), що можуть розмножуватися при низькій температурі у період сівби, та які забезпечують рослини азотом, мобілізують фосфор, калій, біосинтезують ростові гормони та полісахариди, і таким чином, ми ізолювали такі мікроорганізми та розробили їх спосіб вирощування.

З огляду на вказане вище у період з 1998 до 1999 року ми ізолювали в Європі з ґрунту та середовища, що оточує кореневу систему деяких рослин, мікроорганізми, які тестували *in vitro* на їх здатність до фіксації азоту, розчинних фосфату та калію, полісахаридів, що беруть участь у створенні та біосинтезі рослинних гормонів, систематично ідентифікували вибрані мікроорганізми, приготували такі варіанти шляхом мутаційної обробки, при цьому такі мікроорганізми також інтенсивно розмножуються при температурі нижче 20°C, для культивування за допомогою цих розроблених технологій вирощування з таких культур готували препарати та перевіряли їх вплив на розвиток рослин та на врожаї у теплицях та в умовах польового експерименту.

Ізолювали види та підвиди *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* та *Micrococcus*.

Відомими видами *Azospirillum* є бактерії, що мають Грам-негативне забарвлення в умовах ґрунту, при цьому ці види в мікро-аерофільних умовах (у присутності 1-2% кисню) та при тісному контакті з кореневою системою рослин можуть відновлювати азот повітря до амонію, а потім передавати його рослинам. Деякі групи також синтезують рослинні гормони.

Групи *Azospirillum* були ізолювані з середовища, що оточує корені кукурудзи, пшениці, ячменю, жита, що вирощуються на різноманітних орних землях Європи, на різноманітних ґрунтах луків. Бактеріальну суспензію

із зразків ґрунту диспергували у культуральному середовищі Nfb(II) та MM культуральному середовищі, що має склад наведений нижче, а потім культивували в мікро-аерофільних умовах. Через 72 години ідентифікували культури *Azospirillum*. Культури *Azospirillum*, що відрізняються від інших дрібних бактеріальних та грибових культур, досягали розміру приблизно 3мм.

Культури *Azospirillum* sp. під час фази експоненціального росту на рідкому середовищі MM та м'якому агаризованому середовищі Nb(II), що мають склад приведений нижче, продемонстрували морфологічні властивості, характерні для клітин *Azospirillum*.

Клітини мали віброїдну форму та S-подібну форму та розмір 1-2х2-4мкм. Для свого росту вони вимагали внесення біотину. На основі мікроскопічних спостережень було виявлено, що вони мають здатність швидко рухатися. Їх рухливість може бути приписана полярному джгутику. В своїх клітинах вони можуть акумулювати полі-бета-гідроксибутиратні зерна та каротини. Червонуваті плями забарвлення можуть бути пояснені старінням культури. Для свого росту вони можуть використовувати органічні кислоти, такі, як яблучна кислота, молочна кислота, пірорацемічна кислота, а також бутандіоева кислота. Фіксація азоту з повітря має місце в мікро-аерофільних умовах. В екстремальних умовах, таких, як, наприклад, у випадку недостатності вологи, при низькому або високому значенні рН, при відсутності джерела азоту або вуглецю, клітини можуть перетворюватися у цисти, в яких відсутній джгутик, але які містять полі-бета-гідроксибутиратні зерна та оточені капсулярним полісахаридом. Спектр джерел вуглецю, що можуть використовуватися мікроорганізмами, змінюється в залежності від видів: *A. Amazonense*: глюкоза + сахароза + інозитол+, *A. Brasilense* глюкоза + сахароза та інозитол -, *A. Irakense* використовує глюкозу (+) та сахарозу (+), але не використовує інозитол (-), а *A. Lipoferum* використовує тільки глюкозу. У середовищі, що не містить азоту, спектр використовуваних джерел вуглецю відрізняється у більшій мірі, так, що вказані чотири види не можуть бути розрізнені. Спектр використовуваних джерел вуглецю ізольованих нами мікроорганізмів частково відрізняється від такого для ATCC 29.731 *A. Amazonense*, *A. Brasilense*, *A. Irakense* неопиту [Holt, J.G. з співавторами. Керівництво Бергі з бактеріологічного визначення, 9-е видання, 1994]. На противагу до типових груп вони прекрасно розмножуються у присутності 3,5% хлориду натрію, на м'якому агарі (це буде описано пізніше), їх мікроскопічна картина відрізняється у різні періоди культивування, їх продукування пігментів є більш інтенсивним, наприклад, на картопляному агарі.

Деякі ізольовані *Azospirillum* є близькими до видів *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. brasilense*, а також до видів *A. irakense*, ми проводили подальші експерименти з ними при селекції однієї з груп *Azospirillum brasilense*.

З вказаних вище зразків ґрунту на Nfb(II) м'якому агарі були ізольовані мікроорганізми *Azotobacter*, їх піддавали селективному культивуванню, а потім на середовищі MM та на середовищі Федорова піддавали дисперсії та селекції один з підвидів на основі здатності до фіксації азоту та зберігали для подальших експериментів. Клітини групи мали або плеоморфну або коковидну форму. У присутності кисню вони можуть швидко рухатися. На середовищі, вільному від азоту, вони можуть виробляти забарвлювальний агент, жовтувато-зелений пігмент, вони також добре споживають рамнозу та мезо-інозитол.

Добре відомо, що *Rhizobium* утворює бульбочки на коренях бобових, при цьому, перебуваючи серед рослинних клітин, вони безпосередньо передають фіксований азот рослині. З різними бобовими у взаємозв'язок вступають різноманітні види *Rhizobium*, з соєвими вступають у взаємозв'язок група *Bradyrhizobium*. Оскільки види останньої групи *Rhizobium* представляють собою єдину групу, яку вносять після збору врожаю, і вони не залишаються у ґрунті у великій кількості, бажаним є використовувати цю групу для обробки ґрунту. Ми ізолювали групу *Bradyrhizobium* 13 липня з плантації сої, що знаходиться у Шубаші, поблизу Сегед-Кішкундоросма. З вирощуваних рослин відбирали добре розвинуті рослини, потім відокремлювали добре розвинені бульбочки з коренів. Ізолювали психрофільний варіант мікроорганізму, як описано у представленому прикладі. Наші зразки ґрунту ми досліджували на мікроорганізми, що мобілізують фосфат, та ідентифікували відібрані мікроорганізми з систематичної точки зору. Частина мікроорганізмів визначали як такі, що відносяться до *Pseudomonas*, іншу частину визначали як такі, що відносяться до видів *Bacillus*.

