



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103277** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 63/00

A01P 21/00

C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 05582**

(22) Дата подання заявки: **08.06.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.12.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.12.2015, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):

**Грабова Ганна Юліївна (UA),
Драговоз Ігор Володимирович (UA),
Авдєєва Лілія Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)**

(74) Представник:

Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289

(54) ШТАМ BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS SUBSP. PLANTARUM - ПРОДУЦЕНТ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК З КОМБІНОВАНОЮ АНТАГОНІСТИЧНОЮ ТА РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 1MB B-7524 - продуцент біологічно активних сполук з комбінованою антагоністичною та рістстимулювальною активністю.

UA 103277 U

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штаму на основі бактерій роду *Bacillus*, що продукує комплекс біологічно активних сполук, що виявляють рістстимулювальну активність щодо культури та антагоністичну активність стосовно фітопатогенної мікрофлори. Заявлений штам може використовуватися для

одержання біопрепаратів комплексної дії, які є направленими як на стимуляцію росту рослин, так і на захист такої рослини від збудників хвороб, що забезпечить підвищення врожаю сільськогосподарських культур.

На сьогоднішній день провідне місце у системі захисту рослин від фітопатогенів та запобігання зниження врожаю посідають хімічні засоби. Проте необхідність одержання високоякісної екологічно безпечної сільськогосподарської продукції вимагає заміни токсичних хімічних засобів для боротьби з фітопатогенами біопрепаратами на основі мікроорганізмів-антагоністів, які є високоефективними, екологічно безпечними і все ширше впроваджуються в практику сільського господарства.

Біопрепарати, зокрема, на основі бактерій - антагоністів, є не тільки альтернативою хімічним пестицидів, але й важливим елементом комплексної системи захисту в сучасному рослинництві, який дозволяє істотно знизити норми застосування хімічних препаратів. Стійкість рослин до хвороб, що викликаються фітопатогенами різної природи, багато в чому визначається процесами взаємодії між кореневою системою рослин і ґрунтовими мікроорганізмами. Відомо, що в ризосфері і філлоплані рослин між мікроорганізмами складаються різноманітні, в тому числі і конкурентні взаємини. Зокрема, високою антагоністичною активністю володіють аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. mesentericus*, *B. subtilis* та ін. Біологічні препарати на їх основі мають ряд істотних переваг, таких, як нешкідливість для людини і тварин, стійкість до несприятливих факторів зовнішнього середовища, що робить можливим їх ефективне застосування в боротьбі з хворобами рослин, викликаними фітопатогенами різної природи.

Природа антагоністичної активності бацил вивчена недостатньо, проте відомо, що ризосферні штами бацил здатні синтезувати антибіотичні речовини різної хімічної структури, в тому числі і широкий спектр ліпопептидних антибіотиків, таких, як фенгіцини і сурфактини, які є біосурфактантами. Пошук нових штамів - антагоністів фітопатогенних мікроорганізмів є актуальним завданням сучасної мікробіології, пов'язаної із створенням ефективних мікробних препаратів для біоконтролю захворювань рослин, а також пошуком перспективних продуцентів антибіотичних сполук.

У деклараційному патенті UA54923 (опубл. 17.03.2003) описується штам *Bacillus subtilis* 1MB B-7023 для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Вказаний штам має здатність мобілізувати фосфор з важкорозчинних неорганічних та органічних сполук фосфору (трикальційфосфат, гліцерофосфат, фітин та ін.) і виявляє антагоністичну активність щодо фітопатогенних грибів та бактерій, що викликають хвороби овочевих і злакових культур. Основним недоліком штаму є його невисока ефективність щодо фітопатогенної мікрофлори.

Є відомим штам *Bacillus subtilis* IMB B-7243, що використовується для захисту зернобобових культур від хвороб, збудниками яких є фітопатогенні бактерії та гриби (UA90181, опубл. 12.04.2010). Вказаний штам проявляє антагоністичну активність щодо бактерій родів *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pseudomonas* та *Erwinia*. Проте вказаний штам не проявляє високого антагонізму щодо фітопатогенів зернових культур, зокрема грибної етіології.

