



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104623** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01N 63/00

A01P 21/00

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 07613**

(22) Дата подання заявки: **30.07.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2016**

(46) Публікація відомостей **10.02.2016, Бюл.№ 3**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Авдєєва Лілія Василівна (UA),
Хархота Максим Андрійович (UA),
Драговоз Ігор Володимирович (UA),
Борецька Катерина Євгенівна (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:

Піськова Олена Вілліївна, реєстр. №289

**(54) МЕЛАНІНСИНТЕЗУВАЛЬНИЙ ШТАМ BACILLUS SUBTILIS ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БІОПРЕПАРАТУ З
ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ**

(57) Реферат:

Меланінсинтезувальний штам *Bacillus subtilis* IMB B-7514 для одержання біопрепарату з фітостимулювальною активністю.

UA 104623 U

Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штаму на основі бактерій роду *Bacillus*, що продукує біологічно активні сполуки, зокрема природні меланінові пігменти, та може використовуватися для одержання біопрепарату, що характеризується рістстимулювальною активністю відносно сільськогосподарських культур.

Одна з важливих задач сучасного рослинництва полягає в інтенсифікації виробництва сільськогосподарських продуктів з одночасним скороченням енергетичних витрат. Тому зусилля вчених є направленними на пошук шляхів збільшення продуктивності при одночасному підвищенні якості продукції, що потребує розробки нових підходів до технологій вирощування культур. Новим елементом таких технологій може бути впровадження у виробництво біопрепаратів, які мають рістстимулювальну активність та сприяють стабілізації та підвищенню продуктивності рослинництва. Такі біопрепарати базуються на штаммах мікроорганізмів-продуцентів, що синтезують сполуки з фітостимулювальною активністю та здатні впливати на перебіг важливих процесів у рослинах, що дозволяє їм більш ефективно нагромаджувати біомасу та активно протистояти несприятливим факторам навколишнього середовища (посуха, високі та низькі температури, хвороби).

Меланін являє собою складну полімерну сполуку, що складається з окислених фенолів та належить до групи пігментів. Слово "меланін" перекладається з грецької мови як "чорний". Меланін зустрічається в різних таксономічних групах від одноклітинних до багатоклітинних організмів рослин і тварин. Природні меланіни утворюють складну полімерну структуру поліфенолкарбонового комплексу. Хімічна будова природних меланінів досі остаточно не встановлена внаслідок їх надзвичайно складної полімерної структури на відміну від синтетичних.

Білкові та меланінові молекули забезпечують життєдіяльність клітин, тканин і органів біологічних організмів. Меланіни володіють цілим рядом корисних властивостей - антиоксидантні, протизапальні, біозахисні, антирадіаційні, антитоксичні, протипухлинні та інші. Меланін являє собою один з найпотужніших антиоксидантів (концентрація парамагнітних центрів $8 \cdot 10^{17}$ спін/г). Крім того, було продемонстровано здатність меланіну виявляти фітостимуляторний ефект, подібний до такого, що має місце при обробці регуляторами росту на основі ауксину. При цьому вказаний ефект залежить від хімічної структури меланіну, яка, у свою чергу, може залежати від штаму-продуценту цієї активної сполуки.

Був описаний штам-продуцент *Vibrio alginolyticus*, який синтезує меланін [Авторське свідоцтво СРСР № 847679, опубл. 15.10.1984]. Як зазначено в описі, штам був виділений з морської води та задепонований у Всесоюзному науково-дослідному протичумному інституті "Мікроб" під номером Р-9831. Як зазначено в описі, зазначений штам може знайти своє застосування в одержанні агентів проти опромінення та протиракових агентів. Проте штам у відповідності з SU847679, що використовується для одержання меланіну, може викликати отит та інфекцію ран. З цієї причини штам не знайшов широкого застосування для одержання меланіну.