Pseudomonas представляє собою Грам-негативні аеробні клітини у формі тонких паличок, вони виробляють у середовищі основний забарвлювальний пігмент, при цьому вказані мікроорганізми представляють собою сапрофіти. Не спостерігається ніякої продукції каротину, вони не ростуть при температурах, вищих 40°C. На желатинизованих агарах спостерігається їх зрідження. Нашою групою споживається глюкоза, але не споживається крохмаль. Оскільки варіанти груп *Pseudomonas*, що виробляють забарвлювальний агент, систематично перебувають у тісному зв'язку, можна спостерігати певну систематичну гетерогенність між нашими мікроорганізмами та типовими групами: наші мікроорганізми - що є характерним для *Pseudomonas* - добре споживають глюкозу, галактозу, оцтову кислоту, мальтозу, гліцерин та пірорацемічну кислоту. Вони не споживають фруктозу, D-арабінозу, мальтозу, лактозу, крохмаль та інулін. На противагу до типових груп, проте, вони здатні рости на ксилізі, сахарозі та у деякій мірі на сорбіті. Як єдине джерело вуглецю вони можуть використовувати гліцин.

На основі вказаного вище, один з наших мікроорганізмів було ідентифіковано як такий, що відноситься до виду *Pseudomonas fluorescens*, було також виявлено, що він схожий з варіантами, що належать до групи Біовару III. Ми назвали цю групу як *Pseudomonas fluorescens* ssp.

На основі систематичних характеристик, відмінних від клітин виду *Bacillus*, які розчиняють нерозчинний фосфат, деякі були ідентифіковані як такі, що відносяться до *Bacillus polymyxa*, а деякі як такі, що відносяться до *Bacillus megaterium*. Деякі групи були вибрані для подальших експериментів.

З калієвих мінералів для ізолювання мікроорганізмів, здатних мобілізувати іони калію, з поверхні мінералів, що містять калій, польового шпату та звичайної слюди, були ізольовані мікроорганізми, їх потім піддавали тестуванню так, як описано у наведених -прикладях, на твердому середовищі, вільному від калію, для підтвердження мобілізації калію. При використанні процедури, що наведена у прикладах, шляхом мутаційних обробок, було одержано та задепоновано мікроорганізм, ідентифікований як *Streptomyces psychrophilic*.

Ми також ізолювали такий мікроорганізм, який після систематичного та морфологічного тестів, а також тестів на рибосомальну ДНК, був ідентифікований як *Micrococcus roseus* та показав значний сприятливий ефект у випадку експерименту на рослинах. Одна з груп мікроорганізмів була задепонована, при цьому цю групу піддавали перетворенням у лабораторних умовах.

Винахід також базується на тому факті, що мікроорганізми, які викликають сприятливий ефект, при внесенні у ґрунт можуть розмножуватися так швидко, наскільки це можливо на початкових етапах розвитку проростків та рослин у кліматичних умовах осені та ранньої весни, а також у країнах з більш холодним кліматом. Таким чином, мікроорганізми піддають обробці, ізолюють та підтримують у відповідності з тим, як це описано у Прикладі 4. Шляхом відомих способів були ізольовані мутанти та варіанти, що розмножуються при низьких температурах, пізніше їх було задепоновано у Національній Колекції сільськогосподарських та промислових мікроорганізмів.

Винахід відноситься до таких препаратів та способів, при використанні яких збільшується врожай рослинних культур. Спосіб виробництва супроводжується культивуванням мікроорганізмів, які були ізольовані з різноманітних фунтів, навколишнього середовища різноманітних рослин, таких, що існують у навколишньому середовищі даної рослинної родини протягом тривалого періоду часу, розмножуються при низьких температурах, на різноманітних ґрунтах, винахід передбачає також внесення препаратів, що містять культури, під відповідні рослини, нанесення їх на насіння або їх внесення в орні землі. Згідно з винаходом, препарати можуть використовуватися при обробці ґрунту, рослин та рослинного насіння препаратами, що містять, принаймні, один з наступних мікроорганізмів: *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ P 0012...) та *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 0012...).

В результаті обробки буде прискорюватися розвиток рослин, вони стають більш стійкими до патогенів, покращується забезпечення їх водою та структура ґрунту, поліпшується стан рослин, а також забезпечуються високі врожаї навіть при зниженому використанні добрив або взагалі при відсутності використання добрив.

Одна з найбільш важливих переваг способу згідно з даним винаходом полягає у його запровадженні при культивуванні рослин, при цьому практично немає необхідності у застосуванні добрив на основі азоту, фосфату та калію або таке застосування може бути знижене в значній мірі. Ефект забруднення навколишнього середовища добривами є очевидним. Сполуки, що біосинтезуються у клітинах мікроорганізмів, покращуючи рослинний розвиток, прискорюють розвиток оброблених рослин, розвиток кореневої системи, а також у той самий час поліпшується і забезпечення водою, мікроорганізми, що використовуються для підкорми пригнічують розвиток фітопатогенних мікроорганізмів, а полісахариди, що біосинтезуються у клітинах деяких з наших мікроорганізмів, поліпшують структуру ґрунту, водний баланс та особливо сприятливим чином. Препарати у відповідності з даним винаходом, їх одержання та застосування, на відміну від відомих препаратів та способів приготування, що мають таке саме застосування та призначені для тієї самої мети, ґрунтуються на використанні мікроорганізмів, що справляють різноманітні, відмінні між собою впливи, та які ізольовані з різних ґрунтів, при цьому вони справляють специфічний вплив на дану, економічно важливо рослину, яку піддають культивуванню, при цьому вказані мікроорганізми можуть також розмножуватися при низьких температурах восени та ранньою весною у зонах з більш холодним кліматом.

Мікроорганізми у відповідності з даним винаходом можуть культивуватися на середовищі, що містить джерело вуглецю, наприклад, глюкозу, крохмаль, сахарозу або мелясу, як джерело азоту - рідкий кукурудзяний екстракт, казеїн, дріжджовий екстракт або солі амонію, а також інші неорганічні солі та солі, що дисоціюють на іони та мікроелементи, але, як це є очевидним для спеціалістів, може використовуватися будь-яке засвоєване джерело вуглецю та азоту та неорганічні солі, що сприяють розмноженню бактерій згідно з винаходом.

Культура, що містить мікроорганізми згідно з винаходом, може бути внесена безпосередньо у ґрунт, який піддають обробці або під рослини у середовищі, яке використовується для культивування, при цьому також можуть бути приготовлені препарати, які підтримують біотичний потенціал мікроорганізмів, серед таких препаратів можна назвати такі препарати, що містять носій, який фіксує бактерії на насінні за допомогою адгезивних сил. Кількість бактерій, що вноситься у ґрунт, може варіювати від 5×10^{11} до 5×10^{15} клітин на гектар, найбільш сприятлива кількість клітин складає від 10^{12} до 10^{13} .

Згідно з Будапештським договором ми задепонували ізольовані мікроорганізми, що були виділені з різноманітного навколишнього середовища рослин та які також можуть розмножуватися при нижчих температурах, у Національній Колекції сільськогосподарських та промислових мікроорганізмів, при цьому вони були зареєстровані під наступними депозитними номерами:

Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B001293)
Azotobacter vinelandii spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292)
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296)
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295)
Bacillus megaterium var. M326 (NCAIM /P/ B 001291)
Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294)
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ P 001302) та
Streptomyces albus var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301).

