



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90181

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12N 1/20

A01N 63/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) ШТАМ BACILLUS SUBTILIS - АНТАГОНІСТ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ ТА БІОПРЕПАРАТ НА ЙОГО ОСНОВІ, ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ ЗАХИСТУ ЗЕРНОБОБОВИХ КУЛЬТУР**

1

2

(21) a200806666

(22) 15.05.2008

(24) 12.04.2010

(46) 12.04.2010, Бюл.№ 7, 2010 р.

(72) ЛАПА СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА, АВДЕЄВА ЛІЛІЯ ВАСИЛІВНА, ДАНКЕВИЧ ЛЮДМИЛА АНАТОЛІЙВНА

(73) ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) SU A1 1717156, 07.03. 1992.

UA A 54923, 17.03.2003.

UA A 10344, 29.07.1993.

(57) 1. Штам бактерій *Bacillus subtilis*, депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології

ім. Д.К.Заболотного НАН України як *Bacillus subtilis* IMB B-7243, як агент для захисту зернобобових культур від хвороб, збудниками яких є фітопатогенні бактерії та гриби.

2. Біопрепарат для захисту зернобобових культур від хвороб, збудниками яких є фітопатогенні бактерії та гриби, який **відрізняється** тим, що як активний агент містить біомасу штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7243 та прийнятний наповнювач.

3. Біопрепарат за п.2, який **відрізняється** тим, що активним агентом є вегетативні клітини та спори штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7243.

4. Біопрепарат за п.2, який **відрізняється** тим, що прийнятним носієм є водний розчин лактози.

Винахід належить до мікробіології та сільськогосподарства і може бути застосований для захисту рослин від хвороб, викликаних фітопатогенними бактеріями та грибами.

Відомий штам *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ №128 - антагоніст деяких бактерій та грибів [1]. Недоліком вказаного штаму є те, що він активний щодо збудників хвороб бавовнику, не проявляє антагоністичної дії щодо фітопатогенних бактерій, які викликають бактеріозиди сільськогосподарських рослин, має антагоністичну дію тільки до окремих штамів фітопатогенних бактерій та грибів, тобто має обмежений спектр дії.

В основу даного винаходу покладене завдання створити високоефективний біопрепарат на основі біомаси бактерій *Bacillus subtilis*, який би володів широким спектром антагоністичної дії щодо збудників хвороб зернобобових культур.

Покладене завдання вирішується тим, що для створення біологічного препарату для захисту сільськогосподарських культур від ураження фітопатогенними бактеріями та грибами пропонується штам *B. subtilis* 1401, депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім.

Д.К.Заболотного НАН України як *Bacillus subtilis* 1MB B-7243 Штам *Bacillus subtilis* 1MB B-7243 був виділений з ґрунту і являє собою грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу.

На МПА, сусло-агарі, середовищі Громико відмічено інтенсивний ріст, утворює матові складчасті колонії бежевого кольору з порізнаними краями.

В препаратах, виготовлених з чистої культури, яка виросла на МПА при 37°C, час культивування - 18 годин, та забарвлених за Грамом, реєструються прямі паличковидні клітини розміром 2,1×1,0мкм, розташовані поодинокі, зрідка ланцюгами. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються. На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, манніт, ксиліозу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму.

(13) C2

(11) 90181

(19) UA

Культивування можна проводити на середовищах - МПА, середовищі Громико, агаризованому середовищі Гаузе №2 при t 137°C.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму.

Штам зберігається на МПА, середовищі Громико, агаризованому середовищі Гаузе №2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз на рік.

До унікальних особливостей штаму слід віднести його здатність проявляти антагоністичну активність щодо фітопатогенних бактерій та грибів, які викликають кореневі гнилі зернобобових культур.

Приклад 1. Визначення антагоністичної активності щодо фітопатогенних бактерій.

Для визначення антагоністичної активності щодо фітопатогенних бактерій по діаметру пластинок картопляного агару в чашках Петрі засівали

штрихами антагоніст *B.subtilis* ВНИИСХМ 128, а в інші чашки аналогічно *B.subtilis* 1401 і культивували при 28°C протягом двох днів. Потім до вирощених макроколоній бацил штрихами перпендикулярно із суспензій у фізіологічному розчині 5×10^8 КУО/мл підсівали культури різних видів бактерій, вирощували далі при 28°C ще три дні. За наявністю і розмірами зон відсутності росту штамів різних видів фітопатогенних бактерій робили висновок про чутливість до антимікробних речовин бацил і про спектр антимікробної дії останніх. (Табл. 1).

