



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108124** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C05F 11/00
A01N 63/00
A01N 65/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|---|--|
| (21) Номер заявки: u 2015 09949 | (72) Винахідник(и): Лобан Людмила Людвігівна (UA), Сметана Юлія Миколаївна (UA), Кузьменко Олександр Олександрович (UA), Горобченко Людмила Михайлівна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 12.10.2015 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.07.2016 | (73) Власник(и): ІНЖЕНЕРНО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ "БІОТЕХНІКА" НААН, вул. Маяцька Дорога, 26, смт Хлібодарське, Біляївський р-н, Одеська обл., 67667 (UA) |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.07.2016, Бюл.№ 13 | |

(54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА КОМПЛЕКСНОГО БІОПРЕПАРАТУ ФУНГІЦИДНОЇ ДІЇ ТРИХОПСИН З ЕНТОМОЦИДНИМИ І РІСТСТИМУЛЮЮЧИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

(57) Реферат:

Спосіб виробництва комплексного препарату Трихопсин включає застосування мікроорганізмів із різних таксономічних груп та різною специфічністю дії. Інокуляцію рідкого ферментативного середовища здійснюють одночасно посівними культурами з твердих агаризованих середовищ у співвідношенні 1:1. Далі проводять культивування продуцентів з різним типом метаболізму, що пройшли гігієнічне регламентування, протягом 24 год., до накопичення біомаси з життєздатними мікроорганізмами, які за рахунок синергічних взаємовідносин утворюють цільові субстанції в комплексному препараті з широким спектром фунгіцидної, ентомоцидної і рістстимулюючої дії.

UA 108124 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до виробництва комплексного біопрепарату для сільського господарства, який може бути застосований в біологізації землеробства для підвищення врожаїв і захисту рослин від хвороб та шкідників. На думку багатьох мікробіологів комплексні препарати більш ефективні і при правильному застосуванні визначають надійний біозахист рослин.

В Україні запропоновані способи виробництва біопрепаратів комплексної дії для передпосівної інокуляції бобових культур (об'єднуюча назва - ризогуміни).

Запропоновані також способи виробництва біопрепаратів комплексної дії, які складаються з декількох етапів, і біосинтез яких триває не менше 48 год. При виробництві комплексного біозасобу Агату-25 (Агату-25К), який прийнято за прототип, окрім біосинтезу для одержання кінцевого продукту передбачено приготування екстрактів біостимуляторів, флаванолідів тощо.

Недоліки прототипу комплексної дії:

- спосіб виробництва складається з декількох етапів, що є трудовитратно;

- біосинтез препарату триває не менше 48 год. (енерговитратно);

- Агат-25 - це суміш продуцентів, відсутня інформація про дослідження їх антагоністичних властивостей в біосполуці;

- комплексна дія препарату забезпечується додатковими складовими, які готуються окремо шляхом екстрагування або розчинення компонентів та визначенням їх частки в водній суспензії, одержаній шляхом біосинтезу, спосіб - матеріаломісткий;

- змішування всіх одержаних інгредієнтів (компонентів) у визначених співвідношеннях не завжди може забезпечити очікуваний результат;

- приведення цільових параметрів в препараті згідно вимог нормативно-технічної документації потребує часу і грамотних технологічних підходів;

- цільові субстанції препарату цілком залежать від якісних характеристик складових, тому тут не виключене вхідне контролювання сировини, яка застосовується при виробництві комплексного препарату Агат-25К.

Спосіб - трудомісткий та енергомісткий, необхідне додаткове забезпечення приладами та устаткуванням;

- за рахунок багатоконпонентності не виключені реакційні процеси між хімічними складовими, які формують препаративну комбінацію, що може проявлятися при зберіганні препарату і позначитися на ефективності його застосування;

- висока собівартість біозасобу за рахунок додаткових: сировини, матеріалів, обладнання та допоміжних операцій в технологічному циклі.

Запропонований спосіб одержання комплексного препарату фунгіцидної дії Трихопсин з ентомоцидними і рістстимулюючими властивостями, згідно з корисною моделлю, інокуляцію поживного середовища посівними культурами (штамами) з різних таксономічних груп (у співвідношенні 1:1) здійснюють одночасно, а далі проводять спільне культивування їх в оптимізованому поживному середовищі протягом 24 год. до накопичення біомаси з життєздатними мікроорганізмами та утворення біологічно активних речовин з різною специфічністю дії.

Опис корисної моделі:

- спрощений процес виробництва комплексного біопрепарату з широким спектром селективної дії за рахунок скорочення тривалості біосинтезу до 24 год.;

- створена технологія одержання поліфункціонального комплексного препарату базується на спільному біосинтезі продуцентів з різним таксономічним статусом у співвідношенні 1:1 і за рахунок синергічної взаємодії одержання високоефективного біозасобу з якісними цільовими субстанціями;

- упущення в технологічному ланцюгу етапу "приготування рідкого інокуляту", що економить час, затрачений на технологічний цикл;

- штами-продуценти пройшли гігієнічне регламентування, тобто, вони і препарати на їх основі безпечні для довкілля, людей, тварин і корисної фауни;

- встановлена відсутність антагонізму між продуцентами, що гарантує якість біозасобу впродовж гарантованих термінів зберігання;

- окрім мікроорганізмів, їх метаболітів та не використаних компонентів поживних середовищ в препараті відсутні додаткові складові, які можуть вплинути на ефективність біозасобу при зберіганні його в межах гарантованих термінів зберігання;

- спосіб одержання препарату не є енерго- і трудозатратним, не потребує додаткового устаткування сировини і допоміжних матеріалів;

- собівартість препарату низька, а ефективність його дії на високому рівні.