Об'єм даного винаходу також поширюється на задепоновані групи та на їх штучні та природні мутанти, варіанти або також на лінії вказаних вище мікроорганізмів, що одержані будь-яким відомим шляхом.

Приведене нижче призначене для ілюстрації винаходу за допомогою прикладів, без обмеження об'єму захисту.

У прикладах проценти виражені у вагових процентах, якщо інше не вказано.

Приклад 1

Ізолювання мікроорганізмів, що фіксують азот повітря, з різноманітних ґрунтів та навколишнього середовища різноманітних рослин та підтвердження їх здатності до фіксації азоту

Види *Azospirillum* представляли собою бактерії, що мають негативне забарвлення за Грамом, та які здатні до відновлення азоту повітря до амонію в мікро-аерофільних умовах (у присутності 1-2% кисню), а також є здатними до того, щоб зробити його доступним для рослин.

Види *Azospirillum* були ізольовані з різних зразків ґрунтів (гумусних ґрунтів, лесових, натрієвих, коричневих та чорних ґрунтів, тощо), з частини ґрунту, що оточує кореневу систему різноманітних рослин (зернових культур, соняшника, кукурудзи, трав'яних культур, тощо). Хімічні аттрактанти, такі, як органічні кислоти та цукри, приваблюють групи *Azospirillum* шляхом хемотаксису. Допмагаючи собі за допомогою джгутіка, бактерії рухаються до коренів, та досягнувши їх, заселяють корені.

Готували 10-, 100-, 1000- та 10000- кратні розведення даних зразків ґрунту за допомогою стерильної дистильованої води, 100мкл суспензії поміщали у чашки Петрі, що містять м'який агар на основі MM та Nfb(II).

Склад середовища MM був наступним:

K ₂ HPO ₄	1,65г/л
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,29г/л
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0,07г/л
NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0,005г/л
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,007г/л
CoSO ₄ ×7H ₂ O	0,00014г/л
Глюкоза	5,0г/л
Бактоагар	20,0г/л
KH ₂ PO ₄	0,87г/л
NaCl	0,18г/л
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,01г/л
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,00014г/л
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,000125г/л
H ₃ BO ₃	0,00003г/л
Сахароза	5,0г/л

Глюкозу стерилізували окремо від інших компонентів середовища MM шляхом автоклавування (121°C, 30 хвилин), потім перемішували з іншими компонентами після охолодження до температури 60°C. Стерильне середовище доводили до значення pH 7,4, за допомогою стерильного 1N розчину NaOH.

Склад середовища Nfb(II) був наступним:

L-малеїнова кислота	5,0г
Гідрофосфат калію	0,5г
Сульфат магнію ×7H ₂ O	0,2г
Хлорид натрію	0,1г
Хлорид кальцію	0,02г
Розчин мікроелементів*	2,0мл
Бром-тимоловий блакитний (водний розчин	2,0мл
0,5% матеріалу, розчиненого у 0,2 N KOH)	
Розчин 1,564% Fe-ЕДТА	4,0мл
Розчин вітамінів **	1,0мл
Агар	1,75г

Середовище доводили до значення pH 6,8 1N водним розчином KOH. "Композиція мікроелементів була наступною:

Сульфат заліза (II) ×7H ₂ O	200мг
Хлорид заліза (III) ×6H ₂ O	10мг
Сульфат магнію ×H ₂ O	1мг
Сульфат міді ×5H ₂ O	2мг
NaMO ₄ ×2H ₂ O	1мг
Хлорид кобальту × 6H ₂ O	2мг
Сульфат цинку ×7H ₂ O	2мг
Тетраборат натрію ×10H ₂ O	1мг
P ₂ O ₅ ×24WO ₃ ×H ₂ O	0,5мг
Нітрат вісмуту ×5H ₂ O	0,1мг
Хлорид олова	0,01мг
Хлорид селену	0,01мг
Йодид калію	1мг
Лимонна кислота	100мг

Дистильована вода до 1000мл

"Композиція розчину вітамінів була наступною:

Вітамін С	50мг
Вітамін В ₁	5мг
Вітамін Е	2мг
Вітамін А	2мг
Біотин	4мг
Дистильована вода	100мл

Бактерії, що вирощувалися на середовищі ММ на чашках, переносили в анаеробні термостати шляхом заміни повітряного прошарку термостату на азот, потім доводили до концентрації кисню 1,6% за допомогою введення повітря задовільної якості. Чашки інкубували при температурі 32°C, після чого через 72 години ідентифікували організми *Azospirillum*. У відповідності до серії розведення на чашках з десятикратним розведенням суспензії розвивалося суцільне бактеріальне поле, у той час, як при 10000-кратному розведенні суспензії розвивалося тільки 30-50 культур. Культури *Azospirillum*, що відрізняються від інших дрібних культур бактерій та грибів, досягали розміру приблизно 3мм. За межами цих культур деякі були морфологічно подібними до культур *Azospirillum*. Деякі з них ми відбирали для подальшого дослідження.

Культури, що вирощувалися на м'якому агарі Nfb(II), поміщали в аеробний термостат у вказаному вище середовищі та при вказаних вище умовах культивування, перш за все розмножувалися *Azospirillum*, що мали характерну морфологію. Різноманітні групи бактерій *Azospirillum*, одержані з середовища ММ та Nfb(II), вирощували у відповідності з мікробіологічною практикою, таким чином, що первинна бактеріальна культура розмножувалася двічі в одній культурі на повному середовищі TAg. Групи бактерій *Azospirillum* очищали шляхом розмноження двічі в одній культурі на рідкому середовищі TAg та зберігали у групі культур. Бактеріальна суспензія, що зберігалася при температурі -80°C, вважалася групою культур та усі експерименти проводили з цією культурою. Склад середовища TAg був наступним:

Бактотриптон (Діфко)	1,0%
Дріжджовий екстракт (Діфко)	0,1%
NaCl	0,5%
Агар	2,5%

Після стерилізації додавали водні розчини наступних сполук у приведених заключних концентраціях:

0,1% 0,1M $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

0,1% 0,1M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

0,2% глюкоза (стерилізується окремо)

Після стерилізації рН розчину доводили до значення 7,0-7,2. Колонізацію коренів мікроорганізмами можна визначати шляхом простого експерименту. На коренях рослин кукурудзи та пшениці, що оброблені бактеріями *Azospirillum*, та які вирощувалися на стерильному перліті (горщики діаметром 15см) визначали рівну кількість клітин (1×10^{10} клітин на горщик) на основі підрахунку під мікроскопом, було встановлено, що вони характеризувалися суттєво більшою колонізацією, ніж для контролів. Колонізація коренів мала місце на основі специфічних механізмів впізнання. У випадку колонізації клітини *Azospirillum* проходили у матрикс коренів і тут - шляхом активної фіксації азоту-могли покривати частину потреби в азоті основних рослин (асоціативна фіксація азоту). Це підтверджувалося підвищенням ростом зеленої маси кукурудзи та пшениці, інокульованої групами *Azospirillum* у випадку лабораторних експериментів, результати яких викладені у деталях нижче. *Azospirillum* продукує рослинні гормони та агенти, що також поліпшують ріст. Підвищення рівня продукції цих агентів та їх сприятливий ефект на основні групи рослин може бути проілюстрований підвищеною здатністю до розмноження та більш інтенсивним ростом рослин у випадку експериментів, які проводилися у лабораторних умовах.

