



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94389 (13) C2

(51) МПК

A01C 1/06 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) РІДКІ БАКТЕРІАЛЬНІ ІНОКУЛЯНТИ З ПІДВИЩЕНИМ ТЕРМІНОМ ПРИДАТНОСТІ І ПІДВИЩЕНОЮ СТАБІЛЬНІСТЮ НА НАСІННІ**

1

(21) а200708281

(22) 14.11.2005

(24) 10.05.2011

(86) PCT/US2005/041003, 14.11.2005

(31) 11/020,714

(32) 23.12.2004

(33) US

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) ПІРС ДЖЕРЕМІ ДЕВІД, GB, КАРПЕНТЕР МЕРІ  
ЕНН, GB

(73) БЕКЕР АНДЕРВУД ІНК., US

(56) US 5695541 A, 09.12.1997

(57) 1. Спосіб одержання препарату частково зневодненого рідкого інокулянту, де зазначений спосіб включає:

одержання рідкого інокулянту бактерій, вирощених до по суті стаціонарної фази; і  
додавання, у кількості, достатній для часткового зневоднення рідкого інокулянту, зневоднювальної добавки, що включає десикант, до рідкого інокулянту для одержання препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

2. Спосіб за п. 1, де бактерії являють собою бактерії одного або декількох родів із *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pasteuria*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Methylobacterium* і *Cyanobacteria*.

3. Спосіб за п. 1 або 2, де водна активність препарату частково зневодненого рідкого інокулянту складає менше ніж приблизно 0,990.

4. Спосіб за п. 1, де водна активність препарату частково зневодненого рідкого інокулянту складає менше ніж приблизно 0,980.

5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де рідкий інокулянт одержаний введенням бактерій у рідке поживне середовище з одержанням бактеріальної культури; і інкубуванням бактеріальної культури для забезпечення можливості росту бактерій до по суті стаціонарної фази з одержанням таким чином рідкого інокулянту.

6. Спосіб за п. 5, де інкубування бактеріальної культури проводиться протягом від приблизно 2 днів до приблизно 7 днів.

2

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де десикант являє собою одну або декілька сполук, вибраних з невідновлювальних цукрів і спиртів, які належать до групи цукру.

8. Спосіб за п. 1, де десикант включає суміш двох або більше сполук, вибраних із трегалози, сахарози, гліцерину, триетиленгліколю і маніту.

9. Спосіб за п. 1, де десикант являє собою одну або декілька сполук, вибраних із трегалози, сахарози, гліцерину, триетиленгліколю і маніту.

10. Спосіб за п. 9, де кількість десиканту складає від приблизно 5 % до приблизно 50 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

11. Спосіб за п. 9, де десикант включає трегалозу.

12. Спосіб за п. 11, де кількість трегалози складає від приблизно 10 % до приблизно 40 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

13. Спосіб за п. 12, де кількість трегалози складає від приблизно 20 % до приблизно 30 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

14. Спосіб за п. 8, де десикант включає суміш трегалози і гліцерину.

15. Спосіб за п. 14, де кількість трегалози складає від приблизно 5 % до приблизно 40 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту, і кількість гліцерину складає від приблизно 1 % до приблизно 10 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

16. Спосіб за п. 15, де кількість трегалози становить приблизно 20 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту, і кількість гліцерину становить приблизно 5 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

17. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де спосіб додатково включає розфасування препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

18. Спосіб за п. 17, де спосіб додатково включає зберігання препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

19. Спосіб обробки насіння, де спосіб включає:

(13) C2

(11) 94389

(19) UA

отримання рідкого інокулянту бактерій, вирощених до по суті стаціонарної фази;

додавання зневоднювальної добавки, що включає десикант, до рідкого інокулянту для отримання препарату частково зневодненого інокулянту; і нанесення на насіння препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

20. Спосіб за п. 19, де бактерії являють собою бактерії одного або декількох родів із *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pasteuria*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum* і *Cyanobacteria*.

21. Спосіб за п. 19 або 20, де десикант являє собою одну або декілька сполук, вибраних із невідновлювального цукру і спирту, що належить до групи цукрів.

22. Спосіб за п. 19 або 20, де десикант являє собою одну або декілька сполук, вибраних з трегалози, сахарози, гліцерину, триетиленгліколю і маніту.

23. Спосіб за п. 22, де кількість десиканту складає від приблизно 5 % до приблизно 50 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

24. Спосіб за п. 22, де десикант включає трегалозу.

25. Спосіб за п. 24, де кількість трегалози складає від приблизно 10 % до приблизно 40 % (мас./об.)

препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

26. Спосіб за п. 25, де кількість трегалози складає від приблизно 20 % до приблизно 30 % (мас./об.) препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 19-26, де насіння включає насіння бобової рослини.

28. Спосіб за будь-яким з пп. 19-27, де кількість бактерій після закінчення приблизно 10 тижнів складає більше ніж приблизно  $1 \times 10^5$  на насінину.

29. Спосіб за будь-яким з пп. 19-28, де зазначений спосіб додатково включає нанесення екстендера на насіння після нанесення препарату частково зневодненого рідкого інокулянту.

30. Спосіб отримання рідкого сипкого препарату інокулянту, де спосіб включає:

отримання рідкого інокулянту бактерій, вирощених до по суті стаціонарної фази;

додавання зневоднювальної добавки, що включає десикант, до рідкого інокулянту для отримання препарату частково зневодненого інокулянту; і

нанесення препарату частково зневодненого інокулянту на сухий носій для отримання сухого сипкого препарату інокулянту.

31. Спосіб за п. 30, де сухий носій являє собою торф.

Галузь техніки, якої стосується винахід

Винахід стосується рідких інокулянтів. Зокрема, винахід стосується способу підвищення виживаності і стабільності бактерій рідких інокулянтів в упаковці і при нанесенні на насіння.

Рівень техніки

Відомо, що різні мікроорганізми мають корисну дію на рослини. Ці мікроорганізми включають бактерії родів *Rhizobium* (включаючи *Bradyrhizobium*), *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus* (включаючи *Paenibacillus*), *Pasteuria*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Methylobacterium*, *Cyanobacteria* (синьо-зелені водорості) і мікоризні гриби. Такі мікроорганізми можна доставляти до рослини за допомогою використання композицій інокулянтів. Спосіб одержання композицій інокулянтів включає стадію ферментування мікроорганізмів, звичайно в поживному середовищі.

Композиції інокулянтів можуть наноситися прямо на насіння рослин або вноситися в борозну безпосередньо перед посадкою насіння. Інокуляція насіння або ґрунту корисними мікроорганізмами для підвищення урожаю введена в практику багато років тому. Однак часто спостерігалися мінливі і не узгоджувані між собою результати, можливо, внаслідок втрати життєздатності бактерій або можливої зміни дозування, зумовленої змінами життєздатності інокулянтів.

