



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **14400** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
C12N 1/20
C12R 1/39 (2006.01)
B09C 1/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ PSEUDOMONAS FLUORESCENS УКМ В-36, ЯКИЙ ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ РОЗКЛАДУ ГЕРБІЦИДУ ДУАЛУ

1

(21) u200510841
(22) 15.11.2005
(24) 15.05.2006
(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.
(72) Тертична Ольга Василівна, Омельянець Таїсія Григорівна

2

(73) Інститут агроєкології УААН
(57) Штам бактерій *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36, депонований в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за № ІМВ В-7172, який призначений для розкладу гербіциду дуалу.

Корисна модель стосується екологічної мікробіології, зокрема, штаму бактерій, який може бути використаний як діючий чинник мікробного препарату для очищення ґрунту від гербіциду.

Хімізація сільського господарства призвела до погіршення стану і родючості ґрунту, забруднення залишками стійких пестицидів. Пестициди, проміжні продукти їх деградації, накопичуються в ґрунті, змінюють фізико-хімічні та біологічні властивості ґрунту, що призводить до погіршення його родючості [1]. Пестициди з ґрунту можуть переходити в рослини і через трофічні шляхи потрапляти в організм тварин і людини, завдаючи їм шкоди внаслідок високої токсичності.

Одним із шляхів поліпшення екологічного стану ґрунтів і відновлення їх родючості, тобто оздоровлення (біоремедіації) ґрунтів, є використання мікроорганізмів, здатних до деградації залишків пестицидів в ґрунті [2, 3].

Дуал - ґрунтовий гербіцид, який широко використовується в сучасному сільському господарстві. Діючою речовиною дуалу є металохлор, що належить за своєю хімічною будовою до галоїдзамісних анілідів карбонової кислоти. Дуал застосовується на широкому спектрі сільськогосподарських культур [4], тому ремедіація ґрунтів, забруднених цим гербіцидом, є актуальним завданням.

За прототип прийнято штам бактерій *Agrobacterium radiobacter* М 91-3, який здатний розкласти сим-триазинові гербіциди [Патент США №5429949, МКУ⁶, С12N1/20]. Штам виділений із ґрунту в США в Ohio State Research Foundation. Автори: M.Radosevich, O.N.Tuovinen, S.J.Traina.

Культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні ознаки культури бактерій штаму *Agrobacterium radiobacter* М 91-3: грамнегативні, оксидазопозитивні неспороутворюючі палички. Факультативні анаероби, оксидазопозитивні неспороутворюючі палички. Факультативні анаероби, оптимальна температура 23-32°C, рН 5,8-9,0. На МПА утворюють безбарвні, гладенькі колонії.

У мазках 18 - годинної культури виявляються прямі паличковидні клітини розміром 0,8x1,5-3,0мкм, рухомі, джгутики розташовані латерально.

Культура ферментує глюкозу, сахарозу, фруктозу, лактозу, галактозу, мальтозу, манніт, сорбіт, дульці. Слабо - крохмаль. Целюлозу та агар не розкладає. Зброджує прості вуглеводні з утворенням кислоти та CO₂. Казеїн не гідролізує, желатину не розріджує.

Штам М 91-3 здатний до деградації гербіцидів у розчині, ґрунті або донних осадах, розщеплення їх кільцевої структури і повної мінералізації.

Значним недоліком прототипу є те, що він (штам *Agrobacterium radiobacter* М 91-3) активний щодо сполук симтриазинової групи і не діє на інші класи гербіцидів, зокрема на галоїдзамісні аніліди карбонових кислот.

Задачею корисної моделі було одержання безпечного для теплокровних організмів штаму природних (не генетичне модифікованих) бактерій, здатних до деградації гербіциду із групи галоїдзамісних анілідів карбонової кислоти.

З цієї метою серед значної колекції бактерій роду *Pseudomonas* (102 штами 7 видів) було відібрано штам *Pseudomonas fluorescens* У КМ В-36

(19) **UA** (11) **14400** (13) **U**

здатний розкласти гербіцид дуал в рідкому середовищі та в ґрунті.

Технічним результатом корисної моделі, що заявляється, є ефективність деструктивної дії в ґрунті по відношенню до гербіциду дуалу групи галоїдзамісних аналідів карбонової кислоти.

Характеристика штаму *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36.

