

Корисна модель належить до галузі аграрної біотехнології, стосується носіїв мікроорганізмів на основі гранул з морських водоростей для біопрепаратів, що створюються для захисту, стимулювання росту рослин, збільшення урожайності сільськогосподарських культур та покращення якості аграрної продукції.

З огляду на загрозову екологічну ситуацію в усьому світі для агровиробництва переважної більшості країн стратегічним вектором є екологічність землеробства, сталий розвиток, врожайність та висока якість продукції. Все вище зазначене реалізується завдяки переходу на екобезпечні технології агровиробництва: відмова від шкідливих і небезпечних засобів захисту і стимулювання росту рослин і, відповідно, впровадження альтернативних хімічним методам ведення аграрного виробництва без використання пестицидів і мінеральних добрив. Особливе місце у цьому підході посідає розробка біопрепаратів на основі живих культур мікроорганізмів та активних метаболітів.

Мікробні препарати для аграрного виробництва випускаються в різних формах, включаючи рідкі форми, сухі порошки, гранули та покриття для насіння, кожна з яких призначена для доставки корисних мікробів у ґрунт або до рослин з метою покращення їх росту та здоров'я ґрунту. Ці препарати можуть бути засновані на одному або кількох штаммах корисних мікроорганізмів.

Для виживання, розмноження та збереження життєздатності мікроорганізмів використовуються різноманітні носії, що забезпечують необхідне живлення та підтримку.

Носії для мікробних препаратів повинні відповідати певним критеріям. Вони повинні бути нетоксичними, легкодоступними, недорогими, без консервантів, здатними вбирати та утримувати вологу, бути стабільними при зберіганні та забезпечувати збереження мікроорганізмів за відповідних умов протягом тривалого часу. Крім того, ідеальний носій має бути простим у використанні, забезпечуючи контрольоване вивільнення мікроорганізмів, і його має бути легко виготовляти та поєднувати з іншими добавками чи поживними речовинами.

У агровиробництві для створення мікробних препаратів використовують різні типи носіїв: ґрунти, лігноцелюлозні відходи промислового та сільськогосподарського виробництва, інертні матеріали, включаючи біополімери тощо. Використання тих чи інших типів носіїв залежить від багатьох факторів: умов застосування даних препаратів (кліматичні умови, якість ґрунту, доступність органічних та неорганічних речовин (мікроелементів) для макро- та мікроорганізмів, вологість тощо), сільськогосподарських культур, з якими будуть співпрацювати мікроорганізми, і завдань, які вони мають виконувати.

Досягнутий рівень в створенні носіїв для мікробних препаратів у аграрній біотехнології наведено в наступних прикладах.

Як носій використовують водорозчинний порошок (wettable powder) на основі лігносульфонатів (91,8-99,8 %), з 8,2-0,2 % бактеріальної суміші (не менше 3 видів, включаючи азотофіксуючі та фосфатмобілізуєчі бактерії, зокрема *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* і *Pseudomonas monteilii*), що зберігає життєздатність на рівні $\geq 2,63 \times 10^8$ КУО/г через 2 роки зберігання (<https://patents.justia.com/patent/20240373860>, пуб. 14.11.2024). Технологія передбачає рівномірне нанесення суміші ліофілізованих мікроорганізмів із носієм - лігносульфонатом - на зовнішню поверхню гранул добрива, перетворюючи їх на біодобрива з пролонгованою дією.

Недоліки такого типу носія:

- не всі бактерії виживають у лігносульфонатах, особливо більш чутливі ризобактерії, що стимулюють ріст рослин (група PGPR) (наприклад, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus plantarum* та ін.);
- не підходить для створення препаратів на основі грибів (*Trichoderma*, *Mycorrhiza*), яким потрібен вологий субстрат;

- обмежена дія в стресових умовах (посуха, засолення);

- поверхнєве внесення забезпечує низьку колонізацію коренів рослин NPK-бактеріями (бактеріями, які допомагають рослинам засвоювати поживні речовини, зокрема нітроген (N), фосфор (P) та калій (K), з ґрунту). При поверхневому внесенні на гранули NPK-бактерії не завжди досягають ризосфери. Частина мікроорганізмів гине до того, як проросте насіння, що свідчить про низьку ефективність інокуляції;

- лігносульфонати можуть інгібувати деякі мікроорганізми (у високих концентраціях сульфонові групи можуть спричиняти антимікробну дію проти чутливих штамів (особливо грибів, актиноміцетів), можуть викликати осмотичний стрес, якщо не точно дотримано дозування;

- лігносульфонати у ґрунті повільно розкладаються, що може перешкоджати швидкому "звільненню" іммобілізованих бактерій за деяких умов;

- технологія передбачає попереднє нанесення бактерій на мінеральні гранули, це: ускладнює логістику, потребує кооперації з виробником добрив, робить продукт менш доступним для малих фермерів.