При застосуванні інокулянта під час сівби, незалежно чи вноситься він у борозну або наноситься на насіння, у мікроорганізмів інокулянта немає часу для адаптації до нового навколишнього середовища. У результаті, мікроорганізми інокулянта можуть мати низький показник виживаності.

У цей час для підвищення життєздатності мікроорганізмів в інокулянті при нанесенні інокулянта на насіння або під час його посадки в інокулянт додаються допоміжні компоненти, що продовжують термін виживаності бактерій (екстендери), на основі цукру або полімерів. Оскільки екстендери додаються після розфасування інокулянта, вони не впливають на виживаність або стабільність інокулянта в упаковці.

Крім того, додавання екстендерів під час нанесення інокулянта на насіння або під час посадки є трудомістким процесом і звичайно повинно виконуватися кінцевими споживачами інокулянтів (наприклад, фермерами) у неконтрольованому навколишньому середовищі (наприклад, у сараї або на сільськогосподарському полі). Тому велика імовірність того, що екстендери будуть застосовані неправильно.

Для усунення проблем, пов'язаних із додаванням екстендерів після приготування інокулянта, додавання екстендерів здійснювалося в поживне середовище перед стадією ферментації процесу одержання рідкого інокулянта. Однак додавання екстендерів в оптимальній кількості перед ферментацією для підвищення виживаності мікроорганізмів на насінні інгібує їхній ріст.

Таким чином, існує потреба в способі підвищення виживаності і стабільності мікроорганізмів (наприклад, бактерій) рідкого інокулянта в процесі зберігання і підвищення виживаності і стабільності мікроорганізмів рідкого інокулянта при нанесенні його на насіння.

Суть винаходу

Одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб одержання рідкого препарату інокулянта,

що містить десикант. Спосіб включає одержання рідкого інокулянта бактерій, вирощених по суті до стаціонарної фази. В одержаний рідкий інокулянт додається компонент для осушувальної (зневоднювальної) обробки, що включає в себе десикант, з одержанням препарату частково зневодненого інокулянта.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу препарат частково осушеного інокулянта зазнає розфасування і зберігається.

У ще одному варіанті здійснення даного винаходу частково осушений інокулянт наноситься на насіння.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 показує графічне зображення виживаності *Bradyrhizobium japonicum* ("B. japonicum") у рідкому бульйоні, яка є функцією часу і температури, подані графіки побудовані за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 2 показує графічне зображення виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні, яка є функцією часу і температури, подані графіки побудовані за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 3 показує графічне зображення виживаності *B. japonicum* на насінні, яка є функцією часу і температури, подані графіки побудовані за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 4 показує діаграму виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні залежно від типу і кількості десиканта, подана діаграма побудована за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 5 показує діаграму виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні залежно від типу і кількості десиканта, подана діаграма побудована за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 6 показує діаграму виживаності *B. japonicum* на насінні залежно від типу і кількості десиканта, подана діаграма побудована за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 7 показує діаграму виживаності *Pseudomonas fluorescens* ("P. fluorescent") у рідкому бульйоні залежно від типу і кількості десиканта, подана діаграма побудована за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Фіг. 8 показує діаграму виживаності *S. proteomaculans* ("S. proteomaculans") у рідкому бульйоні залежно від типу і кількості десиканта, подана діаграма побудована за результатами декількох варіантів здійснення даного винаходу.

Детальний опис винаходу

Показаний спосіб одержання рідкого інокулянта бактерій. Спосіб включає додавання десиканта в рідкий інокулянт після того, як бактерії вирощені по суті до стаціонарної фази. Додавання десиканта до інокулянту призводить до одержання препарату частково зневодненого інокулянта.

Спосіб може забезпечувати підвищену стабільність бактерій, коли препарат частково осушеного інокулянта знаходиться "в упаковці" (тобто вмі-

щений в упаковку) і коли препарат частково осушеного інокулянта нанесений на насіння.

Підвищена стабільність може призводити до підвищеної виживаності бактерій як в упаковці, так і на насінні.

Бактерії вводяться в рідке поживне середовище для одержання бактеріальної культури. У рідке поживне середовище можуть вводитися різні бактерії, включаючи, але без обмеження, *Rhizobium* (у тому числі *Bradyrhizobium*), *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus* (у тому числі *Paenibacillus*), *Pasteuria*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Methylobacterium*, *Cyanobacteria* (синьо-зелені водорості). Для одержання бактеріальної культури в рідке поживне середовище можуть вводитися й інші мікроорганізми (наприклад, мікоризні гриби). Переважні штами *Rhizobium* і *Bradyrhizobium* включають *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* і *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Ці бактерії здатні утворювати бульбочки на корінні бобових рослин. Хоча наведений далі опис стосується, головним чином, композицій інокулянта *Rhizobium*, буде зрозумілим, що аналогічні принципи застосовуються і при використанні інших мікроорганізмів.

Рідке поживне середовище, в яке вводяться бактерії, може являти собою будь-яке відоме в даній галузі техніки рідке поживне середовище, сумісне з вибраними бактеріями. Наприклад, YMB являє собою середовище, що звичайно використовується для *Rhizobium*. Склад YMB поданий у таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристичні властивості YMB

Дріжджовий екстракт	0,50 г/л
Маніт	10,0 г/л
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50 г/л
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 г/л
NaCl	0,1 г/л
Вода	1л
PH	6,8

Після додавання бактерій у рідке поживне середовище бактеріальна культура інкубується (або ферментується) для надання бактеріям можливості росту до "по суті стаціонарної фази". Значення терміну "по суті стаціонарна фаза" включає період росту культури від пізньої "логарифмічної фази" до "стаціонарної фази". Термін "логарифмічна фаза" означає фазу, яка має місце після лаг-фази на початку ферментації і являє собою фазу, на якій звичайно поживні речовини є необмеженими і спостерігається експонентний ріст бактерій. Термін "стаціонарна фаза" означає фазу, яка має місце після логарифмічної фази і являє собою фазу, на якій ріст бактерій по суті припиняється. Стаціонарна фаза звичайно досягається, коли рідке поживне середовище по суті повністю витрачається. У даному описі середовище, що містить бактерії, які інкубуються по суті до стаціонарної фази, називається "рідким інокулянтом".