Є відомим штам *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom ВКПМ В-721, що є продуцентом меланіну [RU2067996, опубл. 20.10.1996]. Штам був виділений із імаго великої вошинної молі (*Galleria mellonella* L.) з подальшим перенесенням на агаризоване середовище Чапека з дріжджами та відбором колоній з вираженою чорною пігментацією агару. Культуральну рідину вказаного штаму використовували для одержання біопрепарату для стимуляції росту рослин. Зокрема, одержаний препарат на основі штаму *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thorn ВКПМ В-721, що продукує меланін, використовували для замочування насіння та обробки рослин в процесі вегетації. При цьому у досліді на рослинах огірків був продемонстрований рістстимулювальний ефект, а також виявлено підвищення урожайності цієї культури. Проте основним недоліком зазначеного штаму є те, що одержуваний при його використанні меланін характеризується низькою розчинністю, що ускладнює його подальше застосування.

Є відомим нітрозогуанідиновий мутантний штам *Bacillus thuringiensis* (штам не задепонований у відповідності з офіційною процедурою), що на відміну від батьківського вихідного штаму, який давно використовується для виробництва інсектицидних препаратів, мав здатність синтезувати бактеріальний меланін [Азарян К.Г. и др., Рост и развитие некоторых бобовых культур при обработке бактериальным меланином. - Биол. журнал Армении. - 3(60). - 2008]. В експериментах було продемонстровано стимулювальний вплив препарату на основі культуральної рідини, одержаної при культивування штаму, на бобові рослини, зокрема, квасолі, нут, горох, сочевицю та люцерну. Вказаний штам є вибраним як прототип заявленої

корисної моделі. Основним недоліком одержаного мутантного штаму є недостатньо висока ефективність меланіну, що виробляється цим штамом, для стимулювання росту рослин.

Задача даної корисної моделі полягає в одержанні нового більш ефективного штаму, який синтезує меланінові пігменти, які характеризуються високим фітостимуляторним ефектом.

5 Вказана задача вирішується за рахунок штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514, що характеризується високою ефективністю меланінових пігментів та призначений для одержання препарату з фітостимулювальною активністю.

Додатковим технічним результатом заявленої корисної моделі є те, що для вирощування вказаного штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514 можна використовувати більш дешеві та доступні субстрати, що значно здешевлює процес виробництва біопрепарату на його основі.

Заявлений штам був ізольований з ґрунту у м. Києві у 2010 році.

Спосіб одержання штаму: штам отримують шляхом посіву на поживні середовища: МПА, ТСА, сусло-агар, Гаузе № 2, КА та інші.

15 Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму: грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу. На МПА, ТСА, Гаузе № 2, середовищі Громико, картопляному агарі відмічено значний ріст.

На МПА утворює складчасті колонії, консистенція пастоподібна, брудно-білого чи білого кольору, краї правильної форми.

20 На ТСА утворює складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, краї правильної форми.

На середовищі Громико - складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, сірого чи чорного кольору, краї правильної форми, середовище навколо колонії забарвлюється в сірий або чорний з зеленуватим відтінком колір внаслідок продукції позаклітинних меланінових пігментів.

25 На середовищі Гаузе 2 - складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, сірого чи чорного кольору, краї правильної форми, середовище навколо колонії забарвлюється в сірий або чорний з зеленуватим відтінком колір внаслідок продукції позаклітинних меланіноподібних пігментів.

30 На картопляному агарі - колонії сірого кольору, консистенція пастоподібна, краї рівні, середовище навколо колонії забарвлюється в сірий або чорний з зеленуватим відтінком колір внаслідок продукції позаклітинних меланіноподібних пігментів.

35 В мазках з колоній, які вирости на ТСА, через 18 годин можна побачити прямі паличковидні клітини $2,5 \times 0,4$ мкм, які розташовані поодинокі, попарно та ланцюгом. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються.

На МПБ культура утворює плівку.