Морфологічні характеристики ізольованих видів *Azospirillum* можуть бути знайдені у загальній частині опису.

При селективному культивуванні на м'якому агарі на основі середовища Nfb(II), а також на вільному від азоту середовищі ММ при селективному культивуванні мікроорганізми *Azospirillum* були ізольовані зі зразків орних земель. Ці групи були ідентифіковані як такі, що відносяться до виду *Azospirillum brasilense* згідно зі систематичними характеристиками та спектром використання джерела вуглецю, згідно з більш високою здатністю до фіксації молекулярного азоту повітря у відповідності з оцінкою SW5-01-07, крім того, як описується нижче, були ізольовані варіанти, що також розмножуються при низьких температурах та біосинтезують полісахариди, один з таких варіантів був задепонований.

Для ізоляції груп *Azospirillum* у доповнення до використання середовища Nfb(II) та ММ композиції, що приведена вище, зразки ґрунту також культивували на середовищі Федорова, при цьому *Azotobacter* показав характерні морфологічні властивості. Склад середовища Федорова був таким, як приведено нижче:

Дигідрофосфат калію	0,03%
Гідрофосфат кальцію	0,02%
Сульфат калію	0,02%
Сульфат магнію $\times 7\text{H}_2\text{O}$	0,03%
Карбонат кальцію	0,5%
Хлорид натрію	0,05%
Хлорид заліза (III)	0,02%
Молібденат натрію	0,0002%
Манітол	2,0%
Бактоагар	2,0%

Значення рН середовища перед стерилізацією доводили до 7,0 за допомогою 1N гідроксиду натрію.

На м'якому агарі на основі Nfb(II) при селективному культивуванні, а потім при селективному культивуванні на вільному від азоту середовищі ММ та середовищі Федорова, мікроорганізми *Azotobacter vinelandii* згідно з систематичними характеристиками та спектром джерел вуглецю, що можуть використовуватися, вони можуть фіксувати молекулярний азот повітря у великій кількості та були позначені, як M65-01-34, крім того, як описується нижче, нами були ізольовані варіанти, що також розмножуються при низьких температурах та біосинтезують полісахариди, один з таких варіантів був задепонований.

Здатність груп *Azospirillum* та *Azotobacter* до фіксації азоту також визначали за допомогою методу відновлення ацетилену. Згідно з методом [Dilworth M.J., J.Biochem. Biophys. Acta, 27,285, 1996] ацетилен вводять у культуру, що знаходиться у закритих чашках, за допомогою пристрою для введення, потім після

інкубації протягом 12 годин, 0,25мл газової суміші вводять у колонку Porapak N газового хроматографа Перкін-Елмер. Концентрації ацетилену та етилену газової суміші визначають за допомогою детектора водню з іонізацією полум'ям. З висоти піків ацетилену та етилену можна зробити чіткий висновок стосовно складної ферментативної активності нітрогенази. Наші групи *Azospirillum* та *Azotobacter* відновлювали протягом 1 години ацетилен у кількості від 15 до 85 нмоль до етилену.

Група *Bradyrhizobium* була ізольована 13 липня 2000 року від рослин сої, які вирощувалися у Шубаші поблизу Серед-Кішкундоросма. З рослин, які вирощувалися на лесових ґрунтах, були відібрані розвинуті рослини, з їх коренів видаляли розвинуті бульбочки. Бульбочки промивали дистильованою водою, подрібнювали, а потім частинки суспендували у розчині фізіологічної солі. З суспензії у стерильних умовах готували серії розведення та вносили у повне середовище. Здатність до фіксації азоту культур, які вирощували після інкубації протягом 48 годин у так званих умовах тестування рослин на симбіоз визначали як описано нижче: поверхню комерційного насіння люцерни (*Medicago sativa*) піддавали стерилізації за допомогою теплової обробки шляхом витримання протягом 2 годин при температурі 72°C, а потім обережно промивали за допомогою розчину Гіпо, що має концентрацію 20%, потім пророщували у середовищі на основі дистильованої води, що містить 1% агару. Проростки поміщали на 1,5% агарові косяки Гібсона (дивися нижче) та вирощували у теплиці протягом тижня. Кожну рослину віком один тиждень піддавали інокуляції клітинами бактеріальної культури та знову вирощували у теплиці протягом подальших восьми тижнів. З груп, які належать трьом рослинам, що продемонстрували значний оптимальний розвиток (суха маса частин коріння складала 22-26мг на противагу до контрольних рослин, для яких це значення складало 3-5мг), три з цих груп були відібрані на основі їх властивостей, які є важливими з морфологічної та систематичної точок зору. Ми визначили ці мікроорганізми як *Bradyrhizobium japonicum* var. PH-2-1-3.

Приклад 2

Ізоляція мікроорганізмів, які сольобілізують фосфат та калій

Зразки ґрунту збирали у різних частинах земної поверхні. Водні суспензії зразків вносили у середовище TAg (див. вище), а потім визначали морфологію клітин ізольованих матеріалів культур *Pseudomonas* та *Bacillus*.

Різноманітні групи *Pseudomonas* та *Bacillus* піддавали очистці у відповідності з мікробіологічною практикою шляхом кількаразового засівання первинної бактеріальної культури на одиничній культурі на повному середовищі TAg. Розмножували одержані бактеріальні групи при засіванні рідкого та твердого середовища TAg, та зберігали їх очищеними.

Властивість мікроорганізмів мобілізувати фосфат перевіряли на середовищі поживного агару (Оксоїд), що містить 1% гідроксиапатиту, з модифікацією Піковської (HP), що також доповнене 10% трикальцій фосфатом та глюкозою (0,2%).

Склад середовища, що використовувався під час експериментів, був наступним:

Модифіковане середовище Піковської:

Гідроксиапатит	1,0%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05%
NaCl	0,02%
KCl	0,02%
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,01%
Дріжджовий екстракт	0,05%
Агар	1,5%
Глюкоза (стерилізується окремо)	1,0%

Розчини наступних сполук додавали до середовища після стерилізації:

1% 20мг/100мл FeSO₄ × 7H₂O

1% 40мг/100мл MnSO₄ × H₂O

Перед стерилізацією значення pH середовища доводили до 7,2.

Наохг: поживний агар (Оксоїд), приготовлений у відповідності з інструкціями виробника + 0,2% глюкози.