Звичайно період інкубування бактерій може складати від 1 до 15 днів. Точніше, інкубаційний період може складати від 2 до 7 днів. Протягом інкубаційного періоду рідке поживне середовище і бактерії можна аерувати і витримувати при температурі, придатній для їхнього росту. Аерація може здійснюватися з використанням інкубатора зі струшуванням, ферментаційного реактора та інших аналогічних пристроїв. Конкретні умови інкубації залежать від типу бактерій і типу рідкого поживного середовища, що використовується. Наприклад, *B. japonicum* може інкубуватися в поживному середовищі в інкубаторі зі струшуванням протягом приблизно від 1 до 10 днів при температурах в інтервалі від приблизно 20°C до приблизно 35°C. Переважно, *B. japonicum* інкубується протягом приблизно від 2 до 7 днів при температурі приблизно 28°C для забезпечення можливості росту бактерій.

Кількість бактерій у продовженні по суті стаціонарної фази змінюється залежно від виду бактерій. Наприклад, для *Rhizobium* бактерій загальна кількість бактерій у рідкому інокулянті складає від приблизно  $1 \times 10^9$ /мл до приблизно  $1 \times 10^{11}$ /мл. Точніше, даний рідкий інокулянт включає приблизно  $1 \times 10^{10}$ /мл бактерій. Зазначені кількості є зразковими кількостями, і мається на увазі, що і ці інші кількості також входять у галузь даного винаходу.

Після досягнення по суті стаціонарної фази (тобто після того, як бактеріям була надана можливість росту з експонентним коефіцієнтом швидкості росту) у рідкий інокулянт вводиться компонент зневоднювальної обробки, що включає десикант, для одержання препарату частково зневодненого інокулянта. Термін "компонент зневоднювальної обробки" означає суміш десиканта і розріджувача, звичайно води. Термін "десикант" означає речовину, яка при додаванні до води знижує активність води (що визначається як парціальний тиск водяних пар на поверхні речовини, поділений на тиск насиченої пари). Вважається, що зниження водної активності до рівня менше за 0,995 є ефективним для підвищення виживаності бактерій препарату частково зневодненого інокулянта, що знаходиться в упаковці. Вважається, що зниження водної активності до рівня менше за 0,990, переважно менше за приблизно 0,980, є ефективним для підвищення виживаності бактерій у препараті частково зневодненого інокулянта, нанесеному на насіння.

Термін "десиканти", що використовується в даному описі, може включати будь-яку сполуку або суміш сполук, які можуть класифікуватися як десиканти незалежно від того, чи використовується(ються) сполука або сполуки в концентраціях, що фактично забезпечують осушувальну (зневоднювальну) дію на рідкий інокулянт, чи ні. Приклади придатних десикантів включають одну або декілька сполук, вибраних із трегалози, сахарози, гліцерину і триетиленгліколю. Інші придатні десиканти включають, але без обмеження, невідновлювальні цукри і спирти, що належать до групи цукрів (наприклад, маніт).

Кількість десиканта, що вводиться в рідкий інокулянт, звичайно складає від приблизно 5% до

приблизно 50% (мас./об.) препарату частково зневодненого інокулянта. Коли десикантом є трегалоza, концентрація десиканта в препараті частково зневодненого інокулянта переважно складає від приблизно 10% до приблизно 40% (мас./об.). Переважніше, концентрація трегалози в препараті частково зневодненого інокулянта знаходиться в інтервалі від приблизно 20% до приблизно 30% (мас./об.).

Компонент зневоднювальної обробки може включати суміш декількох десикантів. На практиці суміші можуть являти собою будь-яке поєднання двох або більшої кількості десикантів, які визначені в описі. Наприклад, компонент зневоднювальної обробки може включати суміш трегалози і гліцерину, суміш трегалози і сахарози або суміші сахарози і триетиленгліколю. Суміш трегалози і гліцерину може включати трегалозу в концентраціях від приблизно 5% до приблизно 40 (мас./об.) препарату частково зневодненого інокулянта і гліцерин в концентраціях від приблизно 1% до приблизно 10% (мас./об.) препарату частково зневодненого інокулянта. Точніше, концентрації трегалози і гліцерину в суміші можуть становити приблизно 20% і приблизно 5% (мас./об.) препарату частково зневодненого інокулянта, відповідно.

Десикант може додаватися в рідкий інокулянт у той час, коли рідкий інокулянт ще знаходиться в ємності в процесі інкубації (наприклад, у ферментаційному реакторі або інкубаторі зі струшуванням). Альтернативно, десикант може додаватися в рідкий інокулянт у процесі розфасування.

В одному варіанті здійснення даного винаходу достатня кількість десиканта присутня у, принаймні, препараті частково зневодненого інокулянта, за допомогою чого (1) підвищується стабільність і виживаність бактерій на подальших стадіях, таких як розфасування і зберігання, і (2) підвищується стабільність і виживаність бактерій на подальших стадіях, таких як нанесення на насіння препарату частково зневодненого інокулянта.

Препарат частково зневодненого інокулянта може потім розфасовуватися і відправлятися на зберігання. Упаковка може являти собою будь-яку стандартну упаковку, відому в даній галузі техніки. Наприклад, препарат частково зневодненого інокулянта може розфасовуватися в поліетиленові ємності.

Після розфасування препарат частково зневодненого інокулянта може відправлятися на зберігання. Умови зберігання можуть включати охолодження до температур навколишнього середовища і нижче до прийнятної відносної вологості. Переважно, умови зберігання включають температуру нижче від приблизно 35°C і відносну вологість нижче від приблизно 80%.

Препарат частково зневодненого інокулянта може наноситися на різне насіння. Наприклад, препарат частково зневодненого інокулянта може наноситися на насіння бобових рослин. Бобові рослини утворюють велику групу рослин, включаючи економічно значущі овочеві культури, такі як соя, люцерна, арахіс, горох, боби і т.ін. Бактерії препарату частково зневодненого інокулянта можуть заселяти ризосферу і/або заражати коріння

рослини, проникаючи в корінцеві волоски, заселяючи коріння і утворюючи бульбочки. Внаслідок такого симбіотичного зв'язку, рослини можуть перетворювати газоподібний азот в органічні сполуки азоту за допомогою азотфіксації. Потім рослини можуть використати ці органічні сполуки для росту.

Кількість бактерій на насінні під час нанесення препарату частково зневодненого інокулянта на насіння, змінюється. Кількість бактерій на насінні через 10 тижнів після нанесення препарату частково зневодненого інокулянта на насіння також може змінюватися, але вважається, що кількість трохи відхиляється від початкової кількості. Іншими словами, не повинно бути значного зниження кількості бактерій на насінні з часом. Наприклад, якщо кількість бактерій на насінні при нанесенні препарату частково зневодненого інокулянта на насіння становить, принаймні,  $6 \times 10^5$ , кількість бактерій на насінні через приблизно 10 тижнів переважно становить  $1 \times 10^5$ .