Відоме гранульоване добриво - NPK-гранули, які покриваються сумішшю ліофілізованого молочного порошку (як поживний і адгезивний матрикс) з *Raenibacillus polymyxa*, а потім зверху наносять тонкий шар олії для захисту спор і фіксації покриття

(<https://patents.google.com/patent/US20230140837A1>, 11.05.2023). Ліофілізовані спори *P. polymyxa* витримують сухий стан, а масляна плівка додатково захищає від вологи і ультрафіолету, що підвищує термін життєздатності до 1-2 років. Молочний порошок служить поживним середовищем для клітин відразу при введенні в ґрунт, що сприяє швидкій колонізації ризосфери. Однак, молочний порошок (особливо харчового класу) є дорогим компонентом, а покриття гранул олією вимагає додаткових виробничих стадій і спеціального обладнання для тонкого дозування. Окрім цього, з одного боку, масляна плівка може обмежити доступ повітря і вологи, необхідних для активації мікробів у ґрунті, а з іншого - може втрачати властивості при перевищенні вологості (>60 %) та в ґрунтах з низьким рН, які переважають в Україні (можливе руйнування емульсії або деградація молочного шару).

Найближчим аналогом за функціями і призначенням до запропонованого нами носія є термостійкі носії: суміш альгінату (або крохмалю, глини, гуматів) (<https://patents.justia.com/patent/20240376022>, пуб. 14.11.2024). Технологія створення добрива з використанням носіїв такого типу передбачає використання термостійких мікроорганізмів, які здатні пережити високу температуру гранулювання до $\approx 100^\circ\text{C}$. Мікроорганізми подаються всередину гранули при грануляції або наносяться на поверхню при її формуванні.

- Однак використання таких носіїв має певні недоліки:
- обмежений вибір корисних мікроорганізмів (лише деякі мікроорганізми здатні витримати температуру $90-100^\circ\text{C}$.)
 - потенційне зниження життєздатності при промисловій грануляції. Навіть при використанні термостійких видів частка бактерій, що виживає, може бути <50-70 %, оскільки грануляція це не тільки температура, а ще й механічне тиснення, зневоднення, контакт з солями;
 - інактивація при тривалому зберіганні (гранули часто зберігають до року, але після високотемпературної обробки бактерії можуть втратити життєздатність швидше, ніж при окремому інокулюванні);
 - високі технологічні вимоги (потрібне обладнання для забезпечення точної регуляції температури, вологості і швидкості охолодження на етапі гранулювання).
 - обмеження по типу носія (альгінат, глина чи крохмаль додають в'язкості та маси, що впливає на гранулометрію і текучість продукту).

Задача корисної моделі - створення екологічного носія корисних мікроорганізмів, який виявляє стабілізуючі та протекторні властивості по відношенню до мікроорганізмів, що входять до складу біопрепаратів.

Поставлена задача вирішується тим, що за способом одержання носія мікроорганізмів для аграрних біопрепаратів, що полягає в грануляції сумішей різноманітних носіїв за температури до $\approx 100^\circ\text{C}$, згідно з корисною моделлю, як носій використовують гранули, виготовлені з водоростей Чорного моря, а грануляцію проводять за температури $38-40^\circ\text{C}$.

Отримують носій наступним чином:
Водорості, зібрані на узбережжі Чорного моря, висушують до повітряно-сухого стану протягом 7 діб. Від сухої біомаси водоростей шляхом струшування на вібраційному столі з сіткою (діаметр отворів 1 мм) відділяють морський пісок. Очищені від піску водорості перемелюють на молотковому млині та отримують фракції розмірами часток 1-2 мм і вологістю 4,5 %, які використовують для виготовлення гранул.

Узагальнені фізико-хімічні показники водоростей Чорного моря (носія для мікроорганізмів) наведено у таблиці.

