



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82922** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**A01N 63/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 00182</b>	(72) Винахідник(и): <b>Сергєєва Жанна Юріївна (UA), Крилова Катерина Дмитрівна (UA), Ліманська Наталія Вікторівна (UA), Васильєва Наталя Юріївна (UA), Іваниця Володимир Олексійович (UA), Товкач Федір Іванович (UA), Басюл Олена Владленівна (UA), Коротаєва Надія Володимирівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>03.01.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.08.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.08.2013, Бюл.№ 16</b>	(73) Власник(и): <b>ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ЗАХИСТУ КОРЕНЕПЛОДІВ ТА БУЛЬБ ВІД М'ЯКОЇ ГНИЛІ З ВИКОРИСТАННЯМ ЛАКТОБАКЦИЛ ТА АВТОЛІЗАТУ ЕРВІНІЙ

### (57) Реферат:

Спосіб захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі полягає в тому, що для обробки коренеплодів та бульб використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл. До складу суспензії бактерій додатково входить автолізат бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що специфічно знищують фітопатогенні бактерії.

UA 82922 U



Корисна модель належить до способів боротьби з фітопатогенами і являє собою засіб біологічного захисту рослин від захворювань. Даний спосіб може застосовуватися в сільському господарстві для захисту рослин від фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora* - одного із найбільш шкочочинних фітопатогенів.

5 Фітопатогенні ервінії спричиняють м'яку гниль різних рослин, в тому числі картоплі та моркви. Втрати врожаю від м'якої гнилі коливаються у межах 10-30 % (з урахуванням латентної форми 25-80 %). Шкочочинність бактеріозу є найбільшою при довгостроковому зберіганні врожаю у сховищах. Збудник може розвиватися у широкому діапазоні температур. Джерелом інфекції є хворі бульби. Зовні здорові бульби з-під інфікованих кущів можуть мати у собі  
10 приховану інфекцію, розвиток якої починається за сприйнятливих умов. Здорові бульби можуть інфікуватися при механічній взаємодії з хворими бульбами (під час вегетації і під час збору врожаю). Тому особливо необхідним є застосування заходів під час закладки на зберігання коренеплодів моркви та бульб картоплі, що зменшують ризик прояву інфекції викликані ервініями, які знаходяться на коренеплодах і бульбах та можуть проникати через пошкоджену  
15 поверхню.

Бактерії роду *Lactobacillus* - це мікроорганізми з найвищим рівнем безпеки для людини та навколишнього середовища. Багато видів лактобацил (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus viridescens* та інші) населяють філосферу та ризосферу рослин і можуть захищати рослини шляхом синтезу антагоністичних речовин - органічних кислот, перекису водню, бактеріоцинів. При внутрішньовидовому конкуруванні у штамів фітопатогенних ервіній відбувається виділення бактеріофагів і бактеріоцинів, що допомагає штамам, які здатні  
20 продукувати ці частки, заселяти нову екологічну нішу.

Досягнутий рівень в сфері біологічних препаратів за участю бактерій роду *Lactobacillus* і бактеріофагів *Erwinia carotovora* представлено в наступних джерелах.

25 Описано спосіб використання молочнокислих бактерій, в тому числі - *Lactobacillus plantarum*, проти збудників гнилі овочів та фруктів при їх зберіганні (Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. - 2008. - Vol. 11. - P. 231 - 236.). Показано, що застосування суспензії клітин *Lactobacillus plantarum*, виділених з овочів та фруктів, спричиняло  
30 пригнічення росту грибів *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* та бактеріального фітопатогена *Xanthomonas vesicatoria*. Рівень інфекції за нанесення штамів молочнокислих бактерій на плоди при їх зберіганні зменшувався на 20-50 %. Недоліками даного способу є те, що він не впливає на інші фітопатогенні бактерії, в тому числі - збудників м'якої гнилі.