Передбачається, що для підвищення стабільності і виживаності бактерій у препараті частково зневодненого інокулянта в упаковці і на насінні, перед нанесенням частково зневодненого інокулянта продукту на насіння в препарат частково зневодненого інокулянта можна необов'язково додавати полімер. Полімер можна додавати перед стадією розфасування або після стадії зберігання. Полімер може включати полівінілпіролідон, полімери алкілованого вінілпіролідону, співполімери вінілпіролідону і вінілацетату, співполімери вінілпіролідону і стиролу, полімери на основі полівінілового спирту та інші аналогічні полімери. Концентрація полімеру може складати від приблизно 1% до 25% (мас/об.) препарату частково зневодненого інокулянта.

Хоча додавання десиканта до рідкого інокулянта для одержання препарату частково зневодненого інокулянта після досягнення бактеріями по суті стаціонарної фази підвищує стабільність бактерій без необхідного додавання екстендера під час сівби, застосування екстендера не виключене.

На практиці галузь винаходу також включає також нанесення на насіння екстендерів після нанесення на насіння препарату частково зневодненого інокулянта. Екстендер може додаватися під час посадки або під час нанесення препарату частково зневодненого інокулянта на насіння. Екстендери можуть включати будь-які традиційно застосовувані екстендери, наприклад, одержані на основі цукру, смол, карбоксиметилцелюлози і полімерів.

Препарат частково зневодненого інокулянта може наноситися на торф, глину і/або інші аналогічні сухі носії для одержання сухого сипкого (плинного) препарату інокулянта. Препарат частково зневодненого інокулянта може наноситися розпиленням або іншими відомими способами.

Далі винахід буде проілюстрований за допомогою прикладів, які, однак, не треба розглядати як обмежуючі галузь даного винаходу.

#### Приклад 1

Оцінка стабільності *Bradyrhizobium japonicum* у присутності трегалози і суміші гліцерин/трегалоза.

*B. japonicum* культивують у віброінкубаторі у колбах, що струшуються, із поживним середовищем протягом 7 днів при температурі 28°C для одержання 7-денного ферментаційного бульйону. У струшуваних колбах об'ємом 250 мл готують чотири компоненти зневоднювальної обробки (див. таблицю 2). Готують по два зразки кожного компонента зневоднювальної обробки, таким чином, підготовляють всього 8 струшуваних колб об'ємом 250 мл із компонентами зневоднювальної обробки. У кожну таку струшувальну колбу додають по 50 мл семиденного ферментаційного бульйону. Вмісту всіх колб дають можливість досягнути стану рівноваги протягом додаткових 7 днів при 28°C. Після досягнення стану рівноваги одну колбу з кожної пари з однаковими компонентами зневоднювальної обробки статично інкубують при 28°C. Другу колбу з кожної пари з однаковими компонентами зневоднювальної обробки статично інкубують при 35°C.

Таблиця 2

Зневоднювальна обробка. Вплив трегалози і гліцерину на стабільність *B. japonicum*.

Обробка	Вода (г)	Гліцерин (г)	Трегалоза (г)	Символи на фігурах
Контроль: 0% трегалози, 0% гліцерину	50	0	0	◆
20% трегалози	30	0	20	■
5% гліцерину	45	5	0	▲
5% гліцерину + 20% трегалози	25	5	20	✕

Із колб періодично відбирають пробні зразки і чашечним методом визначають загальну кількість життєздатних бактерій. Для чашечного визначення кількості життєздатних бактерій зразки спочатку ретельно перемішують і потім, використовуючи калібровану піпетку зі стерильним наконечником, відбирають 1 мл зразка і переносять його в дослідну пробірku з 9 мл води для зворотного осмоса (RO), одержуючи таким чином  $10^{-1}$  розведення.

Потім, використовуючи 1000 мкл Rainin (калібрований і встановлений на 1000 мкл) і стерильні наконечники, із дослідної пробірки  $10^{-1}$  розведення відбирають 1000 мкл зразка  $10^{-1}$  розведення і переносять його в іншу дослідну пробірku, що містить 9 мл RO води, одержуючи, таким чином,  $10^{-2}$  розведення. Потім ці дії повторюють до  $10^{-7}$  розведення, струшуючи дослідні пробірки, що містять

розведення, і фламбуючи їх між кожним перенесенням.

Використовуючи 100 мкл Rainin (калібрований і встановлений на 30 мкл) і стерильні наконечники, із дослідної пробірки з  $10^{-1}$  розведенням відбирають зразок об'ємом 30 мкл і три краплі по 10 мкл, краплі переносять на чашку з поживним агаром, яка служить як чашка виявлення забруднення. Поживний агар являє собою агар Oxoid. Зазначені дії повторюють для іншого розведення із тією відмінністю, що для  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  і  $10^{-7}$  розведення зразки вміщують на стандартні чашки з поживною середою Congo Red Yeast Mannitol Agar ("CRYMA" - див. таблицю 3).

Таблиця 3

Склад поживного середовища CRYMA-чашок

Інгредієнт	Кількість
MgSO <sub>4</sub>	0,204 г
NaCl	0,1г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 г
Дріжджовий екстракт (Difco)	0,4 г
Маніт	10,0 г
Конго червоний (0,25% розчин)	10 мл
Агар (BBL)	15 г

Чашкам дають можливість висохнути перед інвертуванням та інкубують їх при 28°C протягом 5 днів. Після закінчення 5 днів число колоній підраховують під мікроскопом малого збільшення. Загальну кількість обчислюють по формулі "середнє значення × розбавлення × 100".

Результати визначення виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні при 28°C, одержані при додаванні чотирьох різних компонентів зневоднювальної обробки, подані на Фіг. 1. Результати визначення виживаності бактерій *B. japonicum* у рідкому бульйоні при 35°C, одержані при додаванні чотирьох різних компонентів зневоднювальної обробки, подані на Фіг. 2. Зразок із додаванням 5% гліцерину був зіпсований у процесі випробування і тому результат його випробування не поданий на Фіг. 2.

Результати, подані на Фіг. 1, показують; що при 28°C додавання 20% трегалози і суміші 20% трегалози/5% гліцерину забезпечує хорошу виживаність бактерій у рідкому бульйоні. Кількість бактерій у контрольному зразку починає знижуватися протягом періоду часу в інтервалі приблизно від 12 тижнів до 16 тижнів від початку експерименту. На відміну від контрольного зразка, у зразку з 20% трегалози і в зразку зі сумішшю 20% трегалози/5% гліцерину кількість бактерій зберігається на відносно постійному рівні у зазначений період часу і навіть після закінчення зазначеного періоду часу.