Для створення комплексного біопрепарату Трихопсин відібрані штами, що відрізняються один від одного швидкістю росту, типом метаболізму, оптимумом pH і несуттєво відрізняються температурними показниками, необхідними для біосинтезу. Важливо, що між продуцентами відсутні антагоністичні відносини, що встановлено в досліджах, а комбіновані показники в комплексному препараті (титри життєздатних клітин, кількість та якість метаболітів, біологічна активність) перевищують ці ж характеристики кожного окремого препарату на основі відібраних штамів.

Індивідуальні штами мікроорганізмів, що застосовані для створення Трихопсину: мікроміцет *Trichoderma viride* (Tode) Harz, шт. T-4 (далі Т. в. шт. T-4) (раніше за старою класифікацією був *Trichoderma Ugnogum* шт. T-4) - авторський штам, виділений з ґрунту тепличного комбінату м. Луцьк.

Штам задепонований в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.І. Заболотного (ІМВ), його номер в Депозитарії ІМВ-F-100046 (свідоцтво про первісне депонування від 15.05.2006 р.). Тобто, Т. в. шт. T-4 пройшов гігієнічне регламентування, він безпечний для людей, теплокровних і корисної фауни, не фітотоксичний.

Другий штам, який пропонується для консорціуму мікроорганізмів - це відомий промисловий штам *Pseudomonas aureofaciens* Kluuyver, шт. 306 (далі Р. а. шт. 306).

Продуцент задепонований в Українській колекції мікроорганізмів за номером В-2687. Р. а. шт. 306 - непатогенний для людей, теплокровних і корисної фауни. Препарат на основі даного штаму не фітотоксичний.

Для одержання Трихопсину пропонується технологія глибинного культивування продуцентів на оптимізованому поживному середовищі.

Спосіб одержання комплексного біопрепарату Трихопсин:

I етап технологічного процесу.

Одержання посівної культури.

Посівну культуру готують із колекційних штамів-продуцентів. Штами висівають кожний окремо на агарові пластини в чашки Петрі на селективні поживні середовища (ПС).

Культури термостатують в чашках Петрі до появи характерних особливостей кожного штаму.

II етап. Приготування ферментаційного середовища.

Далі готують ферментаційне поживне середовище, розливають його у ферментаційні скляні ємності об'ємом 3 дм³ по 1,0-1,2 дм³ в кожену. Ємності з ферментаційним середовищем стерилізують.

III етап. Інокуляція ферментативного середовища. Оптимізоване ферментаційне середовище засівають в стерильних умовах посівними культурами із чашок Петрі, які готували на I етапі. Газон з посівною культурою, що утворився на ч. Петрі, ділять на 8 рівних секторів. По одному сектору із Т. в. шт., T-4 і Р. а. шт. 306 вносять в стерильне ферментаційне середовище. Тобто, посівна доза кожного штаму-продуценту - це 1/8 посівної культури з ч. Петрі. Співвідношення інокуляту або посівної культури з різних штамів - 1:1.

IV етап. Біосинтез Трихопсину (спосіб виробництва).

Біосинтез здійснюють глибинним способом на термостатованій качалці мікробіологічній підвісній (КМП 36/90) за температури від 26 до 28 °С і швидкості обертання платформи 180-200 об/хв. Біосинтез проводять 24 год. При дотриманні вищезазначених умов культивування сумарний титр мікроорганізмів досягає $(1,5-2,0) \cdot 10^{10}$ КУО/см³.

Окрім живих мікроорганізмів в комплексному препараті утворюються біологічно активні речовини, які активно пригнічують широкий комплекс фітопатогенів: *Fusarium moniliforme* Sheldon (F. m.), *Fusarium graminearum* Schwabe (F. g.), *Alternaria alternata* (Fries) Keissler (A. a.), *Botrytis cinerea* Persoon (B. c.), *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary (S. s.).

При визначенні біологічної активності Трихопсину на зерні, що інокулювали комплексним препаратом, підтверджено припущення про його рістстимулюючу дію і високу біологічну активність, за рахунок якої стримується розвиток шкочочинних об'єктів, які інфікують зерно (табл. 1).

Таблиця 1

Ефективність Трихопсину відносно домінуючого комплексу фітопатогенів

| Назва препаративної форми | Антагоністична активність, бали | | | | | Сумарна кількість балів |
|---------------------------------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|
| | A. a. | F. g. | F. m. | B. c. | S. s. | |
| Трихопсин (спільний біосинтез штамів) | 3,5 | 3,0 | 2,5 | 3,5 | 3,5 | 16,0 |
| Суміші Р. а. шт. 306 + Т. v. шт. Т-4 | 0,5 | 2,0 | 3,5 | 2,0 | 3,0 | 11,0 |

Облік проводять через сім днів за чотирьохбальною системою.