Описано застосування лактобацил у комплексному комерційному препараті "Біофіт-1" (<http://www.mtpkpanda.com/ru/preparaty/1.html>). Препарат "Біофіт-1" містить консорціум  
35 молочнокислих, азотфіксуєуючих, фотосинтезуючих, амоніфікуючих мікроорганізмів, сахароміцетів, антагоністів патогенних грибів і бактерій родів *Lactobacillus*, *Trichoderma*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Rhodospseudomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Saccharomyces* і *Agrobacter*. Препаратом рекомендують обробляти насіння, садівний матеріал,  
40 сіянці та дорослі рослини.

До недоліків цього способу слід віднести невивченість дії складових препарату щодо збудників м'якої гнилі рослин. Крім того, відомий спосіб застосування бактерій роду *Lactobacillus* у складі препарату "Біофіт-1", який передбачає обробку рослин консорціумом бактерій. Створення такого комплексного препарату ускладнюється відмінностями в ростових  
45 характеристиках та потребами у поживних речовинах бактерій різних видів і родів.

Спосіб, описаний в E.M. Adriaenssens, J. Van Vaerenbergh, D. Vandenheuvel et al. T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani* // PLoS ONE, vol. 7, no. 3, Article ID e33227, 2012. полягає в тому, щоб використовувати вірулентних фагів LIMEstone, які було виділено з природних ізолятів *Dickeya solani*, для  
50 контролю м'якої гнилі, що була викликана цими бактеріями. Для цього проводять обробку бульб картоплі перед посадкою у ґрунт розчином, який містить очищені і сконцентровані бактеріофаги LIMEstone. До недоліків цього способу належить вузька специфічність дії бактеріофагів виключно на бактерій *Dickeya solani*, окрім того не має захисної дії відносно інших збудників м'якої гнилі та не досліджено захисний вплив відносно інших овочевих культур, які  
55 можуть бути уражені м'якою гниллю. Одержання препарату описаним способом ускладнюється необхідністю очистки бактеріофагів.

Найбільш близьким до запропонованого способу є «Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням лактобацил». Патент України на корисну модель № 75360. Опубл. 26.11.2012. Бюлетень 22 (найближчий аналог). Спосіб полягає в тому, що для обробки  
60 рослин використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які культивують впродовж

48 годин у середовищі MRS. Бактерії *Lactobacillus plantarum* для обробки рослин виділяють з рослинних поверхонь, з молочнокислих продуктів і неферментованих грибів, і суспензії культур, що вирости, залишають у рідкому середовищі MRS, в якому бактерії було вирощено. Суспензією лактобацил обробляють рослини для захисту від бактеріального раку дводольних, спричиненого *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium vitis*.

В найближчому аналозі не вивчено наявності прояву антагоністичного ефекту *Lactobacillus plantarum* на збудників м'якої гнилі рослин бактерій *Erwinia carotovora*. Крім того, для обробки рослин у найближчому аналозі використовують лише штами лактобацил, як монопрепарат, який у випадку захворювань рослин, зі швидшим розвитком симптомів ураження (в тому числі м'якою гниллю), виявляється неефективним.

В основу корисної моделі поставлена задача створити високо ефективний спосіб захисту коренеплодів та бульб рослин від збудників м'якої гнилі з використанням живих клітин лактобацил *Lactobacillus plantarum* та автолізу клітин *Erwinia carotovora*, що містить бактеріофаги та бактеріоцини, який не потребує очистки.

Поставлена задача вирішується способом захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі, який полягає в тому, що для обробки коренеплодів та бульб використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл, і відрізняється тим, що до складу суспензії бактерій додатково входить автолізат бактерій *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що специфічно знищують фітопатогенні бактерії. В свою чергу лактобактерії виділяють антагоністичні метаболіти та знижують рН середовища, чим конкурентно інгібують ріст фітопатогенних ервіній. Ця дія пролонгована, і дозволяє лактобактеріям зайняти екологічну нішу у ризосфері рослин. Максимальна ефективність дії бактеріофагів і бактеріоцинів у автолізаті ервіній встановлена для адгезованих на поверхні рослинних тканин клітин фітопатогенних ервіній і відбувається безпосередньо в момент контакту з патогенами. Отже, висока ефективність суміші забезпечується взаємодією окремих компонентів з фітопатогенами.

