



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44245 (13) U
(51) МПК (2009)
A01N 63/00
C12R 1/38 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) БІОПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

(21) u200904030

(22) 24.04.2009

(24) 25.09.2009

(46) 25.09.2009, Бюл.№ 18, 2009 р.

(72) ШАПОВАЛОВ ІВАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ШАПОВАЛОВ ІВАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

(57) Біопрепарат для захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів на основі культурального середовища, що містить штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7096, який **відрізняється** тим, що додатково містить водний екстракт біогумусу та мікроелементи залізо, бор, мідь, марганець, цинк, молібден при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

культуральне середовище, що містить <i>Pseudomonas aureofaciens</i> IMB B-7096 з концентрацією бактеріальних клітин $1,0-3,0 \times 10^{10}$ клітин/мл	40-60
водний екстракт біогумусу (біогумус/вода - 1 ваг. ч./3 об. ч.)	35-40
мікроелементи:	
залізо	0,07-0,09
бор	0,04-0,05
мідь	0,01-0,02
марганець	0,03-0,04
цинк	0,03-0,04
молібден	0,005-0,006.

Корисна модель відноситься до галузі біотехнології, зокрема, до бактеріальних препаратів для біоконтролю фітопатогенних мікроорганізмів на основі бактерій роду *Pseudomonas*. Запропонований біопрепарат може використовуватися у сільському господарстві з метою захисту врожаю сільськогосподарських культур та боротьби з хворобами, спричиненими грибовими патогенами.

Провідне місце у системі захисту рослин від фітопатогенів та запобігання зниження врожаю посідають хімічні засоби. Проте використання пестицидів призводить до небажаних з точки зору екології наслідків. Розвиток та впровадження екологічно орієнтованих систем сільського господарства, одержання екологічно чистих продуктів є одним з найбільш перспективних напрямків розвитку сучасного сільського господарства. Основна роль у цьому підході належить біопрепаратам на основі корисних мікроорганізмів, регуляторів росту та мікроелементів. Основною позитивною властивістю біологічних засобів є, те що практично всі мікроорганізми, що входять до складу таких препаратів, виділені з природних умов і при внесенні знову в природні умови не призводять до небажаних змін в біоценозах, зберігаючи інші корисні організми, а також дають змогу уникнути забруднення повітря, води і рослин стійкими хімічними сполуками. Проте асортимент біологічних засобів захис-

ту рослин, на відміну від хімічних, на сьогоднішній день є недостатнім. Тому одним з важливих напрямків досліджень є створення нових ефективних та екологічно безпечних біопрепаратів як засобів підвищення врожайності рослин та поліпшення якості сільськогосподарської продукції.

Серед ризосферних мікроорганізмів частіше за інші використовуються бактерії з родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azomonas*, *Agrobacterium*. Мікроорганізми роду *Pseudomonas* характеризуються здатністю синтезувати широкий спектр вторинних метаболітів, у тому числі антибіотиків, зокрема, антибіотичних речовин широкого спектра дії, що забезпечують обмеження чисельності патогенів та, як наслідок, захист рослин від мікроорганізмів, що викликають захворювання. Крім вираженої протимікробної дії щодо фітопатогенних мікроорганізмів, псевдомонади здатні викликати у рослин резистентність до патогенів, зокрема, до фітопатогенних грибів. Така дія мікроорганізмів роду *Pseudomonas* забезпечує опосередковану стимуляцію росту рослин. Біопрепарати на основі псевдомонад викликають пригнічення кореневих патогенів, поліпшують мінеральне живлення рослин та, таким чином, активізують їх ріст та розвиток.

Є описаним бактеріальний препарат «Агат-25К» для підвищення врожаю рослин та захисту їх від хвороб, який містить мікроорганізми

(13) U

(11) 44245

(19) UA

Pseudomonas aureofaciens штаму ВКМ В-1973Д, збалансований розчин макро- та мікроелементів, автолізат проростків сої, хвойний екстракт та хлорофіл-каротинову пасту (RU2111196, 1998). Препарат характеризується високими фунгіцидними властивостями та активізує ростові процеси у рослин. Проте описаний біопрепарат містить компоненти, які є досить дорогими (хлорофіл-каротинова паста, хвойний екстракт) або потребують тривалого та складного процесу одержання (автолізат проростків сої).

Найбільш близьким до заявленої корисної моделі є біопрепарат «Бізар» для захисту рослин від хвороб, викликаних фітопатогенними грибами, та спосіб його одержання (UA23657, 2007). Біоагентом препарату виступає активний штам бактерій *Pseudomonas aureofaciens* Kluuyver 1MB В-7096 та продукти його життєдіяльності. Біопрепарат є ефективним у боротьбі з мікроорганізмами, які уражують зернові та зернобобові культури, проте його недоліком є недостатня активність щодо підвищення резистентності самої рослини, а отже, недостатня ефективність.