Номенклатурні дані: рід - *Pseudomonas*, вид - буювар III *Pseudomonas fluorescens*, депонований в колекції Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за №1МВ В-7172.

Походження штаму.

Штам *Pseudomonas fluorescens* У КМ В-36 виділений із чорноземного ґрунту загальноприйнятими методами [5] і відібраний серед 102 штамів псевдомонад за ознакою найбільшої деструкційної активності по відношенню до гербіциду дуалу.

Культурально-морфологічні ознаки.

Клітини - дрібні палички (1,2-2,8)х(0,3-0,6)мкм. Спор не утворюють, грамнегативні, рухомі, лофотрихи. Оксидазопозитивні за Ковачем.

Добре ростуть на звичайних поживних середовищах. На м'ясо-пептонному агарі - колонії круглі, гладенькі, блискучі, випуклі, білі, пастоподібні.

В середовище виділяють жовто-зелений флюоресціюючий пігмент, характерний для багатьох видів роду *Pseudomonas*. На м'ясо-пептонному бульйоні дають рясний ріст, утворюючи рівномірне помутніння. Здатний рости на синтетичному поживному середовищі.

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Оксидазопозитивні за Ковачем. Розріджують желатину, гідролізують аргінін, не утворюють левану з сахарози. Мають денітрифікуючі властивості. Засвоюють як єдине джерело вуглецю α -глюкозу, α -ксилозу, сахарозу, трегалозу, жирні кислоти від оцтової до пеларгонової, манніт, сорбіт, інозит, гліцерин, нижчі спирти - етанол, пропанол, бутанол, амінокислоти, бетаїн і саркозин. Не гідролізують крохмаль [6, 7].

Умови культивування штаму

На м'ясо-пептонному бульйоні дають рясний ріст, утворюючи рівномірне помутніння. Здатний рости на синтетичному поживному середовищі.

На твердих і в рідких середовищах штам *Pseudomonas fluorescens* УКМВ-36 добре росте в температурних межах від 4 до 42°C, оптимум росту 25-30°C. Оптимум рН 7,0-7,2.

Склад середовища - м'ясо-пептонного агару для культивування штаму:

15г сухого м'ясного поживного бульйона

1г пептону

20г агар-агару

Вода - 1000мл

рН 7,2-7,4

Склад середовища Козера для культивування штаму:

NaCl - 5г

MgSO₄ - 0,2г

NH₄H₂PO₄ - 1г

K₂HPO₄ - 1г

Глюкоза - 1г

Вода дистильована - 1000мл.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму.

Штам зберігається у ліофілізованому стані в запаяних пробірках або у високому (8-10мл) стовпчику напіврідкого середовища МПА (0,5% м'ясо-пептонному агарі) під шаром стерильного вазелінового масла при кімнатній температурі. Пересівається 1 раз на рік.

Безпека.

Для встановлення ступеню небезпеки штаму *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36 проводили зараження лабораторних тварин. Встановлено, що штам В-36 відноситься до невірулентних для теплокровних організмів культур. ЛД₅₀ цього штаму для білих мишей складає при внутрішньоочеревинному введенні $1,12 \cdot 10^9 \pm 0,33 \cdot 10^9$ КУО/тварину, при введенні *per os* $9,07 \cdot 10^{10} \pm 3,1 \cdot 10^9$ КУО/тварину, при інтраназальному введенні ЛД₅₀ для мишей визначити не вдається: максимально можлива для введення доза $5 \cdot 10^9$ КУО/тварину викликає загибель 4 із 10 тварин, тобто ЛД₅₀ > $5 \cdot 10^9$ КУО/тварину.

ЛД₅₀ для білих щурів складає при внутрішньоочеревинному введенні $2,54 \cdot 10^{10} \pm 5,11 \cdot 10^{10}$ КУО/тварину, введення *per os* максимально можливої для введення дози $1,6 \cdot 10^{11}$ КУО/тварину не викликає загибелі жодного із 10 заражених тварин, тобто ЛД₅₀ > $1,6 \cdot 10^{11}$ КУО/тварину. При інтраназальному введенні ЛД₅₀ > $8,0 \cdot 10^{10}$ КУО/тварину [8].

При всіх способах надходження бактерій в організм вони не спричиняють інфекції у теплокровних тварин.

Характеристика деструкційних властивостей штаму.