Під час визначення здатності до розчинення фосфату груп, які були відібрані у ході попередніх експериментів на середовищі Піковської (HP), культури, що вирощували протягом 3-4 днів при температурі 30°C, давали на середовищі кільця розчинення - розміром 29 та 38мм. Клітинні суспензії однакових груп, одержаних з агарових косяків на основі середовища TAg, з 1мл дистильованої води занурювали у заглиблення, зроблені на пластинах Naohg, що доповнений 10% трикальцій фосфатом (0,1мл/заглиблення). При інкубації культур при температурі 30°C протягом 2-3 днів можна було спостерігати видимі кільця розчинення. Їх розмір складав 24мм при використанні груп *Pseudomonas* та 26мм, коли ми використовували групи *Bacillus*, середній розмір, якого досягали кільця, складав 34мм.

Кожна індивідуальна група *Pseudomonas* та деякі групи *Bacillus* були підтверджені як такі, що володіють властивостями інтенсивної сольобілізації фосфату. У розчині також добре визначалися групи, які містили обидва варіанти, що володіють відмінною здатністю розчиняти неорганічний фосфат, таким чином, їх можна визначити як такі, що володіють відмінними властивостями до розчинення фосфату.

На основі їх систематичних характеристик та спектру джерел вуглецю, що можуть використовуватися, з урахування дослідів, були відібрані чотирнадцять мікроорганізмів *Pseudomonas* та двадцять п'ять мікроорганізмів *Bacillus*, вони були ідентифіковані як такі, що є *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus polymyxa*, а також *Bacillus megaterium*, вказані варіанти позначали як SW1-1-14, SW17-1-15 та M32-1-10, вони розмножуються при низькій температурі, а також біосинтезують полісахариди у великій кількості, і ці групи були ізольовані та задепоновані.

Ізоляцію мікроорганізмів, що мобілізують іони калію, проводять так, як описано вище, з тією різницею, що з середовища Піковської (HP), склад якого наведений вище, виключається хлорид калію та додається роздірблений у тонкий порошок польовий шпат та слюдовий сланець замість гідроксиапатиту.

В оточуючому середовищі культур мікроорганізмів, що несуть неорганічні солі, які повністю нерозчинні у

воді або лише частково розчиняються у розчині, буде утворюватися прозора зона.

Були відібрані деякі з цих мікроорганізмів, на основі систематичних, морфологічних характеристик та спектру джерел вуглецю, що може використовуватися, вони були ідентифіковані як такі, що належать до родів *Bacillus* та *Streptomyces*, наші 15 груп були позначені як такі, що мають номер 1-015-0003, потім, як описано нижче, були ізолювані варіанти, які розмножуються при низькій температурі, один з них було задепоновано.

Приклад 3

Ізоляція мікроорганізмів, що продукують сидерофори та рослинні гормони

Здатність до продукції сидерофору та гормонів у груп, ізолюваних так, як описано у Прикладах 1 та 2, була перевірена при використанні середовища Кінг В. Композиція була такою, як приведено нижче:

Пептон	2%
Гліцерин	1%
K ₂ PO ₄	0,15%
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,15%
Агар	2%

Перед стерилізацією рН середовища доводили до рН 7,2 за допомогою розчину гідроксиду натрію.

Групи *Pseudomonas*, які продукують сидерофори, фіксували іони заліза, які вони передавали рослинам у ґрунтах, збіднених на залізо. Крім того, вони, інгібують розмноження деяких фітопатогенних мікроорганізмів, таких як *Erwinia caratovora*, оскільки вони не можуть використовувати фіксоване залізо. Ми тестували продукцію сидерофору шляхом інгібування росту групи *Escherichia coli* MC1061. Клітинні суспензії двох груп з агарової культури готували при використанні дистильованої води, а потім культивували протягом 48 годин при температурі 28°C, вносячи у комірки планшета (30-50мкл), що містять середовище Кінг В, вільне від заліза, та середовище, що містить залізо (1мкМ FeCl₃ × 7H₂O), та після цього, засіваючи планшет культурою мікроорганізмів *E.coli* MC106, що одержана при культивуванні на TAg агарі та подальшій інкубації протягом додаткових 28 годин при температурі 28°C. Навкруги культур спостерігали різноманітні зони інгібування. Сумарні дані чотирьох експериментів представлені на Таблиці 1, при цьому як негативний контроль використовували *Bacillus megaterium*, як позитивний контроль . *Pseudomonas fluorescent*.

Таблиця 1

Мікропор-ганізм	Зона інгібування на середовищі Кінг В	Зона інгібування на середовищі Кінг В +1мкМ FeCl ₃
SW1-1-6	++++	-
SW1-1-12	++	-
P.fluores.	+	-
B.megater.		-

*Позначення інгібування: - відсутнє, + низький, ++ та +++ високе та дуже високе

У випадку тестування продукції сидерофору за допомогою mob4 та групи позитивного контролю спостерігали зону значного інгібування, яка усувалася у присутності іонів заліза.

Як вказується вище, деякі групи *Pseudomonas* продукують рослинні гормони. Вибрані мікроорганізми тестували на здатність до біосинтезу гіберелінової кислоти на TAg середовищі складу, що приведений вище. Аналізи проводили при використанні гіберелінової кислоти А стандарту (Sigma), шляхом тонкошарової хроматографії на силікагелі (40мкг/мл) (Merck). Після екстракції культур етилацетатом проводили екстракцію подвійним об'ємом карбонату гідроксиду натрію, а потім у розчині з рН 2,5 знову за допомогою етилацетату. У залишку екстракту, що одержаний за допомогою випарювання, були виявлені наступні групи плям, що мали значення R_f, близькі до стандартних.

Таблиця 2

Група	R _f	Розмір плями (мм ²)
Стандарт	0,41	24
SW1-1-6	0,46	17
M32-1-9	0,42	27
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,49	14
<i>Bacillus megaterium</i>	0,57	7

Були відібрані групи, позначені, як SW1-1-6 та M32-1-9 (вони виробляли приблизно 3-15мкг гормону на мілілітр).

Описані групи були досліджені та ідентифіковані з систематичної точки зору так, як описано у загальній частині.

Приклад 4

Ізоляція мікроорганізмів, які продукують екстра-целюлярний полісахарид

4А. Відбір мікроорганізмів *Bradyrhizobium*

Групи *Bradyrhizobium* PH2-1-3 засівали на середовище, що містить 1% глюкози та 1% сахарози (див. Вище) та визначали кількість полісахариду (слизький) навколо культур. Відбирали групи PH2-1-1 та -2, що біосинтезують полісахариди.

4В. Ізоляція Bacillus

Bacillus M32-1-10 та SW17-1-15 засівали на середовище, що містить 1% глюкози та 1% сахарози (див. Вище) та визначали кількість полісахариду (слизький) навколо культур. Відбирали групи M32-1-6, 8, 10 та SW17-1-7, 11, 15, що біосинтезують полісахариди. Ізольовані мікроорганізми були підтверджені як такі, що відносяться до *Micrococcus roseus*, вони біосинтезують на повному середовищі, що містить глюкозу та сахарозу велику кількість полісахариду, перетворюючи культуральне середовище у слизький матеріал.