Задача даної корисної моделі полягає в одержанні нового біопрепарату на основі активного штаму *Pseudomonas aureofaciens*, який, крім дії на фітопатогенні мікроорганізми, є також ефективним у підвищенні резистентності самих сільськогосподарських рослин до фітопатогенів. За рахунок цього забезпечується підвищення ефективності запропонованого біопрепарату, що дозволяє ефективно вирішувати проблему захисту врожаю різних культур рослин від фітопатогенних грибів.

Вказана задача вирішується тим, що біопрепарат для захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів включає активні мікроорганізми штаму бактерій *Pseudomonas aureofaciens* 1MB В-7096, водний екстракт біогумусу та мікроелементи залізо, бор, мідь, марганець, молібден, цинк при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

Культуральне середовище, що містить <i>Pseudomonas aureofaciens</i> 1MB В-7096 з концентрацією бактеріальних клітин $1,0 \cdot 10^{10}$ клітин/мл	40-60
Водний екстракт біогумусу (біогумус/вода-1 ваг.ч./3 об.ч.)	35-40
Мікроелементи:	
- залізо	0,07-0,09
- бор	0,04-0,05
- мідь	0,01-0,02
- марганець	0,03-0,04
- цинк	0,03-0,04
- молібден	0,005-0,006

Механізм підвищення ефективності препарату досягається завдяки синергічній дії трьох складових препарату. У дослідях, що були проведені з окремими компонентами препарату, було продемонстровано, що заявлений біопрепарат володіє активністю щодо захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів, яка перевищує таку для його окремих компонентів. Так, водний екстракт біогумусу, який містить водорозчинні солі природних гумінових кислот - гумати та фульвати Na, K та NH_4 , є відомим біостимулятором росту і розвитку

рослин («Регулятори росту на основі природної сировини та їх застосування у рослинництві», Київ, Логос, 2006, стор. 125). Гумінові кислоти, взаємодіючи з кореневою системою і ґрунтом, сприятливо впливають на засвоєння мікроелементів і фосфору, сповільнюють винос поживних елементів із ґрунту і поліпшують затримку вологи. Крім того, вони, очевидно, сприяють максимальному виявленню імунного потенціалу рослин, що забезпечує опірність організму рослини. Мікроорганізми *Pseudomonas aureofaciens* відповідають за синтез антибіотичних речовин широкого спектру дії, а мікроелементи відіграють важливу роль у всіх процесах життєдіяльності рослин: у діленні клітин та синтезі білків, підвищують активність ферментів, підвищують стійкість рослин до хвороб; знімають стрес у рослин після посухи, заморозків, внесення пестицидів.

Саме сукупність усіх цих факторів і забезпечує підвищення ефективності захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів при застосуванні запропонованого біопрепарату.

Запропонований біопрепарат є ефективним для боротьби з такими фітопатогенними мікроорганізмами, що уражують зернові та зернобобові рослини (фузаріоз, гелмінтоспориоз, коренева гниль), виноград (оїдіум, мільдю), плодові культури (борошниста роса, парша). Слід також зазначити, що вказаний біопрепарат не є фітотоксичним, а також не токсичний для людини, теплокровних тварин та риб.

Штам *Pseudomonas aureofaciens*, що використовується у біопрепараті, є задекларованим в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номерами 1MB В-7096.

Запропонований біопрепарат для захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів одержували наступним чином. Культуру бактерій-антагоністів фітопатогенних грибів *Pseudomonas aureofaciens* 1MB В-7096 отримували шляхом культивування їх у збалансованому живильному середовищі наступного складу, г/л

автолізат дріжджів пекарських	46-50
цукор	8-10
K_2HPO_4	0,4-0,5
NH_4SO_3	0,8-1,0
NaCl	0,9-1,0
вода дистильована	решта
pH	7,2-7,5

При цьому стерилізують 100г живильного середовища протягом 2 годин при температурі 100°C , охолоджують до $33-35^\circ\text{C}$, поміщають 10мл стерилізованого середовища в пробірку, засівають пробірки початковою культурою, вирощують її протягом 34-35 годин при температурі $27-30^\circ\text{C}$, потім стерилізують 10л живильного середовища протягом 2-х годин при температурі 100°C , охолоджують до $33-35^\circ\text{C}$, визначають титр біомаси, поміщають у міні-ферментер на 50л, засівають середовище 10мл біомаси, отриманої у пробірці, вирощують культуру в міні-ферментері протягом 34-36 годин при температурі $30-32^\circ\text{C}$ при постійному перемішуванні та поданні стерильного повітря, проводять перевірку матеріалу на стерильність, визначають титр біомаси, проводять визначення pH

середовища (оптимальним є значення pH 7,2-7,5), 10л вирощеної біомаси поміщають у стерилізоване живильне середовище того ж складу, розміщене у ферментері на 1 тонну, здійснюють засівання ферментера через засівний штуцер у зоні полум'я, біомасу вирощують 45-48 годин при температурі 32-35°C при поданні повітря під тиском до 1атм. та одержують біомасу з титром $9 \cdot 10^{10}$, у період культивування для контролю процесу розвитку бактерій у біомасі з апарата відбирають проби. Підрахунок кількості бактерій можна здійснювати під мікроскопом за допомогою безпосереднього методу у камері Горяєва або ж за допомогою способу на основі підрахунку колоній, які утворюються на агаризованому поживному середовищі при засіванні у чашки Петрі різних концентрацій препарату у вигляді послідовних десятикратних розведень.