Таблиця

Показник	Значення показника
Зовнішній вигляд	Гранула зелено-бурого кольору
Розчинність	Нерозчинні
Йод (I)	12,0 мкг/г
Калій (K)	18,0 мкг/г
Кальцій (CaO)	4,1 мкг/г
Нітроген (N)	9,5 мкг/г
Альгірати загальні	48,40 %
Ламінарний загальні	3,20 %
Глюкани загальні	0,32 %
Триметилоцтова кислота	0,02 %
Лізин (Lys)	0,02 %
Тирозин (Tyr)	0,01 %
Аргинін (Arg)	0,02 %
Глутамінова кислота (Glu)	0,05 %

Грануляцію проводять на модифікованому стрічково-барабанному грануляторі за температури 38-40 °С, інокуюючи отримані фракції водоростей відповідною суспензією корисних мікроорганізмів шляхом розпилювання та перемішування до кінцевої вологості 20 %. Готові гранули калібрують за розміром через вібросита з діаметром отворів 3 мм. Усі більші за розміром гранули відбраковують.

Гранули із водоростей з інокульованими мікроорганізмами зберігають в паперових мішках з поліетиленовими вкладишами.

Дослідження впливу гранул з водоростей Чорного моря на мікроорганізми проводили в науково-дослідних лабораторіях Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Приклад

В експерименті досліджували життєздатність (виживання) бактерій штамів *Bacillus subtilis* ONU 1125 і *Streptomyces ambofaciens* ONU 1016, інокульованих у гранули з морських водоростей, зібраних на узбережжі Чорного моря. Для цього штам *B. subtilis* ONU 1125 і *S. ambofaciens* ONU 1016 культивували у рідких поживних середовищах, відповідно, поживному бульйоні (GranuCult® Nutrient Broth, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 2 доби і Гаузе 2 (глюкоза - 10,0 г/л, пептон - 5,0 г/л, бульйон Хоттингера - 30,0 г/л, NaCl-5,0 г/л, вода - 1,0 л) 10 діб на ротаційному шейкері Buhler VKS 75 Control (Німеччина) при 210 об/хв, 28±1 °С.

Отримані бульйонні культури бактерій доводили до концентрації 1×10^9 КУО/мл (стандартизували до титру 9,0 lg КУО/мл). Висушені до вологості 4,5 % залишкової води і подрібнені до фракцій 1-2 мм водорості зволожували приготованими суспензіями бактерій відповідних штамів із розрахунку 150 мл суспензії на один кілограм водоростей, що відповідало 9,0 lg КУО/г, до кінцевої вологості 20 %. Після чого проводили грануляцію і калібровку отриманих гранул. Приготовані таким чином гранули зберігали протягом 24 місяців у тришарових паперових мішках з поліетиленовим вкладишем та без нього в умовах складського приміщення без регульованої температури (вологість 50-65 %, температура 8-25 °С).

Відразу після грануляції і впродовж двох років кожен місяць проводили визначення кількості життєздатних клітин бактерій штамів *B. subtilis* ONU 1125 і *S. ambofaciens* ONU 1016 у гранулах.

Отримані результати свідчили, що титр життєздатних клітин *B. subtilis* ONU 1125 і *S. ambofaciens* ONU 1016 відразу після грануляції та протягом 1-го місяця зберігання складав, відповідно, 9,08 lg КУО/г і 9,11 lg КУО/г. Протягом усього періоду зберігання відзначали незначне поступове зменшення кількості життєздатних клітин обох штамів, проте титр їх був високим і становив через 24 місяці для *B. subtilis* ONU 1125-8,95 lg КУО/г при зберіганні в мішках з вкладишем і 8,90 lg КУО/г - при зберіганні у мішках без вкладишу. Для *S. ambofaciens* ONU 1016 цей показник визначено на рівні 8,90 lg КУО/г і 8,85 lg КУО/г, відповідно, через 24 місяці.

Наведені результати показали, що гранули з водоростей Чорного моря забезпечують життєздатність зі збереженням високого титру живих клітин бактерій *B. subtilis* ONU 1125 і *S. ambofaciens* ONU 1016 та є придатними як носій зі стабілізуючими і протекторними властивостями корисних мікроорганізмів для створення гранульованих мікробних препаратів.

Отже, запропоновані гранули з водоростей Чорного моря є екологічно безпечними, виявляють стабілізуючі та протекторні властивості щодо мікроорганізмів та можуть використовуватись як носій корисних мікроорганізмів для аграрних біопрепаратів, що має значну перевагу у порівнянні з відомими технічними рішеннями.