Спільними ознаками найближчого аналогу і запропонованого способу є те, що для обробки рослин використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які культивують впродовж 48 годин у середовищі MRS.

Запропонований спосіб відрізняється від найближчого аналогу тим, що бактерії *Lactobacillus plantarum* для обробки рослин використовуються не у моно препараті, а у суміші з автолізатом клітин *Erwinia carotovora*, який містить бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини. Двокомпонентною сумішшю обробляють рослини, коренеплоди та бульби для захисту від м'якої гнилі, спричиненої *Erwinia carotovora*.

Запропонований спосіб застосовується наступним чином: бактерії *Lactobacillus plantarum* вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл, автолізат клітин *Erwinia carotovora* (у концентрації  $10^{10}$  КУО/мл) одержують шляхом спонтанної індукції на рідкому оптимізованому мінімальному середовищі, стерилізацію від живих клітин ервіній, що вижили після автолізу, проводять при температурі 60 °C протягом 10-15 хв. Компоненти змішують у рівних співвідношеннях. Сумішшю обробляють коренеплоди та бульби перед закладанням на зберігання з метою попередити інфікування внутрішніх частин збудниками м'якої гнилі через ушкодження поверхневих частин. Коренеплоди та бульби ретельно обприскують сумішшю до повного рівномірного зволоження усіх поверхонь. Не рекомендується занурювати коренеплоди або бульби у ємності з сумішшю для запобігання надмірного зволоження, яке може мати негативний вплив на їх стійкість до інфікування. Витрати суміші на 100 коренеплодів або бульб середнього розміру - 1,5-2 л за умови обприскування. Час обробки - 1 година. За цей час молочнокислі бактерії встигають прикріпитися до поверхонь коренеплодів та бульб, в тому числі і наявних раневих поверхонь, що є входними воротами для збудників м'якої гнилі, а бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини - адгезуватися на рослинних поверхнях та знищити наявних збудників м'якої гнилі. Надалі коренеплоди та бульби рекомендується просушити від зайвої вологи та зберігати у добре вентильованих приміщеннях.

Ефективність запропонованого способу підтверджується прикладами.

#### Приклад № 1

У складі суміші використовували клітини штаму *Lactobacillus plantarum* ОНУ 87 і автолізат штаму *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1.

Бульби картоплі *Solanum tuberosum* стерилізували фломбуванням та УФ-опроміненням. На поверхні бульби стерильним скальпелем робили лунки глибиною та діаметром 5 мм. Кожний дослідний варіант виконувався у 5 повторях. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95 %. Для моделювання зараження та процесу інфекції

м'якої гнилі (позитивний контроль) в лунки на бульбі вносили 0,5 мл суспензії культур патогенних штамів ервіній у концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл. У дослідні варіанти через одну годину після або за одну годину до інфікування вносили разом суміш молочнокислих бактерій та автолізу ервіній по 0,5 мл. Позитивним контролем слугували варіанти інфікування бульб та коренеплодів суспензією культур патогенних штамів ервіній, негативним контролем були бульби оброблені суспензією молочнокислих бактерій, автолизатом ервіній, суспензією молочнокислих бактерій та автолизатом, стерильною дистильованою водою, мінімальним оптимізованим середовищем, поживними середовищами LB (для ервіній) та MRS (для лактобактерій). Бульби герметично запаковували у стерильні поліетиленові пакети та залишали на 48 год при температурі 25 °С.

Дослідження показали, що у варіантах негативного контролю суспензія молочнокислих бактерій, автолизат ервіній, дистильована вода, оптимізоване мінімальне середовище, поживні середовища LB та MRS не виявили негативного впливу на бульби картоплі. В варіантах позитивного контролю патогенність ервіній склала в середньому 62,5 %. У варіантах внесення лактобактерій і автолізу ервіній через одну годину після або за одну годину до інфікування проявів інфекційного процесу не встановлено. Відповідно ефективність захисної дії дорівнювала 100 %. Отже, одночасна дія лактобактерій і автолізу повністю гальмувала процес пошкодження бульб патогенними ервініями і розвиток м'якої гнилі.