Вибрані групи згідно з нашими дослідженнями біосинтезують розчинний полісахарид сукциноглюконового типу відомої структури.

Приклад 5

Ізоляція стійких до холоду мікроорганізмів

Мікроорганізми, відібрані у відповідності з Прикладами 1-4, обробляли за допомогою мутаційного агенту та радіації. Суспензії мікроорганізмів, приготовлені на дистильованій воді, обробляли за допомогою 0,01, 0,1, 1,0, 10 та 100мкг/мл нітрозоганідину протягом 1, 3, 5, 10 та 30 хвилин. Після обробки клітинні суспензії центрифугували, двічі промивали дистильованою водою, а потім клітини висівали на культуральне середовище TAg. Повторювали обробку з клітинними суспензіями на основі дистильованої води, що містять 10^9 мікроорганізмів на мілілітр, витримуючи клітини протягом 1, 3, 5, 10 та 30 хвилин під ультрафіолетовою лампою на 15W, на відстані 10 см від неї. Клітинні суспензії висівали на культуральне середовище TAg у серійних розведеннях.

TAg культури інкубували при температурі 18°C протягом 192 годин, після цього ізолювали найбільші культури на косяках TAg агару та інкубували при температурі 18°C. Контролювали та підтримували наступні ростові культури.

Крім ізольованих, були відокремлені та задепоновані відібрані та стійкі до холоду мікроорганізми:

Azospirillum brasilense ssp. SW51 (NCAIM /P/ B001293),
Azotobacter vinelandii spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292),
Pseudomonas fluorescens var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296),
Bacillus polymyxa var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295),
Bacillus megaterium var. M326 (NCAIM /P/ B 001291),
Micrococcus roseus ssp. A21 (NCAIM /P/B 001294),
Bradyrhizobium japonicum var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302),
Streptomyces albus var. 0003LP (NCAIM /P/ B 001301).

Приклад 6

Культивування мікроорганізмів

6А. Культивування на повному культуральному середовищі:

Готували агарові косяки на основі культурального середовища TAg, потім інкубували при температурі 30°C протягом 48 годин. Культури *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* або *Micrococcus* інокулювали культуральне середовище, позначене як Talі, що має наступний склад:

Глюкоза (окремо стерилізується у вигляді 50%-ного водного розчину)	1,5%
М'яса	1,5%
Кукурудзяний екстракт (50% сухої речовини)	0,2%
Основний дріжджовий екстракт	0,2%
Кислий казеїн	0,1%
Сульфат амонію	0,1
Нітрат амонію	0,1%
Карбонат кальцію	0,3%
Дигідрофосфат калію	0,1%
Хлорид натрію	0,1%
Сульфат магнію $\times 7H_2O$	0,1%
Пальмова олія	0,2%

Порції 100-100мл культурального середовища вносили у колби Ерленмейєра на 500мл, потім стерилізували при температурі 121°C протягом 30 хвилин. Стерильне культуральне середовище інокулювали за допомогою мікроорганізмів, вирощених на агарових косяках та культивування проводили при температурі 25°C на обертовій качалці при швидкості 260 обертів за хвилину протягом 36 годин. За ростом спостерігали під мікроскопом, потім використовували 5% інокулюму, який вносили в основне ферментаційне культуральне середовище наступного складу:

Глюкоза (окремо стерилізується у вигляді 50%-ного водного розчину)	2,5%
Рідкий кукурудзяний екстракт (50% сухої речовини)	1,5%
Основний дріжджовий екстракт	0,4%
Кислий казеїн	0,4%
Сульфат амонію	0,2%
Нітрат амонію	0,2%
Карбонат кальцію	0,3%
Дигідрофосфат калію	0,2%
Хлорид натрію	0,1%
Сульфат магнію $\times 7H_2O$	0,2%
Розчин мікроелементів*	0,45%

Пальмова олія 0,2%

*Композиція мікроелементів у відповідності з Прикладом 1.

Культуральне середовище у кількості 100мл у колбах Ерленмейєра, у лабораторному ферментаторі загальним об'ємом 10л, та чистим з об'ємом 5л стерилізували за умов, що приведені вище.

Культури, які були внесені у колби, культивували на ротаційній качалці, та у ферментаторах звичайним чином, при об'ємній аерації та шляхом керування турбо змішувачем з подвійним входом, при режимі 360 обертів за хвилину протягом 24 годин, до тих, пір, поки кількість клітин на мілілітр - в залежності від виду бактерії - не досягала значень 4×10^8 - $1,3 \times 10^9$.

Для приготування культур більших об'ємів, 10 літрів культур готували на культуральному середовищі Та1і, що має склад, наведений вище, в умовах ферментації, які приведені раніше, потім 100л стерилізованого середовища Та1і та 100 літрів культурального середовища Та1f інокулювали за допомогою 5-5 літрів кожне. Культивування продовжували протягом 24 годин в приведених вище умовах ферментації, потім культуру, вирощену на культуральному середовищі Та1f у ґрунті, 50 літрів культури, вирощеної на культуральному середовищі Та1і, використовували для інокуляції 1000 літрів стерилізованого середовища Та1f. Культивування здійснювали в умовах ферментації, що вказані вище, протягом 24 годин, потім після перевірки культура є готовою до використання. У випадку незвичайного інтенсивного піноутворення, додавали 0,01% пропіленгліколю як антиспінувального агенту.

6В. Культивування напівмінімального культурального середовища:

Метод, приведений у Прикладі 6, повторювали з тією різницею, що замість культурального середовища Та1f використовували культуральне середовище Та2f наступного складу:

Глюкоза (окремо стерилізується у вигляді 50%-ного водного розчину)	1,5%
Меляса	0,5%
Кислий казеїн	0,1%
Сульфат амонію	0,7
Нітрат амонію	0,5%
Карбонат кальцію	0,3%
Дигідрофосфат калію	0,3%
Хлорид натрію	0,1%
Сульфат магнію $\times 7H_2O$	0,2%
Розчин мікроелементів*	0,35%
Пальмова олія	0,2%

* Композиція мікроелементів у відповідності з Прикладом 1.

Після завершення культивування культури містили, в залежності від бактерії, $1-7 \times 10^8$ клітин на мілілітр.

Приклад 7

Дослідження по поліпшенню структури ґрунту та культивуванню рослин

7А. Експерименти по поліпшенню структури ґрунту

Піщані ґрунти збирали у Данубе, поблизу Шомлюсигету, глинисті ґрунти з Ештергому, їх поміщали у лотки розміром 90×90см з товщиною шару 25см. Піщані ґрунти оброблювали 10г нітрату амонію та 5г фосфату кальцію на лоток. Висівали кукурудзу у лоток при нормі 104 насінини на лоток. При оцінці не враховували дані стосовно п'яти найбільш розвинутих та п'яти найменш розвинутих рослин. Визначали масу коренів, промитих за допомогою дистильованої води та просушених протягом двох днів при температурі 45°C. Лоток №1 рясно поливали водою, лоток №2 рясно поливали при засіванні, але не пізніше. Лотки, які позначали як „а“, інокулювали мікроорганізмами, при цьому як мікроорганізми, що біосинтезують полісахариди, використовували мікроорганізми групи *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001292), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ B 001294) та *Bradyrhizobium* var. PH25 (NCAIM /P/ B 001302), що були задекларовані у Національній Колекції сільськогосподарських та промислових мікроорганізмів, які були приготувані у відповідності з Прикладом 6, у кількості 10^8 клітин кожної бактерії на один квадратний метр. Лотки, позначені як „b“, не обробляли мікроорганізмами.