Результати, подані на Фіг. 2, показують, що при 35°C додавання 20% трегалози забезпечує хорошу виживаність бактерій у рідкому бульйоні. Хоч кількість бактерій в інших зразках, включаючи контрольні зразки, значно знижується на початку експерименту, кількість бактерій при додаванні 20% трегалози залишається відносно постійною протягом всього експерименту.

Після закінчення 10 тижнів із контрольного зразка і зразка, що містить 20% трегалози, відбирають проби і наносять на насіння сої. Насіння витримують при 22°C. Періодично відбирають проби і визначають кількість *B. japonicum*, що вижили. Кількість бактерій, що вижили, на насінні визначають наступним способом.

Навішення насіння сої масою 500 г вміщують у чистий маркірований пластиковий пакет, який може герметично закриватися. Використовуючи шприц об'ємом 2 мл або стерильні піпетки об'ємом 2 мл, відбирають 1,38 мл кожного зразка і рівномірно розподіляють на поверхнях насіння. Потім у пластиковий пакет, що містить інокульоване насіння, захоплюють повітря навколишнього середовища. Відразу після цього пластиковий пакет герметично закривають і струшують доти, поки зразок не покриє рівномірно насіння (приблизно 30 секунд). Пластиковий пакет відкривають і насіння витримують у лабораторних умовах (21 °C), захищаючи його від дії прямих сонячних променів, до повного висихання (приблизно 10 хвилин). Використовуючи сухий, протертий спиртом по всій довжині шпатель у вигляді ложки, з пластикового мішечка доволіно відбирають 100 непошкодженого насіння. Насіння вміщують у заздалегідь підготовлену сулію зі 100 мл розріджувача. Сулію закривають і відразу енергійно струшують протягом приблизно 1 хвилини. Використовуючи асептичний спосіб, одержані в сулії 100 мл суспензії послідовно розводять таким чином: (1) відразу після струшування 100 мл суспензії із сулії відбирають 1 мл суспензії бактерій у розріджувачі і асептично переносять у першу пробірку з 9 мл RO води, що використовується як розріджувач, одержуючи, таким чином,  $10^{-1}$  розведення; (2) суспензію  $10^{-1}$  розведення струшують протягом 15 секунд; (3) відразу після струшування 1 мл суспензії  $10^{-1}$  розведення переносять в іншу пробірку з 9 мл RO води, що використовується як розріджувач, з одержанням  $10^{-2}$  розведення; (4) після цього суспензію  $10^{-2}$  розведення струшують; (5) стадії (3) і (4) повторюють, з одержанням  $10^{-3}$  і  $10^{-4}$  розведень.

Після цього чашки з агаровим середовищем, на яких робиться підрахунок колоній, забезпечують ярликом із зазначенням розведення суспензії використаної пробірки, описом композиції обробки і датою сівби. Для кожного розведення готують по дві чашки. Перед відбором зразків із пробірок з розведеними суспензіями і посівом їх на чашки з агаровим середовищем суспензії струшують. Потім, використовуючи стандартні методи асептичного піпетування, із кожної пробірки розведення відбирають зразки об'ємом 100 мкл і розподіляють їх, вносять у центр кожної чашки з агаровим середовищем. Використовуючи стерильний розподільник, зразки рівномірно розподіляють на поверхнях чашок. Після цього чашки інкубують протягом 7 днів при 28°C. Після інкубування підраховують і записують кількість колонієутворюючих одиниць (CFU) у кожній чашці. Потім для кожної чашки для визначення кількості CFU із розрахунку на кожну чашку (CFU/чашка) проводять такі обчислення: [Середнє число колоній × [зазначене в ярлику розведення ×  $10^{(a)}$  ×  $100^{(b)}$ ]/ $100^{(c)}$ ], де (a)

являє собою поправкове значення для 0,1 мл/чашку, (b) являє собою поправковий коефіцієнт для 100 мл у вихідній суспензії, вміщеній у сулії, і (c) являє собою поправковий коефіцієнт для кількості насіння у вихідному зразку.

Результати визначення виживаності *B. japonicum* після закінчення 10 тижнів подані на Фіг. 3. Результати показують, що часовий відрізок, протягом якого кількість бактерій зберігається на рівні понад  $1 \times 10^5$ /насіння, складає для контрольного зразка менше 1 тижня, а для зразка, що містить 20% трегалози, більше 10 тижнів. Ці резуль-

тати показують, що додавання трегалози в концентрації 20% забезпечує хороше виживання бактерій при нанесенні їх на насіння.

#### Приклад 2

Оптимізація кількості суміші трегалоза/сахароза, необхідної для стабілізації *B. japonicum*

Зразки препаратів готують у струшуваних колбах відповідно до методики, описаної в прикладі 1. Компоненти, що використовуються для зневоднювальної обробки, для даного прикладу, подані в таблиці 4.

Таблиця 4

Зневоднювальна обробка. Вплив трегалози і сахарози на стабільність *B. japonicum*

Обробка	Вода (г)	Трегалоза (г)	Сахароза (г)
Контрольний зразок	50	0	0
5 % трегалози	45	5	0
10% трегалози	40	10	0
20% трегалози	30	20	0
30% трегалози	20	30	0
40% трегалози	10	40	0
5% сахарози	45	0	5
10% сахарози	40	0	10
20% сахарози	30	0	20
30% сахарози	20	0	30

Результати визначення виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні при 28°C із застосуванням зазначених добавок, подані на Фіг. 4. Результати визначення виживаності *B. japonicum* у рідкому бульйоні при 25°C із застосуванням зазначених добавок, подані на Фіг. 5.

Результати, подані на Фіг. 4, показують, що при інкубуванні при 28°C додавання галактози в концентраціях в інтервалі від 10% до 30% (мас/об.) є оптимальними для виживаності бактерій у рідкому бульйоні. Результати, подані на Фіг. 4, також показують, що додавання сахарози в концентраціях в інтервалі від 5% до 10% (мас/об.) є сприятливим для виживаності бактерій у рідкому бульйоні, але не в такому самому ступені, як додавання трегалози. Крім того, результати, подані на Фіг. 4, показують, що бактерії можуть виживати при обробці з додаванням трегалози в концентрації 40%, демонструючи, що бактерії мають потенціал виживати в препараті, який є інгібіторним для мікроорганізмів.