Серед значної колекції псевдомонад (102 штами 7 видів) було спочатку відібрано штами, не чутливі до токсичної дії дуалу [9]. Серед 69 не чутливих до дії дуалу штамів мікроорганізмів роду *Pseudomonas* нами було проведено пошук штамів, здатних до росту на агаризованому середовищі з додаванням дуалу як джерела живлення. Активна речовина дуалу метолахлор C₁₂H₂₁O₂NCl містить в своєму складі азот і вуглець, що можуть при розкладі препарату використовуватись мікроорганізмами як джерела живлення. Найбільш активними за інтенсивністю росту на агаризованому середовищі з додаванням дуалу як джерела живлення виявилися 4 штами бактерій роду *Pseudomonas*.

Для визначення найбільш активних штамів, здатних до розкладу дуалу, проведено вивчення перебігу деградації цього гербіциду в рідкому середовищі.

В табл.1 наведені результати досліджень динаміки вмісту дуалу та росту бактерій *Pseudomonas fluorescens* УКМ-36 в рідкому синтетичному середовищі складу: NaCl - 5г, MgSO₄ - 0, г, NH₄H₂PO₄ - 1г, K₂HPO₄ - 1г, дуал - 1г, дистильована вода - до 1л.

Початкова концентрація бактерій складала $3 \cdot 10^6$ клітин в 1мл. Дослідження кількості дуалу проводили в динаміці через 1, 3, 5, 7 і 10 діб після внесення в середовище. На 10-у добу в рідкому середовищі з додаванням штаму УКМ В-36 не було знайдено гербіциду. Інтенсивність росту бактерій збільшувалась до 5-ї доби, потім дещо зменшувалась, можливо внаслідок їх гальмування продуктами метаболізму бактерій.

Оцінку деструкційних властивостей *Pseudomonas fluorescens* УКМ-36 щодо гербіциду дуалу в ґрунті проводили шляхом внесення цих бактерій в кількості $1,2 \cdot 10^6$ КУО/г в чорнозем, штучно забруднений дуалом. Дуал вносили в дозі 1мг/кг ґрунту. Посудини з ґрунтом зберігали при температурі 18-22°C. Результати кількісного аналізу дуалу [10] наведені в таблиці 2.

На 30-у добу в варіанті з додаванням *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36 в стерильному ґрунті практично не знайдено залишків гербіциду; константа швидкості розпаду дуалу в цьому варіанті в 4 рази вища, ніж в варіанті без внесення бактерій. В нестерильному ґрунті при внесенні *Pseudomonas fluorescens* розпад дуалу спостерігався вже на 30-у добу експерименту, тоді як в ґрунті без додавання псевдомонад він тривав довше.

Збільшення кількості бактерій *Pseudomonas fluorescens* як в стерильному, так і в нестерильному ґрунті спостерігається вже через 1 добу після

внесення культури бактерій і дуалу (таблиця 3). Це збільшення кількості бактерій в ґрунті з дуалом в порівнянні з кількістю бактерій в ґрунті без дуалу пояснюється стимулюючою дією дуалу на розвиток бактерій штаму *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36.

В нестерильному ґрунті кількість інтродукованого штаму *P. fluorescens* порівняно із стерильним ґрунтом нижча, що, можливо, пояснюється інгібуючою дією аборигенної мікрофлори чорноземного ґрунту на інтродукований штам.

Таким чином, встановлено, що штам бактерій *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36 є активним деструктором гербіциду дуалу із групи галоїдзамісних анілідів карбонової кислоти. Деструкційна активність штаму, а також безпека його для тварин і людини створюють передумови для використання цих бактерій для очищення ґрунту від гербіциду.

Таблиця 1

Динаміка кількості дуалу та бактерій *Pseudomonas fluorescens* УКМ В-36 рідкому синтетичному середовищі, $M \pm m$

| Термін дослідження (доба) | Кількість дуалу (мг/л) | Кількість бактерій (клітин/мл) |
|---------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 1 | $0,78 \pm 0,02$ | $2,0 \cdot 10^6 \pm 0,9 \cdot 10^6$ |
| 3 | $0,68 \pm 0,03$ | $3,9 \cdot 10^6 \pm 0,8 \cdot 10^6$ |
| 5 | $0,39 \pm 0,04$ | $7,1 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$ |
| 7 | $0,18 \pm 0,03$ | $7,0 \cdot 10^6 \pm 1,2 \cdot 10^6$ |
| 10 | 0 | $6,9 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^6$ |