40 Штам ферментує глюкозу, арабінозу, ксилозу, мальтозу, галактозу, сахарозу з утворенням кислоти, не розкладають дульцит, рамнозу; дають позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує ескулін, крохмаль, казеїн, желатину, росте при 7 % NaCl, не утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах і при 10 % NaCl, не утворює газ з NO_3 , в анаеробних умовах, гідролізують крохмаль, желатину, сечовину; утилізують цитрат; не використовують пропіонат. Штам не росте в анаеробних умовах, не утворює полі- β -оксимасляної кислоти на МПА з глюкозою; не проявляють лецитиназної активності; індол, сірководень не утворює.

45 Продукт, що синтезується штамом: меланінові пігменти.

Активність штаму а також інші промислові показники: штам є продуцентом меланінових пігментів (до 1,72 г/л), що проявляють рістстимулювальну активність щодо рослин.

Умови культивування: культивується на середовищі сусло-агар, МПА, Громико, картопляний агар.

50 Спосіб визначення: виділення меланінових пігментів проводять шляхом кислото-лужної екстракції з подальшим відмиванням отриманого преципітату етанолом та ацетоном.

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

55 Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: розмноження можна проводити на середовищах аналогічного складу.

Відомості про патогенність: штам не патогенний для теплокровних тварин.

60 Заявлений штам *Bacillus subtilis* IMB B-7514 є ефективним для стимуляції росту рослин при розведенні 1:200, що відповідає встановленій концентрації меланінових пігментів у препараті культуральної рідини у даному розведенні 0,0086 % (0,086 г/л), у той час, як штам *Bacillus*

thuringiensis згідно з прототипом є ефективним для стимуляції росту рослин огірків при концентрації меланінових пігментів у препараті на рівні 0,016-0,025 % (0,16-0,25 г/л) [Тоноян Л.Е. и др. Влияние бактериального меланина на рост и развитие огурца в культуре in vitro и in vivo. Ученые записки Ереванского государственного университета, № 1, 2010, стр. 51]. Це свідчить про більш високу ефективність меланінових пігментів, що синтезуються заявленим штамом *Bacillus subtilis* IMB B-7514.

Дана корисна модель далі буде проілюстрована приведеними нижче прикладами конкретного здійснення.

Приклад 1. Вирощування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514.

Культивування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514 проводили в періодичних умовах у колбах на 750 мл при 200 об./хв. та 37 °С впродовж 24 годин на рідкому глюкозо-мінеральному середовищі наступного складу (г/л):

цитрат натрію	1,29
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,75
KH ₂ PO ₄	9,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18
глюкоза	10-15
pH середовища	7,0±0,2.

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 фітотоксичності та рістстимулювальної активності штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514.

Культуру *Bacillus subtilis* IMB B-7514 вирощували так, як описано у Прикладі 1. Рідку культуру заявленого штаму центрифугували 30 хв. при 8000 g. Одержану культуральну рідину використовували для специфічного біотестування.

Дослідження проводили на моделі рулонної культури пшениці сорту "Смуглянка" за методом Берестецького (1972). Для цього насіння (n=34) протягом 30 хв. замочували у відповідних розведеннях (нерозведене культуральне середовище, розведення 1:50, 1:100, 1:200) добової культури штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514, потім підсушували та розкладали на смужках поліетилену між фільтрувальним папером. Як контроль використовували водопровідну воду. Проростки вирощували протягом 7 діб при температурі 24 °С. Після закінчення терміну спостереження оцінювали середню вагу надземної, підземної частини паростків та схожість насіння.

Так, було продемонстровано, що обробка насіння препаратом культуральної рідини у розведенні 1:200 підвищувала схожість пшениці до 75 %. У порівнянні з контролем (35 %) схожість насіння пшениці підвищувалася більше ніж у 2 рази. Таким чином, використання культури *B. subtilis* IMB B-7514 у розведенні 1:200 значно підвищує схожість пшениці.

Відомо, що збільшення маси підземної частини у рослин (коренева система) є позитивним критерієм для їх виживання. Було проведено дослідження впливу культури *B. subtilis* IMB B-7514 на масу підземної частини проростків пшениці сорту "Смуглянка". Дані наведені у Таблиці.