Результати, подані на Фіг. 5, показують, що при 35°C додавання трегалози в концентраціях в інтервалі від 10% до 30% (мас/об.) є оптимальними для виживаності бактерій у рідкому бульйоні. Результати, подані на Фіг. 5, також показують, що додавання сахарози в концентрації 5% (мас/об.) є сприятливим для виживаності бактерій у рідкому бульйоні, але не в такому самому ступені, як додавання трегалози.

Після закінчення 10 тижнів зразки препаратів із компонентами, поданими в таблиці 4, наносять на насіння сої. Насіння інкубують при 22°C. Зразки інокулянта на насінні відбирають безпосередньо

після нанесення препарату, потім через 6 днів, через 2 тижні і через 4 тижні. У зразках визначають кількість бактерій *B. japonicum*. Спосіб визначення виживаності бактерій на насінні описаний вище в прикладі 1. Результати визначення виживаності бактерій на насінні подані на Фіг. 6.

Результати, подані на Фіг. 6, показують, що при 22°C додавання трегалози в концентраціях в інтервалі від 20% до 30% (мас/об.) є оптимальними для виживаності бактерій при нанесенні бактерій на насіння.

#### Приклад 3

Визначення стабільності *Serratia Proteomaculans* і *Pseudomonas Fluorescens* у препараті підкого бульйону

*Serratia Proteomaculans* ("S. Proteomaculans") вирощують у стандартному мікробіологічному середовищі (триптичний соєвий бульйон (Tryptic soya broth "TBS") половинної концентрації) протягом 24 годин при 22°C для приготування бактерійного бульйону. Готують компоненти зневоднювальної обробки, подані в таблиці 5. У кожну колбу, що містить зазначений компонент, додають 50 мл бактеріального бульйону. Вмісту всіх колб дають можливість досягнути стану рівноваги протягом додаткових 3 днів у віброінкубаторі при 22°C. Потім колби видаляють із віброінкубатора для статичного інкубування при 28°C. Із колб періодично відбирають зразки і кількість бактерій оцінюють одержуючи послідовне розведення і висіваючи їх на агарове середовище зі стриптичним соєвим бульйоном половинної концентрації "TSA".

Ці ж дії виконують для *Pseudomonas fluorescens* ("P. fluorescens").

Таблиця 5

Зневоднювальна обробка. Вплив додавання трегалози, сахарози і гліцерину на стабільність *S. Proteomaculans* і *P. fluorescens*.

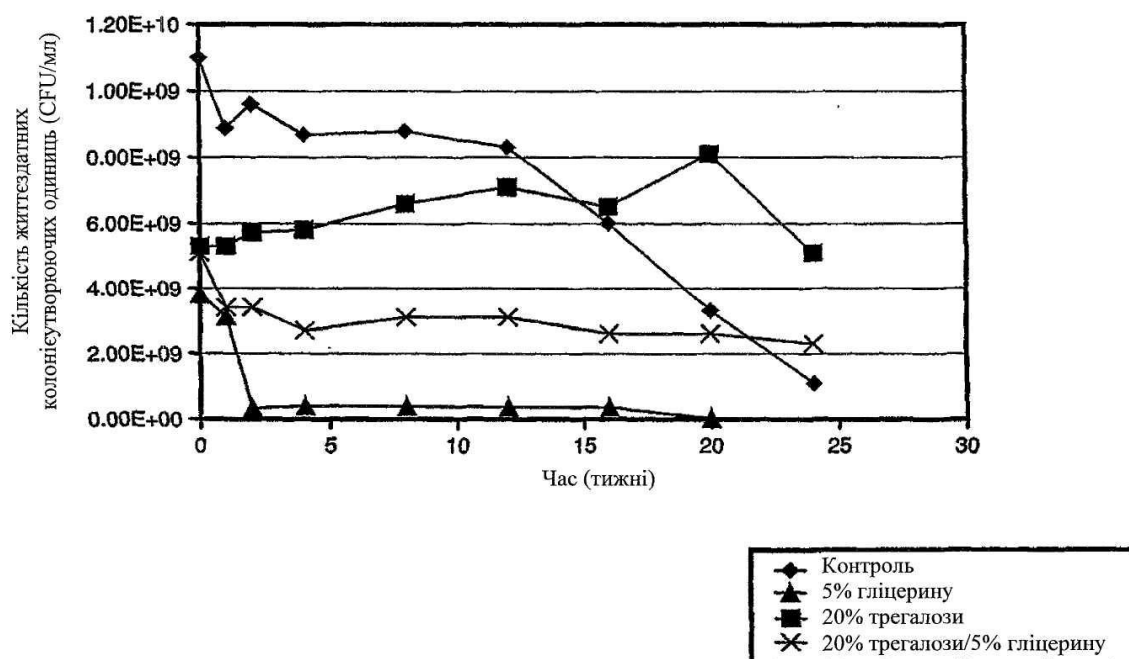
Обробка	Вода (г)	Трегалоза (г)	Сахароза (г)	Гліцерин (г)
Контрольний зразок	50	0	0	0
10% гліцерину	40	0	0	10
20% гліцерину	30	0	0	20
30% гліцерину	20	0	0	30
10% трегалози	40	10	0	0
20% трегалози	30	20	0	0
30% трегалози	20	30	0	0
10% сахарози	40	0	10	0
20% сахарози	30	0	20	0
30% сахарози	20	0	30	0

Результати визначення виживаності *P. fluorescens* у рідині при 28°C подані на Фіг. 7. Результати показують, що при 28°C додавання гліцерину, трегалози і сахарози може поліпшуватися виживаність *P. fluorescens*.

Результати визначення виживаності *S. proteomaculans* у рідині при 28°C подані на Фіг. 8. Результати показують, що при додаванні в інокулянт 30% трегалози, 10% сахарози і 30% сахарози кількість бактерій, що вижили перевершує кількість бактерій, що вижили в контрольному зразку протя-