- 5 При польових випробуваннях підтверджена також фунгіцидна і рістстимулююча дія Трихопсину. Проведена апробація Трихопсину на вегетуючих рослинах (цукровому буряку, пшениці, рапсі).

При застосуванні Трихопсину для захисту плодівих культур чисельність плодожерок знижувалась майже вдвічі.

- 10 Розроблений спосіб спільного культивування має перевагу перед простим змішуванням препаратів на основі монокультур, біосинтез яких здійснюється окремо. При спільному культивуванні відразу можливо встановити конкурентоспроможність штамів, які формують комплексний препарат. Такі взаємовідносини виявляються наявністю або відсутністю антагонізму між продуцентами за цільовими показниками, які характеризують біозасіб (титрами життєздатних клітин, біологічною активністю тощо). В комплексних препаратах, які одержані
- 15 простим змішуванням різних монокультур, антагонізм і занижені параметри цільових показників виявляються через деякий час після застосування, що зазвичай відображається на ефективності захисних заходів.

- 20 Тому підбір штамів при створенні асоціації мікроорганізмів в комплексних препаратах, а також оптимізація поживного середовища для них, дозволить уникнути конкурентоспроможності і зменшить коефіцієнт сукцесії домінуючою штаму в асоціації культур, які спільно культивують.

Окрім того, при спільному біосинтезі гарантується ефективність кожного із продуцентів в комплексному препараті з широким спектром дії, в той час, як біосполуки, які готують простим змішуванням мікробних препаратів різного призначення, занижують цінність і ефективність заходів при біологізації землеробства.

- 25 Дослідженнями показано, що титри життєздатних клітин превалюють саме в комплексному препараті, що одержаний при спільному біосинтезі продуцентів з моменту закінчення технологічного процесу і впродовж гарантованих термінів зберігання (табл. 2).

Таблиця 2

Титри життєздатних клітин в біопрепаратах на основі монокультур і в комплексних біозасобах

| Назва штаму і спосіб отримання препарату | Титри життєздатних клітин, КУО/см ³ | | | |
|---|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| | по закінченні технологічного процесу | через місяць | через 2 місяці | через 3 місяці |
| Р. а. шт. 306 | $0,83 \cdot 10^{10}$ | $0,45 \cdot 10^{10}$ | $0,25 \cdot 10^{10}$ | $0,12 \cdot 10^{10}$ |
| Т. v. шт. Т-4 | $2,2 \cdot 10^9$ | $1,82 \cdot 10^9$ | $1,5 \cdot 10^9$ | $0,96 \cdot 10^9$ |
| Р. а. шт. 306 + Т. v. шт. Т-4 (спільний біосинтез) | $1,6 \cdot 10^{10}$ | $1,28 \cdot 10^{10}$ | $1,18 \cdot 10^{10}$ | $0,09 \cdot 10^{10}$ |
| Р. а. шт. 306 + Т. v. шт. Т-4 (просте змішування монокультур) | $6,8 \cdot 10^9$ | $4,0 \cdot 10^9$ | $2,7 \cdot 10^9$ | $2,2 \cdot 10^9$ |

- 30 В таблиці наведена чисельність колонієутворюючих одиниць в 1 см¹ водної суспензії препарату (КУО/см³). Прерогативою комплексного препарату Трихопсин, одержаного за вдосконаленою технологією, є стабільні показники титрів життєздатних клітин, що складають основу нового комплексного препарату, які через три місяці знизились лише на 32 % порівняно з вихідними титрами препарату (одразу після культивування).

- 35 В той час, як в межах гарантованих строків в препаратах на основі (Т. v. шт. Т-4) титри зменшились в 2,3 разу, а в Гаупсині - майже в 7 разів. Просте змішування монокультур теж не

забезпечило зберігання титрів життєздатних мікроорганізмів. Їх значення через три місяці зберігання знизились в 3,09 рази.

- 5 Тобто, спільне культивування продуцентів забезпечує стабільність показників якості впродовж термінів зберігання Трохопсину. В культуральній рідині цільові інгредієнти біологічно активних речовин (БАР) і життєздатні клітини з моменту припинення технологічного процесу зберігають стабільність впродовж гарантованих термінів, тобто три місяці.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб виробництва комплексного препарату Трихопсин, що включає застосування мікроорганізмів із різних таксономічних груп та різною специфічністю дії, який **відрізняється** тим, що інокуляцію рідкого ферментативного середовища здійснюють одночасно посівними культурами з твердих агаризованих середовищ у співвідношенні 1:1, далі проводять культивування продуцентів з різним типом метаболізму, що пройшли гігієнічне
- 15 регламентування, протягом 24 год., до накопичення біомаси з життєздатними мікроорганізмами, які за рахунок синергічних взаємовідносин утворюють цільові субстанції в комплексному препараті з широким спектром фунгіцидної, ентомоцидної і рістстимулюючої дії.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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