Таким чином, розвиток м'якої гнилі на бульбах картоплі за умов обробки комплексною сумішшю повністю інгібується.

#### Приклад № 2

У складі суміші використовувались клітини штаму *Lactobacillus plantarum* ОНУ 87 і автолизат штаму *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1.

Коренеплоди моркви *Daucus carota* стерилізували фломбуванням та УФ-опроміненням. Моркву асептично розрізали на диски товщиною 10-12 мм, посередині робили лунку глибиною і діаметром 5 мм та поміщали у стерильні чашки Петрі. Кожний дослідний варіант виконувався у 5 повторах. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95 %. Для моделювання зараження та процесу інфекції м'якої гнилі (позитивний контроль) в лунки на бульбі і коренеплодах вносили 0,5 мл суспензії культур патогенних штамів ервіній у концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл. У дослідні варіанти через одну годину після або за одну годину до інфікування вносили разом суміш молочнокислих бактерій та автолізу ервіній по 0,5 мл. Позитивним контролем слугували варіанти інфікування бульб та коренеплодів суспензією культур патогенних штамів ервіній, негативним контролем були коренеплоди оброблені суспензією молочнокислих бактерій, автолизатом ервіній, суспензією молочнокислих бактерій та автолизатом, стерильною дистильованою водою, мінімальним оптимізованим середовищем, поживними середовищами LB (для ервіній) та MRS (для лактобактерій). Чашки Петрі з морквою перекривали парафільмом та залишали на 48 год при температурі 25 °С.

Дослідження показали, що у варіантах негативного контролю суспензія молочнокислих бактерій, автолизат ервіній, дистильована вода, оптимізоване мінімальне середовище, поживні середовища LB та MRS не виявили негативного впливу на коренеплоди моркви. Дослідження інфекційного процесу, викликаного патогенними штамми *E. carotovora* на коренеплодах моркви, показало, що вже на 48 год після внесення збудника на усіх без виключення дисках моркви спостерігали появу зон м'якої чорної гнилі. Таким чином, патогенність дослідних штамів ервіній на дисках коренеплодів моркви склала 100 %. При одночасній обробці молочнокислими бактеріями та автолизатом клітин ервіній через годину після зараження коренеплодів фітопатогенами ознак прояву патогенного враження не виявлено. Одночасне попереднє внесення автолізу ервіній та лактобактерій повністю гальмує інфекційний процес м'якої гнилі на коренеплодах моркви.

Таким чином, розвиток м'якої гнилі на дисках моркви за умов обробки комплексною сумішшю повністю інгібується.

У способі, що пропонується, застосування лактобацил, спрямоване саме на збудників м'якої гнилі - фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora*, розвиток хвороби пригнічується представниками лише одного виду бактерій - *Lactobacillus plantarum*, до складу препарату входить автолизат фітопатогенних ервіній, що містить бактеріофаги і бактеріоцини, який забезпечує високу ефективність захисної дії.

З наведених прикладів видно, що запропонований спосіб є більш ефективним, ніж найближчий аналог, дозволяє застосовувати для обробки рослин живі клітини та автолизат клітин та має виражений ефект пригнічення розвитку м'якої гнилі коренеплодів та бульб рослин.

Розробка нового ефективного способу для захисту рослин від м'якої гнилі за допомогою лактобацил та автолізу ервіній здійснена співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та

біотехнології та Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за держзамовленням Міністерства освіти і науки, молоді і спорту України (№ НУ/З-2011) і за держбюджетною темою № 477.

5

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі, який полягає в тому, що для обробки коренеплодів та бульб використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації  $3 \times 10^8$  КУО/мл, який  
10 **відрізняється** тим, що до складу суспензії бактерій додатково входить автолізат бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що специфічно знищують фітопатогенні бактерії.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

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

---

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