Таблиця

Маса підземної частини проростків пшениці під впливом культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7514

Розведення культуральної рідини	Маса підземної частини, г	% від контролю
Контроль (водопровідна вода)	0,04	100
Нерозведена культуральна рідина	0,035	87,5
1:50	0,055	137,5
1:100	0,065	162
1:200	0,08	200

Як видно з представлених даних, при використанні розведення 1:200 маса коріння збільшувалася в середньому до 0,08 г, у порівнянні до 0,04 г у контролі. Розведення 1:50 і 1:100 збільшує масу підземної частини рослини відповідно до 0,055 і 0,065 г, що є достовірно

більшим, ніж у контрольній групі. Нерозведена культуральна рідина навпаки, зменшує масу коріння до 0,035 г. Це свідчить про інгібувальний вплив з причини занадто високої концентрації меланінових пігментів у розчині.

Впливу культури штаму *B. subtilis* IMB B-7514 на масу надземної частини рослини досліджували при використанні розведення культуральної рідини 1:200. При цьому було встановлено, що запропонований штам підвищував масу надземної частини проростків пшениці сорту "Смуглянка" на 145,5 % (0,16 г проти 0,11 г у контролі).

У досліді також вивчали ауксиноподібну активність заявленого штаму у моделі видовження колеоптилей пшениці за загальноприйнятою методикою (Бояркин А.М. Метод количественного определения активности ростовых веществ в: Методы определения регуляторов роста и гербицидов. - Москва: Наука, 1966. - с. 13-15). Для видалення можливих гормонів росту, які можуть синтезуватися одночасно з меланіновими пігментами, культуральну рідину тричі обробляли етилацетатом.

Було встановлено, що культуральна рідина штаму *B. subtilis* IMB B-7514 у розведенні 1:200 виявляла ауксиноподібну активність, оскільки у цьому випадку спостерігали видовження колеоптилей пшениці на 21,1 %, що є на рівні ефекту, який викликається за дії ІОК у концентрації 10^{-5} М.

Приклад 3. Дослідження індукції ризогенезу при використанні штаму *B. subtilis* IMB B-7514.

Культуру *Bacillus subtilis* IMB B-7514 вирощували так, як описано у Прикладі 1. Рідку культуру досліджуваного штаму центрифугували 30 хв. при 8000 г. Одержану культуральну рідину використовували для специфічного біотестування.

Для дослідження індукції ризогенезу використовували двотижневі живці квасолі сорту Лопата. Варіантами досліді були культуральна рідина, кислоторозчинна та лугорозчинна фракції меланінових пігментів у розведенні 1:50. За контроль слугували відстояна водопровідна вода та препарат-еталон - індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) у концентрації 10^{-5} М. Основні показники фізіологічної активності досліджуваних розчинів являли собою наступні: кількість коренів та розмір ділянки зони ризогенезу.

Отримані результати продемонстрували стимулювальний вплив меланінсинтезувального штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514 на ризогенез квасолі сорту Лопата. Так, кислоторозчинна фракція культуральної рідини заявленого штаму підвищувала величину зони ризогенезу на 437 % у порівнянні із контролем, а лугорозчинна - на 70 % (у той час, як відповідний показник для ІОК складав 48 % від контролю). Середня кількість коренів за обробки кислоторозчинною фракцією штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7514 зростала на 187 %, а лугорозчинною - на 30 % (у той час, як відповідний показник для ІОК складав 35 % від контролю). Приріст біомаси коренів відносно контролю підвищувався на 147 % за обробки кислоторозчинною фракцією, та на 125 % - лугорозчинною.

Таким чином, заявлений новий меланінсинтезувальний штам *Bacillus subtilis* IMB B-7514 виявляє виражену рістстимулювальну активність щодо оброблюваних культур, що дає можливість використовувати його для одержання фітостимулювальних біопрепаратів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Меланінсинтезувальний штам *Bacillus subtilis* IMB B-7514 для одержання біопрепарату з фітостимулювальною активністю.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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