В Україні широкого застосування набув препарат "ФітоДоктор" ("Спорофіт") на основі штаму *Bacillus subtilis* MF-122 (пізніше перекласифікований та задепонований як *B. amyloliquefaciens* УКМ B-7100), який був одержаний на основі селекційного відбору ("Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні", офіційне видання, 2009 рік, стор. 199). Даний біопрепарат є призначеним для профілактики та лікування сільськогосподарських рослин від комплексу хвороб, які викликаються грибами та бактеріями, та є вибраним акторами як прототип заявленої корисної моделі. Проте вказаний штам, що є продуцентом сполук з антагоністичною активністю стосовно фітопатогенів, не виявляє рістстимулювальної активності на культури, а у ряді випадків навіть інгібує ріст та розвиток рослин.

Задача даної корисної моделі полягає у забезпеченні комбінованої активності штаму - як антагоністичної дії, спрямованої проти фітопатогенних бактерій та грибів, так і рістстимулювальної активності щодо самої рослини.

Вказана задача вирішується за рахунок одержання нового штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524, який є продуцентом біологічно активних сполук з комбінованою антагоністичною та рістстимулювальною активністю.

Bacillus amyloliquefaciens subsp. *plantarum* IMB B-7524 був ізольований у 2014 році з ґрунту с Кирчкери (Житомирська обл. Радомішльський р-н.) та класифікований у відповідності з Берджі (Bergey's manual of systematic bacteriology 3 (2nd ed.). - New York: Springer, 2009.).

5 Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму: штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 являє собою грампозитивні рухливі аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу. На МПА, сусло-агарі, картопляному агарі відмічено значний ріст.

10 На МПА утворює складчасті колонії білого кольору, в'язкої консистенції, краї неправильної форми. На сусло-агарі колонії бежевого кольору, складчасті, сухої консистенції, краї неправильної форми.

15 В мазках з колоній, які вирости на МПА, через 18 годин можна побачити прямі паличкоподібні клітини довжиною 2,0-2,2 мкм та діаметром 0,7-0,9 мкм, які розташовані поодинокі, попарно та зрідка ланцюгом. У клітинах виявлені спори еліпсоподібної форми, що займають центральне положення. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються.

На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, маніт, ксилізу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, росте на середовищах з 7 %-вою концентрацією NaCl, утилізує цитрат, не використовує пропіонат.

20 Фенотипічні властивості заявленого штаму є представленими у Таблиці 1.

Таблиця 1

Фенотипічні властивості штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524

Фізіолого-біохімічні характеристики заявленого штаму		
Ріст	аеробний	+
	анаеробний	-
Реакція Фогес-Проскауера		+
Редукція нітратів		+
Гідроліз	крохмалю	+
	казеїну	+
	тирозини	-
	желатини	+
Утилізація	цитрату	+
	пропіонату	-
Утворення	індолу	-
	сірководню	-
	аміаку	+
Наявність	уреази	+
	лецитинази	+
	каталази	+
Ріст при pH середовища	6	+
	7	+
	8	+
	9	+
	10	-
NaCl є необхідною для росту		-
Ріст при концентрації у середовищі	2 %	+
	5 %	+
	7 %	+
	10 %	+
Ріст при температурі, °C	20	+
	30	+
	40	+
	50	+
Кислотоутворення на середовищі з	глюкозою	+
	арабінозою	+
	манітом	+
	манозою	+
	саліцином	+
	крохмалем	+
	сахарозою	+
	ксилозою	+

Примітка: «+» - наявність ознаки, «-» - відсутність ознаки

Активність штаму: штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 синтезує комплекс біологічно активних речовин, що виявляють високу антагоністичну активність щодо широкого спектру фітопатогенних бактерій та грибів.

Спосіб одержання штаму та умови культивування: штам одержують шляхом посіву на поживні середовища: МПА, ТСА, сусло-агар, Гаузе № 2, КА та ін. Культивування здійснюють на сусло-агарі, МПА, середовищі Громико, картопляному агарі.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового культивування штаму: штам зберігається на сусло-агарі, середовищі Громико (МПА+СА), агаризованому середовищі Гаузе № 2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз на рік.

Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів та ін.): штам є чутливим до антибіотиків широкого спектру дії, що належать до різних класів.

Відомості про патогенність: штам не патогенний для теплокровних тварин.

Дана корисна модель може бути проілюстрована приведеними нижче прикладами конкретного здійснення.

Приклад 1. Вирощування штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524.