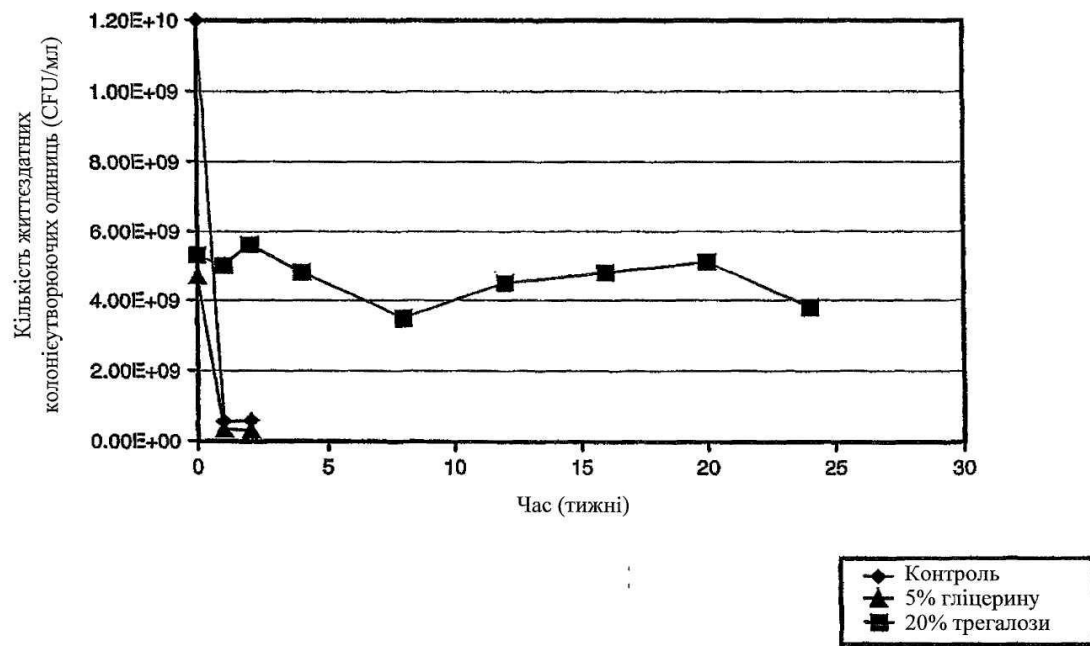
гом періоду часу, що складає до 4 тижнів. Ці дані показують, що введення зазначених добавок може підвищити виживаність *S. proteomaculans*.

Кваліфікований фахівець даної галузі техніки буде уявляти, що даний винахід може здійснюватися в різних альтернативних формах і конфігураціях. Наведений вище детальний опис розкритих варіантів здійснення винаходу поданий тільки з метою чіткішого його роз'яснення, і не має на увазі ніяких обмежень.