Таким чином, штам *B.subtilis* 1401 проявляє антагоністичну дію на бактерії родів *Xantomonas*, *Clavibacter*, *Pseudomonas* та *Erwinia*.

Таблиця 1

Експертна оцінка антагоністичної активності *Bacillus subtilis* 1401 щодо бактеріальних тест-культур

| Тест-штами | Антагоністична активність штамів щодо тест-культур (зони затримки росту тест-культур) | |
|---|---|--|
| | Штам-прототип <i>B. subtilis</i> ВНИИСХМ 128 | Штам, що пропонується <i>B. subtilis</i> 1401 |
| <i>Xantomonas campestris</i> 8003 b | - | + |
| <i>X. maltophilia</i> | - | + |
| <i>X. malvacearum</i> 6518 | - | + |
| <i>X. phaseoli</i> 262 | + | + |
| <i>X. ampelina</i> 10 a | - | + |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> 5816 | - | + |
| <i>P. gladioli</i> 8573 | - | + |
| <i>P. lachrymans</i> 7395 | - | + |
| <i>P. syringae</i> 8511 | - | + |
| <i>Erwinia carotovora</i> 8982 | + | + |
| <i>Clavibacter michiganense</i> 10 ₂ | - | + |

Приклад 2. Визначення антагоністичної активності щодо фітопатогенних грибів. Для визначення специфічної активності штаму *B.subtilis* 1401 досліджували його антагоністичну активність відносно тест-культур фітопатогенних грибів. Дослідження проводили методом радіальних штрихів за методом Єгорова [3]. Для цього готували суспензію штаму *B.subtilis* 1401 з титром 5×10^9 КУО/мл. Отриманий завис висівали петлею в центр чашки Петрі з агаризованим середовищем Гаузе №2. Посіви інкубували в термостаті при 28°C протягом

72 год. До культури, яка виросла, підсівали штрихом тест-мікроорганізми (5×10^9 КУО/мл). Чашки з тест-культурами грибів культивували при 28°C протягом 5 діб. Облік результатів проводили за величиною зон затримки росту тест-культур. Контролем росту тест-культур слугувало паралельне вирощування їх на чашках з агаризованим середовищем Гаузе №2 без культури-антагоніста.

Таким чином, штам *B.subtilis* 1401 характеризується високою антагоністичною активністю щодо широкого спектру фітопатогенних грибів (Табл. 2).

Таблиця 2

Експертна оцінка антагоністичної активності *Bacillus subtilis* 1401 щодо фітопатогенних грибів

| Тест-культури | Зони затримки росту тест-культур, мм |
|---|--------------------------------------|
| <i>Alternaria alternata</i> | 22 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 16 |
| <i>Cladosporium</i> sp. | 16 |
| <i>Fusarium solani</i> var. <i>arigillaceum</i> | 10 |
| <i>F. gibbosum</i> | 9 |
| <i>F. graminearum</i> | 13 |
| <i>F. solani</i> | 12 |

Продовження таблиці 2

| | |
|---|----|
| <i>F. oxysporum</i> 53674 | 10 |
| <i>F. oxysporum</i> (ячмінь) | 13 |
| <i>F. oxysporum</i> (люпин) | 11 |
| <i>F. moniliformis</i> v. <i>lactis</i> | 13 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 12 |
| <i>Thielaviopsis basicola</i> | 12 |
| <i>Thrichothecium roseum</i> | 21 |
| <i>Verticillium dahliae</i> 16071 | 10 |
| <i>V. dahliae</i> (бавовник) | 14 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 18 |

Приклад 3. Оцінка безпечності для теплокровних тварин.

Обов'язковою умовою впровадження штамів для використання їх як основного інгредієнта в біопрепараті повинна бути його безпечність для теплокровних тварин. Для визначення безпечності штаму *B. subtilis* 1401 для теплокровних тварин готували робочі суспензії в фізіологічному розчині (за оптичним стандартом мутності) і вводили рекомендовані дози перорально та внутрішньоочеревинно мишам. Для кожного варіанту дослідних

зразків використовували не менше ніж 10 мишей масою 16-18г. Дослідний зразок рахується безпечним, якщо всі миші залишались живими протягом 5 днів спостереження.

Таким чином, штам *B. subtilis* 1401 безпечний для лабораторних тварин. Введення штаму тваринам різними способами в значних дозах не викликає загибелі і не викликає патологічних змін внутрішніх органів. Результати досліджень безпечності штаму *B. subtilis* 1401, представлені в Табл. 3.