У Таблиці 3 представлені результати, одержані на тридцять третій день після засівання. Результати показують середні значення, підраховані для однієї рослини.

Таблица 3

Ґрунт	Лоток	Обробка	Висота (см)	рослини Вага кореневої системи (мг)
Піщаний	№1	A	24	945
		B	17	634
	№2	A	18	866
		B	11	757
Глинистий	№1	A	27	1095
		B	23	1213
	№2	A	20	1012
		B	19	689

У Таблиці 4 представлені значення розкришування та розтріскування піщаних та глинистих ґрунтів, які не піддавали поливанню (лотки 2). Під значенням розкришування ми розуміємо, що основна кількість фрагментів ґрунту розпадається на аркуші паперу, при цьому фрагменти, що не розпадаються при слабкому струшуванні, мають розмір менше 2мм (-), від 2 до 5мм (+), більше 5мм (++). Значення розтріскування поверхні ґрунту позначається як ++ у випадку відсутності розтріскування, поява слабких тонких тріщин позначається як +, у той

час, як присутність великих ліній тріщин характеризує рівень розтріскування сухих ґрунтів зі значенням.

Таблиця 4

Ґрунт	Обробка	Значення розкришування	Значення розтріскування
Піщаний	A	+	+
	B	-	-або +
Глинистий	A	++	+
	B	++	++

З даних, представлених у Таблицях 3 та 4, видно, що присутність мікроорганізмів, які біосинтезують полісахариди, поліпшує розвиток рослин та сприятливо впливає на структуру ґрунту.

7В. Польові експерименти

Експерименти проводили на технологічній станції з удосконалення та культивування Університету у Мошонмагіароварі у 2000 році у випадкових експериментах з розділенням на блоки, які повторювали чотири рази, при використанні 10 літрів суміші на гектар.

Тип експериментального ґрунту: район Данубе, товщина ґрунту: 120-140см, вміст гумусу 2,4%, низка кількість опадів.

ВЕСНА. ПШЕНИЦЯ

Вміст білка %	
Контроль	11,80
НРК 200 кг/га	11,87
Бактофіл А	11,96
Вміст білка, скорегований до сухої речовини %	
Контроль	13,84
НРК 200 кг/га	13,91
Бактофіл А	14,00
Вологий глютеїн %	
Контроль	32,0
НРК 200кг/га	31,1
Бактофіл А	31,1
Вага однієї тисячі зернин (г)	
Контроль	36,4
НРК 200 кг/га	36,8
Бактофіл А	36,4
Розмелювання, %	

Контроль	50,5
НРК 200кг/га	50,0
Бактофіл А	49,8
Значення випадання зернин (сек.)	
Контроль	278,3
НРК 200кг/га	281,5
Бактофіл А	272,5
Розплющування клейковини (см)	
Контроль	2,75
НРК 200 кг/га	3,25
Бактофіл А	2,75
Розтягнення клейковини (см)	
Контроль	12,5
НРК 200кг/га	11,8
Бактофіл А	12,3
Індекс зеленої маси	
Контроль	30,0
НРК 200кг/га	30,3
Бактофіл А	30,8
Валориграфічна здатність до г адсорбції води (мл)	
Контроль	31,3
НРК 200кг/га	31,6
Бактофіл А	31,4
Валориграфічне значення	
Контроль	57,3
НРК 200 кг/га	53,1
Бактофіл А	48,0

Об'єм листової поверхні (см ²)	
Контроль	962,5
НРК 200кг/га	977,5
Бактофіл А	1055,0
Морфологічні пропорції хліба	
Контроль	2,38
НРК 200кг/га	2,46
Бактофіл А	2,32
Вихід білка (кг/га)	
Контроль	469,8
НРК 200кг/га	498,6
Бактофіл А	510,3
Висота рослин (см)	
Контроль	56,3
НРК 200кг/га	57,7
Бактофіл А	55,4
Рослинний врожай, підрахований при 13%-ній вологості (г/ділянка)	
	Врожай зерна (т/га) Контроль %
Контроль	3,398 100,0
НРК 200кг/га	3,584 105,5
Бактофіл А	3,646 107,3
Вміст води у зібраному врожаї, %	
Контроль	14,08
НРК 200кг/га	14,00
Бактофіл А	13,93
Тестова вага (кг)	
Контроль	69,8
НРК200 кг/га	70,4

КУКУРУДЗА		
Сировий врожай у початках (кг/ділянка)		
	Сировий врожай у початках (т/га)	Контроль %
Контроль	5,496	100,0
НРК 200кг/га	6,614	120,3
Бактофіл А	6,175	112,3
Врожай зерна, підрахований при 14%-ній вологості (кг/ділянка)		
	Врожай зерна (т/га)	Контроль %
Контроль	5,496	100,0
НРК 200кг/га	6,614	120,3
Бактофіл А	6,175	112,3
Вміст води у зерні %		
Контроль	18,40	
НРК 200кг/га	17,78	
Бактофіл А	19,63	
Вага кочанів (кг/ділянка)		
	Вага кочанів (т/га)	Контроль %
Контроль	2,672	100,0
НРК 200кг/га	3,016	112,9
Бактофіл А	2,886	108,0
Вміст води у кочанах, %		
Контроль	26,1	
НРК 200кг/га	25,6	
Бактофіл А	25,9	
Вага кочанів, підрахована при 14%-ній вологості (кг/ділянка)		
	Вага кочанів (т/га)	Контроль %
Контроль	2,416	100,0
НРК 200кг/га	2,740	113,4
Бактофіл А	2,613	108,2
Кількість стебел (тисячі/га)		
Контроль	38,41	

НРК 200кг/га	39,13	
Бактофіл А	39,86	
Кількість кочанів на стебло (шт./ділянка)		
Контроль	1,04	
НРК 200кг/га	1,10	
Бактофіл А	1,05	
Кількість кочанів (тисячі/га)		
Контроль	39,86	
НРК 200кг/га	42,93	
Бактофіл А	42,03	
Вага тисячі зерен невисушеного зерна (г)		
Контроль	255,2	
НРК 200кг/га	259,2	
Бактофіл А	263,3	
Вага тисячі зернин при 14%-ній вологості (г)		
Контроль	245,6	
НРК 200кг/га	250,9	
Бактофіл А	251,0	
Сирова тестова вага (кг)		