Одержане культуральне середовище, що містить мікроорганізми *Pseudomonas aureofaciens* 1MB B-7096 та продукти їх життєдіяльності, охолоджували до температури 20°C, додавали водний екстракт біогумусу (біогумус/вода - 1ваг.ч./3об.ч.) та комерційно доступні мікроелементи у відповідності із вказаними вище кількостями та фасували одержаний біопрепарат. Готовий біопрепарат являє собою світло-коричневу рідину, яка має запах поживного середовища.

Запропонований біопрепарат не вірулентний і не токсичний для лабораторних тварин і людини, не виявляє негативної дії на корисні організми біоценозу, може використовуватися на будь-якій фазі розвитку рослин.

Приведений нижче приклад призначений для ілюстрації та пояснення запропонованої корисної моделі. Так, для підтвердження ефективності запропонованого біопрепарату проводили досліді для перевірки його ефективності щодо захисту сільськогосподарських культур від фітопатогенних мікроорганізмів.

Приклад 1

Для визначення ефективності запропонованого біопрепарату проводили випробування біопрепарату в умовах польового дрібноділянкового досліді з використанням уражених рослин пшениці, ячменю, жита та вівса, томатів, огірків, винограду. З цією метою готували розчин запропонованого біопрепарату з розрахунку норми витрати на обробку 1га площі вирощування культури. Обробку здійснювали шляхом обприскування сільськогосподарських культур або їх насіння водною суспензією препарату.

Після цього визначали ефективність запропонованого біопрепарату. Дані представлені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Культура	Об'єкт обробки	Хвороба рослини	Норма витрати біопрепарату, л/га	Ефективність (% зниження хвороботворних мікроорганізмів)
Виноград	Деревина, листя	Мільдю, оїдіум	4,5	75-80
			5,0	80-85
			6,0	85-90
Пшениця, ячмінь, жито, овес	Насіння, коренева система, стебло, колосся	Сажка, борошниста роса, коренева гниль	5,0	75-82
			6,5	80-86
			8,0	85-92
Томати, огірки	Листя, коренева система	Фітофтороз, парша, аскохітоз, борошниста роса	8,0	75-80
			9,0	80-85
			10,0	85-90

З Таблиці 1 видно, що оптимальними нормами витрати біопрепарату для максимального знищення хвороботворних мікроорганізмів на різних сільськогосподарських культурах є: для винограду - 6л/га, для пшениці, ячменю, жита, вівса - 7 л/га, для томатів, огірків - 10л/га.

Приклад 2

Для визначення ефективності запропонованого біопрепарату проводили випробування біопрепарату в умовах польового крупноділянкового досліді при використанні уражених рослин пшениці, ячменю, жита та вівса, томатів, огірків, винограду.

З цією метою проводили обробку шляхом обприскування сільськогосподарських культур водною суспензією препарату при наступних нормах витрати запропонованого біопрепарату: для винограду - 6л/га, для пшениці, ячменю, жита, вівса - 7л/га, для томатів, огірків - 10л/га. У паралельному досліді проводили обприскування рослин біопрепаратом «Бізар» згідно з прототипом.

Після цього визначали ефективність запропонованого біопрепарату шляхом оцінки підвищення врожайності культур у порівнянні з необробленими рослинами. Дані представлені у Таблиці 2.

Таблиця 2

Культура	Площа обробки, га	Норма витрати біопрепарату, л/га	Число обробок за сезон	Підвищення врожайності культур при обробці запропонованим біопрепаратом у порівнянні з необробленими рослинами, %	Підвищення врожайності культур при обробці біопрепаратом «Бізар» згідно з прототипом у порівнянні з необробленими рослинами, %
Виноград	400	7,0	4-5	28-35	15-22
Пшениця, ячмінь, жито, овес	1000	7,0	2	25-30	22-28
Томати, огірки	50	10,0	5-6	30-35	25-28

Таким чином, проведені дослідження показали, що за своєю ефективністю запропонований біопрепарат забезпечує ефективний захист сільськогосподарських культур від фітопатогенних мікроорганізмів. Препарат може використовуватися для обробки рослин з метою їх захисту від грибо-

вих захворювань. Врожайність на варіантах із застосування заявленого біопрепарату була вищою у порівнянні з такою для необроблених рослин та для рослин, оброблених біопрепаратом «Бізар» згідно з прототипом.