Таблиця 3

Експертна оцінка вивчення безпечності штаму *Bacillus subtilis* 1401 на мишах

| Курс введення | Доза, КУО/мл | Шлях введення | Кількість тварин в досліді | Захворіло | Загинуло | Вижило | Безпечність |
|---|----------------------|----------------------|----------------------------|-----------|----------|--------|-------------|
| Результати дослідження вірулентності культури | | | | | | | |
| 1 | $1,0 \times 10^9$ | Внутрішньоочеревенно | 10 | 0 | 0 | 10 | Безпечний |
| 1 | $2,0 \times 10^9$ | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | $1,0 \times 10^9$ | Пероральне | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | $2,0 \times 10^9$ | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| Результати дослідження токсичності культури | | | | | | | |
| 1 | $1,0 \times 10^9$ | Внутрішньоочеревенно | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 1 | $2,0 \times 10^9$ | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | $1,0 \times 10^9$ | Пероральне | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | $2,0 \times 10^{10}$ | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| Результати дослідження токсигенності культури | | | | | | | |
| 1 | 1,0мл | Внутрішньоочеревенно | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 1 | 2,0мл | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | 1,0мл | Пероральне | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| 5 | 2,0мл | "- | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |
| контроль | 1,0мл | Внутрішньоочеревенно | 10 | 0 | 0 | 10 | "- |

Приклад 4. Процес виготовлення зразків біопрепарату на основі біомаси штаму *Bacillus subtilis* 1MB 5-72.

Процес складається з таких етапів:

Допоміжна робота.

- підготовка посуду (миття, стерилізація);
- підготовка розчину для технології (0,85% хлориду натрію, наповнювача);
- стерилізація посуду і матеріалів;
- приготування поживних середовищ (агаризоване сусло, м'ясо-пептонний агар, середовище Громико, середовище Гаузе) і дезінфікуючих розчинів (перекис водню в суміші з миючими засоба-

ми, хлорамін 4% розчин з активатором - 10% розчином нашатирного спирту, 70% етиловий спирт);

- стерилізація поживних середовищ;
- підготовка приміщень для асептичних робіт.

Підготовка штаму бактерії:

- розчинення ампули ліофілізованої культури *Bacillus subtilis* у 1мл 0,85% NaCl;
- посів мікроба на поживне середовище Громико в пробірки зі скошеним агаром;
- пересів на середовище Громико в чашки Петрі через 18-22год., $t +37^{\circ}\text{C}$;
- відбір типових колоній через 18-20год.;
- фарбування за Грамом;

- відсівання культури на поживне середовище в пробірки зі скошеним агаром на 18-22год., t +37°C.

Приготування маточної суміші мікроба:

- змив мікроба з пробірок зі скошеним агаризованим поживним середовищем і визначення концентрації (титру);

- розведення змиву мікроба 0,85% NaCl до 1-3 млрд/мл.

Отримання біомаси:

- засівання мікробіологічних матраців "маточною" сумішшю мікроба;

- розміщення матраців в термальну кімнату (t 37°C на 7-10 діб для вирощування спор);

- контроль на мікробну чистоту;

- змивання бактеріальної маси.

Приготування ліофілізованого концентрату:

- визначення концентрації (титру) мікроба в 1мл біомаси;

- розчинення біомаси у фізіологічному розчині;

- додавання наповнювача;

- розливання біомаси в лабораторний посуд;

- ліофільне сушіння;

- фасування ліофілізованого концентрату в придатний для його зберігання пакувальний матеріал (скляні ампули, поліетиленові мішечки, тощо).

Для приготування біопрепарату для обробки посівного матеріалу або вегетативних рослин ефективну кількість ліофілізованого концентрату бактерій *Bacillus subtilis* 1MB B-7243 відновлюють у придатному носії. Як носій використовують розчини цукрів або інші липкогенні композиції, добре відомі спеціалісту в даній галузі техніки. Обробку посівного матеріалу та рослин здійснюють способами добре відомими з рівня техніки.

Використана література:

1. Патент UA 698. А 01 №63/00. С12№1/20. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання препарату проти збудників захворювань бавовника. 15.12.93. Бюл.№2.

2. Бактериальные болезни растений. - Под ред. В.П.Израильского. - Изд. 3-е, перераб. и доп. - М.:Колос, 1979. - 288с.

3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Изд-во МГУ, 1994. - 512с.