Контроль	65,9	
НРК 200кг/га	65,1	
Бактофіл А	64,6	
Вага одного кочана при 14%-ній вологості (кг)		
Контроль	0,121	
НРК 200кг/га	0,136	
Бактофіл А	0,131	
Кількість зернин на кочан		
Контроль	493,5	
НРК 200кг/га	545,1	
Бактофіл А	523,1	
Вміст води у кочані, %		
Контроль	19,4	
НРК 200кг/га	20,7	
Бактофіл А	18,9	
Вага кочана (г)		
Контроль	22,3	
НРК 200 кг/га	22,3	
Бактофіл А	22,4	
Індекс врожайності		
Контроль	44,1	
НРК 200кг/га	41,5	
Бактофіл А	42,3	

ЦУКРОВИЙ БУРЯК

Кількість рослин цукрового буряка на гектар		
Контроль	79891	
НРК 200кг/га	81159	
Бактофіл А	83696	

Врожай надземної частини (кг/ділянка)		
	Врожай надземної частини (т/га)	Контроль %
Контроль	13,41	100,0
НРК 200кг/га	13,96	104,1
Бактофіл А	15,38	114,7
Врожай підземної частини (кг/ділянка)		
	Врожай підземної частини (т/га)	Контроль %
Контроль	30,46	100,0
НРК 200 кг/га	36,74	120,6
Бактофіл А	39,35	129,2

Співвідношення надземна частина-підземна частина
--

	Співвідношення надземна частина-підземна частина	Контроль %
Контроль	0,443	100,0
НРК 200кг/га	0,381	85,9
Бактофіл А	0,391	88,2
Середня вага коренів (декаграми)		
	Середня вага коренів (декаграми)	Контроль %
Контроль	38,2	100,0
НРК 200кг/га	45,3	118,6
Бактофіл А	47,1	123,5
Перетравлення %		
	Перетравлення %	Контроль %
Контроль	11,61	100,0
НРК 200кг/га	11,07	95,3
Бактофіл А	10,59	91,3
Вміст натрію (мг/100г цукрового буряка)		
Контроль	1,94	
НРК 200 кг/га	2,28	
Бактофіл А	2,08	
Вміст альфа-аміно-N (мг/100г цукрового буряка)		
Контроль	1,20	
НРК 200 кг/га	1,02	
Бактофіл А	1,02	
Вміст калію (мг/100г цукрового буряка)		
Контроль	2,52	
НРК 200 кг/га	1,89	
Бактофіл А	2,10	
Втрати %		
Контроль	2,95	
НРК 200 кг/га	2,68	
Бактофіл А	2,68	
Вміст очищеного цукру %		
	Вміст очищеного цукру %	Контроль %
Контроль	8,66	100,0
НРК 200 кг/га	8,39	96,9
Бактофіл А	7,92	91,4
Сумарний вихід цукру (т/га)		
	Сумарний вихід цукру (т/га)	Контроль %
Контроль	3,557	100,0
НРК 200 кг/га	4,081	114,7
Бактофіл А	4,181	117,5
Контроль	2,656	100,0
НРК 200 кг/га	3,091	116,4
Бактофіл А	3,125	117,7

Приклад 8

Приготування препаратів, то містять мікроорганізми у відповідності з винаходом

8А. Приготування суміші мікроорганізмів:

Культури *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM 191 B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. A21 (NCAIM /P/ 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ P 001302) та *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301), приготовлені у відповідності з Прикладом 6, перемішували, оптимально у рівних

співвідношеннях, та застосовували на ґрунтах для обробки у кількості від 5 літрів до 50 літрів, оптимально у кількості 12 літрів/га, у будь-яку пору року, коли не має морозів, оптимально у період від березня до жовтня.

8В. Препарат для обробки однодольних рослин.

Після проведення процедури у відповідності з Прикладом 6 препарат готували з тією різницею, що використовували наступні мікроорганізми *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291) та *Streptomyces albus* var. 0003 LP (NCAIM /P/ B 001301).

8С. Препарат для обробки дводольних рослин.

Після проведення процедури у відповідності з Прикладом 6 препарат готували з тією різницею, що використовували наступні мікроорганізми *Azospirillum brasilense* ssp. SW51 (NCAIM /P/ B 001293), *Azotobacter vinelandii* spp. M657 (NCAIM /P/ B 001292), *Pseudomonas fluorescens* var. SW11 (NCAIM /P/ B 001296), *Bacillus polymyxa* var. SW17 (NCAIM /P/ B 001295), *Bacillus megaterium* var. M326 (NCAIM /P/ B 001291), *Micrococcus roseus* ssp. (NCAIM /P/ B 001294), *Bradyrhizobium japonicum* var. PH25 (NCAIM /P/ P 001302), при цьому готували препарати у відповідності з винаходом.

8D. Приготування препарату, висушеного в умовах заморожування

2 літри водної суспензії мікроорганізмів у відповідності з Прикладом 6 піддавали ліофілізації на обладнанні для ліофілізації фірми Gelman SP354, діючи у відповідності з інструкціями використання обладнання, перемішували з карбонатом кальцію, крохмалем, глюкозою або целюлозою у співвідношеннях від 1:1 до 1:100, зберігаючи препарати до використання при температурі від 4 до 10°C.

8Е. Приготування препарату, що містить носій:

Оптимально рівні частини культур, приготовлені на культуральному середовищі згідно з Прикладом 6, перемішували з органічним добривом, соєвим борошном (загальний розмір зерен 4 меш), метилцелюлозою або картопляним крохмалем так, щоб препарат містив 5×10^8 - 10^{10} , оптимально 5×10^9 клітин мікроорганізмів, потім вологий препарат або препарат, висушений при температурі нижче 40°C, у кількості від 2 до 20, оптимально у кількості 5кг/га, вносили у ґрунт, який піддають обробці. Оптимально, принаймні, 10^{13} клітин мікроорганізмів на гектар вносили у ґрунт.

Резюме

Об'єкт даного винаходу представляє собою продукти та спосіб для обробки ґрунту за допомогою бактерій для поліпшення росту рослин та для збільшення врожаю, способи приготування продуктів, матеріалів мікроорганізмів для зберігання, що служать як основа для продуктів, які розмножуються при низькій температурі, біосинтезують полісахариди та способи для їх одержання. Клітини одного з мікроорганізмів у відповідності з винаходом або їх композиція, може бути внесена у ґрунт або нанесена на насіння рослин.

За допомогою способу згідно з винаходом продукт може бути внесений у ґрунт, при цьому продукт містить, принаймні, одну групу ґрунтових бактерій, що перетворюють азот повітря на сполуки, доступні для рослин, розчиняють неорганічні фосфатні та калійні сполуки та біосинтезують матеріали, що поліпшують розвиток рослин, продукуючи при цьому полісахариди, які оптимально впливають на структуру ґрунту, при цьому вказані мікроорганізми ізольовані з різноманітних ґрунтів та піддані змінам у лабораторних умовах, таким чином, досягають задовільного врожаю, практично виключаючи застосування дорогих добрив.