Культивування бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 здійснювали в колбах місткістю 750 мл з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв.) при 37 °С, рН 5,0-9,0 (оптимальне значення рН 7,0-8,0) упродовж 18-24 год. на рідкому мінеральному середовищі наступного складу (г/л): KH_2PO_4 -9,6; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -4,75; цитрат Na-1,29, MgSO_4 -0,18; глюкоза - 10. Як посівний матеріал використовували добову культуру вказаного штаму, вирощену на МПА, а також культуру в експоненціальній фазі росту, вирощену на середовищі, яке має приведений вище склад. Посівний матеріал вносили з розрахунку 5 об. % мікробної суспензії, оптична густина якої становила 10 од. за стандартом мутності ДІСК ім. Л.А. Тарасевича.

Приклад 2. Дослідження антагоністичної та рістстимулювальної активності штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524.

Антагоністичну активність досліджували методом радіальних штрихів (Егоров, 2004). Для цього 18-годинну культуру висівали у центр чашки діаметром 12 см на площу, окреслену кругом $d=2,5$ см. Через 3 доби інкубування при 28 °С підсівали радіальним штрихом тест-культури із суспензії 5×10^8 кл/мл. Зони відсутності росту підраховували через 24-48 год. інкубування, в залежності від швидкості росту тест-культури. Контролем слугували чашки, де заявлений штам був відсутній. У досліджах використовували тест-культури, отримані з колекції відділу фітопатогенних бактерій та відділу фізіології та систематики мікроміцетів IMB НАНУ. Результати експериментів є приведеними у Таблиці 2. де є представленою антагоністична активність заявленого штаму.

Таблиця 2

Антагоністична активність штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 щодо фітопатогенних мікроорганізмів

Фітопатогенні бактерії та гриби	Зони відсутності росту тест-культури, мм
Контроль	0
<i>Fusarium graminearum</i>	13±0,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	8±0,1
<i>Fusarium solani</i>	12±0,2
<i>Rhizoctonia solani</i>	19±0,3
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 7G	18±0,3
<i>Bipolaris sorokiniana</i> 9G	18±0,1
<i>Clavibacter michiganensis</i>	10,7±2,3
<i>Xantomonas campestris</i>	13,3±1,0
<i>Pseudomonas syringae</i>	9,7±1,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,0±0,3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13,3±2,0
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	23,3±2,3

Як видно з приведеної таблиці штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 виявляє антагоністичну активність стосовно цілого ряду фітопатогенів, як бактеріальної, так і грибової природи. Це дає можливість використовувати даний штам для боротьби з захворюваннями культур, які викликаються патогенними мікроорганізмами.

Рістстимулювальну активність запропонованого штаму визначали в умовах лабораторного дослідження при використанні проростків озимої пшениці сорту Смуглянка методом водної рулонної культури. З цією метою насіння пророщували протягом 7 діб з подальшим визначенням маси

паростків і коренів. Для порівняння використовували еталонний препарат "ФитоДоктор" від (ТОВ "Ензим", Україна) на основі штаму *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ-7100. 100 насінин пшениці замочували у відстояній водопровідній воді (контроль) та досліджуваних розведеннях культуральної рідини бацил. На поліетиленові смуги розміром 75 × 15 см накладали смугу зволоженого фільтрувального паперу шириною 10-12 см, і розкладали на неї по 33-34 насіння, відступаючи від верхнього краю 5 см. Зверху на насіння накладали ще одну смугу паперу. Скручували в рулон і ставили у банки з відстояною водопровідною водою. Морфометричні вимірювання проростків проводили на 7 добу, враховуючи приріст сирої надземної та кореневої маси, які виражали у відсотках щодо контролю. Дані стосовно рістстимулювальної активності заявленого штаму є представленими у Таблиці 3.

Таблиця 3

Рістстимулювальна активність *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524

Розведення культуральної рідини	Лабораторна схожість		Приріст маси паростків		Приріст кореневої маси	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> IMBB-7524	<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ-7100	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> IMBB-7524	<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ-7100	<i>B. amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> IMBB-7524	<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ-7100
1:200	49,65	3,58	62,20	2,01	80,54	5,33
1:300	22,16	1,03	22,08	3,74	9,90	-3,17
1:400	24,29	4,03	25,73	7,21	26,43	3,56
1:500	21,28	-6,21	13,86	-3,2	-0,50	-5,03
1:600	30,32	4,6	45,56	2,9	35,40	9,11

Таким чином, заявлений новий штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 виявляє виражену антагоністичну активність стосовно широкого спектру фітопатогенів, як бактеріальної, так і грибової природи, а також рістстимулювальну активність щодо оброблюваних культур, що являє собою значну перевагу у порівнянні із відомими технічними рішеннями.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 - продуцент біологічно активних сполук з комбінованою антагоністичною та рістстимулювальною активністю.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601