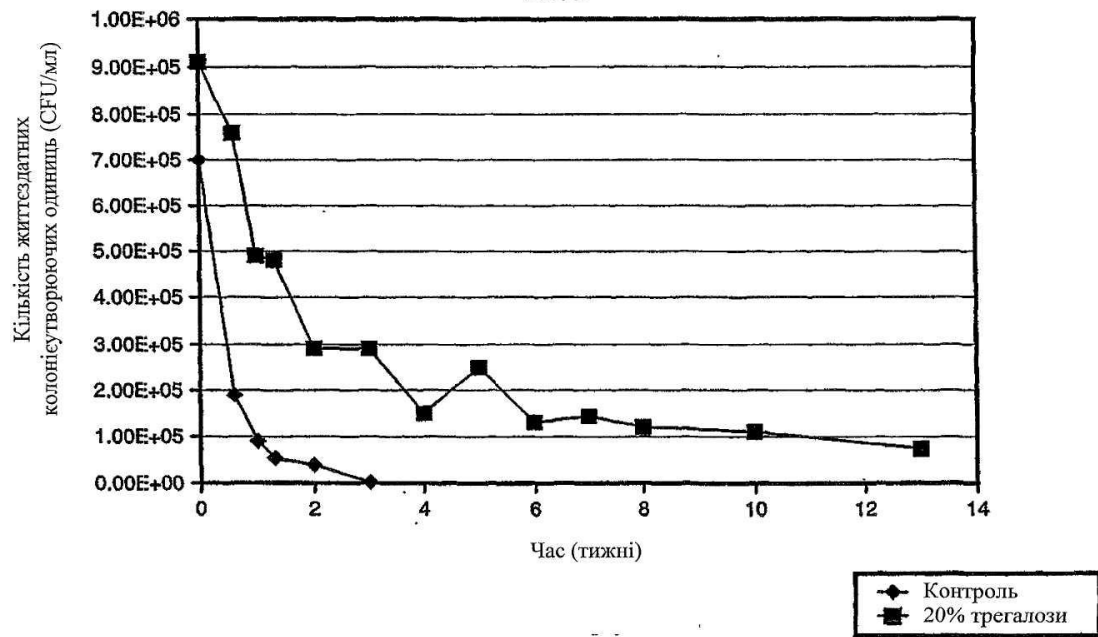


Фіг. 1

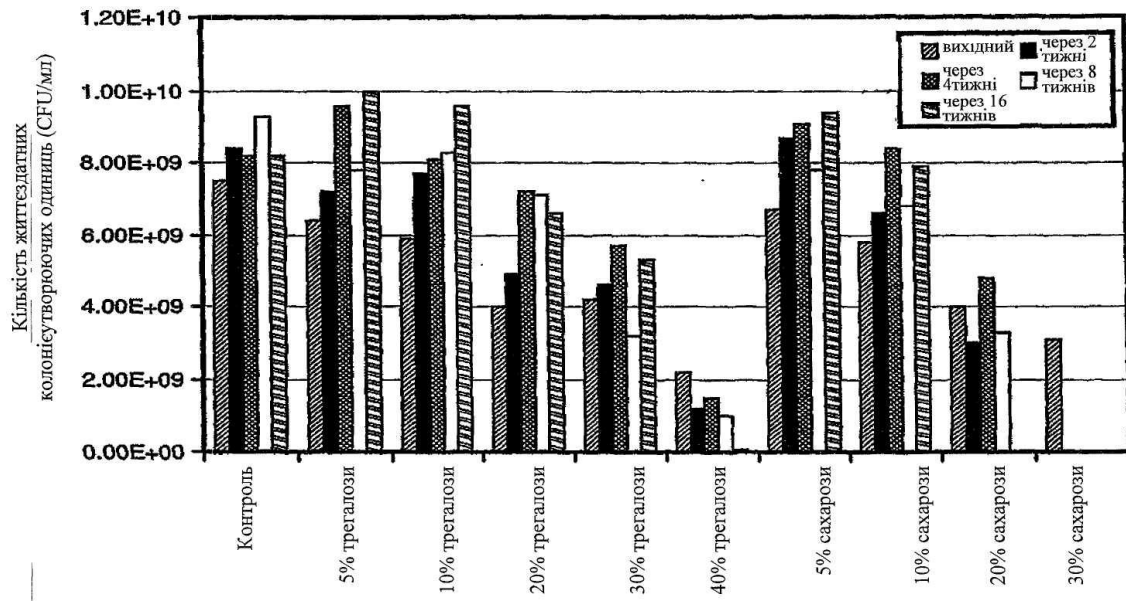




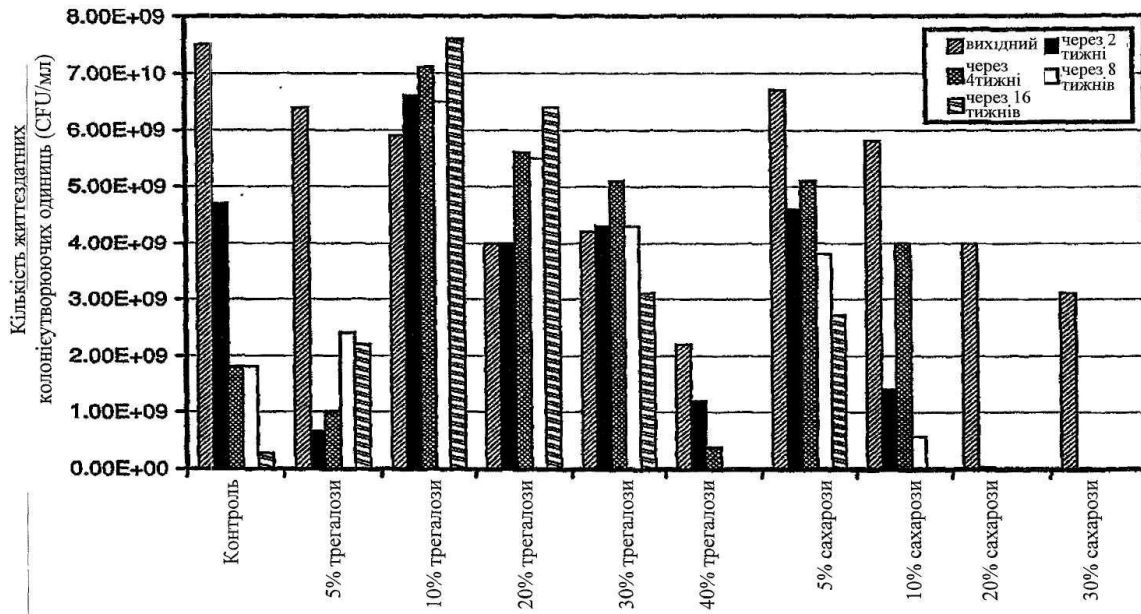
Фіг. 2



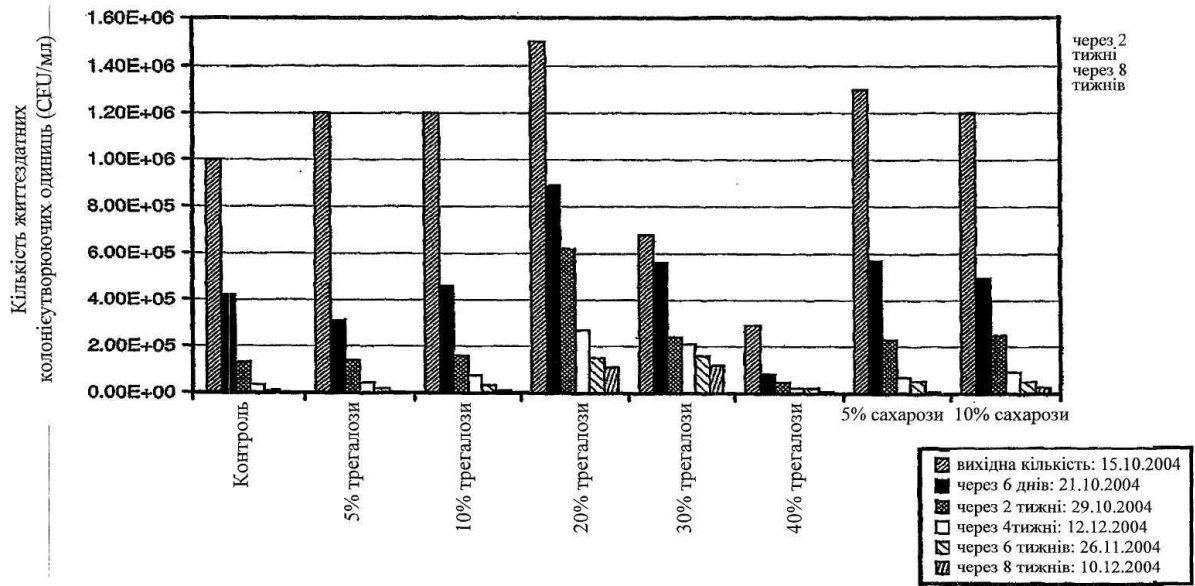
Фіг. 3



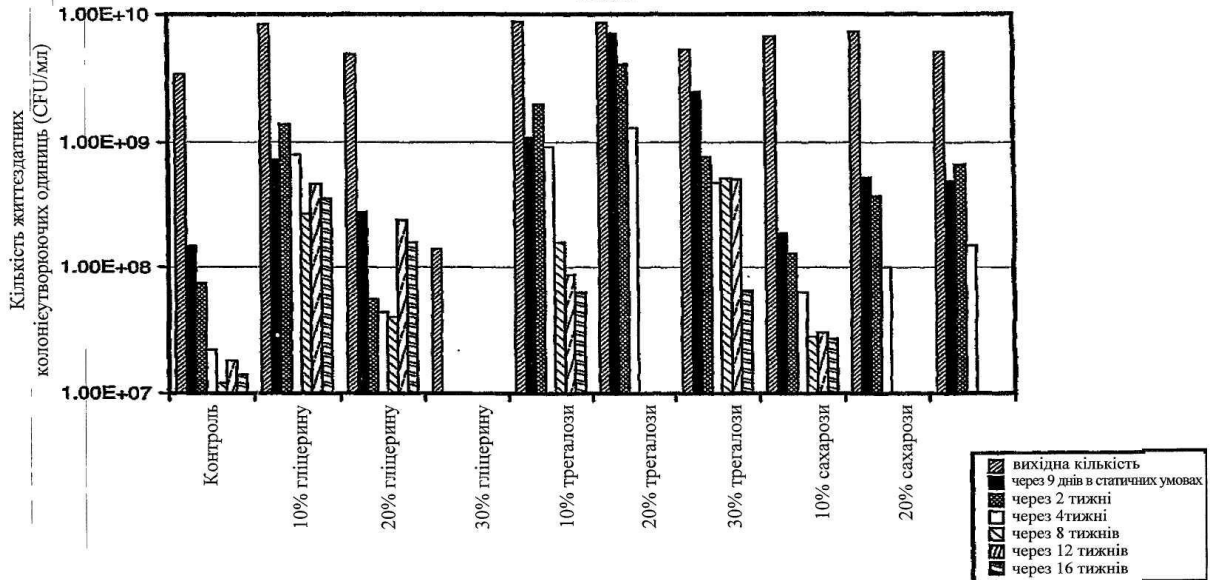
Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