Таблиця 2

Динаміка деградації дуалу в ґрунті протягом 1-30 діб

| Варіант Дослідку | Кількість дуалу (мг/ кг) за термінами дослідження (доба) | | | | | |
|------------------------------|--|-----------------|-----------------|------------------|--------------------------------|------------------------|
| | Через 1 добу | Через 10 діб | Через 20 діб | Через 30 діб | Константа швидкості розпаду, K | Період напіврозпаду, T |
| Стерил. ґрунт+дуал+штам В-36 | $0,82 \pm 1,0,12$ | $0,58 \pm 0,03$ | $0,28 \pm 0,03$ | $0,04 \pm 0,004$ | 0,089 | 7,8 |
| ґрунт+Дуал+Штам В-36 | $0,72 \pm 0,14$ | $0,21 \pm 0,04$ | $0,11 \pm 0,05$ | 0 | 0,131 | 5,3 |
| ґрунт+ Дуал | $0,91 \pm 0,05$ | $0,3 \pm 0,02$ | $0,12 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,001$ | 0,114 | 6,1 |
| Стерил. ґрунт+ Дуал | $0,90 \pm 0,08$ | $0,63 \pm 0,16$ | $0,47 \pm 0,02$ | $0,43 \pm 0,06$ | 0,022 | 31,5 |

Таблиця 3

Динаміка кількості бактерій *Pseudomonas fluorescens* У КМ В-36 в ґрунті

| Термін дослідження | Кількість бактерій <i>P. fluorescens</i> в ґрунті (lg КУО/г) за варіантами дослідку, $M \pm t$ | | | |
|--------------------|--|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | ґрунт+ шт. В-36 | Стерильн. ґрунт+шт. В-36 | Стерил. ґрунт+ дуал+шт.В-36 | ґрунт+ Дуал +шт. В-36 |
| 1 | $4,10 \pm 0,03$ | $4,75 \pm 0,08$ | $7,18 \pm 0,03$ | $4,510 \pm 0,04$ |
| 3 | $4,07 \pm 0,02$ | $4,88 \pm 0,07$ | $5,79 \pm 0,05$ | $5,26 \pm 0,05$ |
| 5 | $4,60 \pm 0,07$ | $4,85 \pm 0,10$ | $6,00 \pm 0,03$ | $6,74 \pm 0,05$ |
| 7 | $4,51 \pm 0,04$ | $5,61 \pm 0,08$ | $5,87 \pm 0,04$ | $6,74 \pm 0,04$ |

| Термін дослідження | Кількість бактерій <i>P. fluorescens</i> в ґрунті (lg КУО/г) за варіантами досліду, М±т | | | |
|--------------------|---|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | Ґрунт+ шт. В-36 | Стерильн.ґрунт+шт. В-36 | Стерил.ґрунт+ ду-ал+шт.В-36 | Ґрунт+ Дуал +шт. В-36 |
| 10 | 4,66±0,06 | 6,03±0,06 | 5,9±0,02 | 4,60±0,08 |
| 20 | 4,78±0,10 | 5,79±0,04 | 4,51±0,04 | 4,10±0,03 |
| 30 | 4,69±0,06 | 5,94±0,06 | 6,74±0,05 | 4,10±0,03 |

Список літератури

1. Андреюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження.- К.: Обереги, 2001-240 с.

2. Головлева Л.А. Деградація пестицидів мікроорганізмами: біотехнічні аспекти проблеми// Тр. ВНИИ с.-х. мікробіології.- 1983.- т.56- с. 11-12

3. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды.- М.: Агропромиздат, 1991.- 128с.

4. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні.- Київ, 2002.

5. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии.- М: Изд-во МГУ, 1991.-304 с.

6. Смирнов В.В., Киприянова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*.- К.: Наук. думка, 1990.-264 с.

7. Скворцова И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas*.- М., 1981,- 107 с.

8. Медіко-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів: Метод, вказівки / Укладачі Омелянець Т.Г. та ін.-Видання офіційне.- Київ, МОЗ України 2004.- 22 с.

9. Визначення чутливості мікроорганізмів до пестицидів методом дифузії в агар з використанням дисків з фільтрувального паперу: Метод, вказівки.- К.: Логос.- 2005.-12 с.

10. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде// Клисенко М.А., Калинина А.А., Новикова К.Ф.и др.-М.: Колос, 1992.-567 с.