



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95964** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A01N 63/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2014 08716	(72) Винахідник(и):	Коротасва Надія Володимирівна (UA), Ліманська Наталія Вікторівна (UA), Маринова Ірина Іванівна (UA), Іваниця Володимир Олексійович (UA)
(22) Дата подання заявки:	01.08.2014	(73) Власник(и):	ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	12.01.2015		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.01.2015, Бюл.№ 1		

(54) СПОСІБ МОДИФІКАЦІЇ СЕРЕДОВИЩА YMA ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ ВИНОГРАДУ

(57) Реферат:

Спосіб модифікації середовища YMA для виділення ендофітної мікробіоти винограду. Середовище готують з дріжджового екстракту, маніту, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, $MgSO_4 \times 12H_2O$, NaCl, агар-агару та застосовують для виділення представників мікробіоти рослин. Концентрація дріжджового екстракту складає 0,6 г/л, а маніту - 6,0 г/л. Використовують середовище для виділення як патогенної, так і сапрофітної мікробіоти рослин.

UA 95964 U

Корисна модель належить до способів виділення мікроорганізмів з рослин і представляє собою спосіб модифікації середовища для зменшення собівартості мікробіологічних досліджень та розширення спектру виділюваних бактерій.

Дане середовище може використовуватися у мікробіології для виділення більшої кількості представників мікробіоти рослин, а також у біотехнології для пошуку штамів мікроорганізмів з корисними властивостями.

Відома невелика кількість живильних середовищ для виділення мікроорганізмів з рослин. Досягнутий рівень в області середовищ для виділення представників ендоефітної мікробіоти описано в наступних джерелах.

Відоме середовище YPGA ("yeast peptone glucose agar" - глюкозо-пептонний дріжджовий агар), описане в Lelliot R.A., Stead D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In Methods in plant pathology. - Vol. 2. - 1987. - P. 216. Склад середовища: дріжджовий екстракт - 5 г, глюкоза - 10 г, пептон - 5 г, агар-агар - 15 г. Недоліком середовища є те, що до його складу входять компоненти з високою собівартістю - пептон і глюкоза, і підвищена концентрація дріжджового екстракту, а саме середовище рекомендується лише для виділення фітопатогенів.

Відоме середовище YEM ("yeast-mannitol medium" - дріжджово-маннітолове середовище), описане в Wang Kan (Ed.). Agrobacterium protocols. - Vol. 1. - 2006, Humana Press: Totowa, New Jersey. - P. 3-15. Склад середовища: маніт - 10 г, дріжджовий екстракт - 0,4 г, K_2HPO_4 - 0,5 г, $MgSO_4$ - 0,2 г, агар-агар - 15 г. Недоліком середовища є те, що до його складу входить маніт у високій концентрації (10 г/л), що робить високою собівартість середовища, і лише дві солі, що обмежує ріст деяких мікроорганізмів, а використовують його лише для виділення агробактерій.

Найбільш близьким до запропонованого є середовище YMA (прототип), описане в Bishop A.L., Katz B.H., Burr T.J. Infection of grapevines by soilborne Agrobacterium tumefaciens biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizosphere // Phytopathology. - 1988. - Vol. 78, № 9. - P. 945-948. Склад середовища: дріжджовий екстракт - 1 г, маніт - 10 г, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,65 г, $MgSO_4 \cdot 12H_2O$ - 0,2 г, NaCl - 0,12 г, агар-агар - 15 г. Недоліком середовища є те, що до його складу також входить манітол у високій концентрації (10 г/л), що робить високою собівартість середовища, висока концентрація дріжджового екстракту (1 г/л), і те, що його використовують лише для виділення патогенних агробактерій.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити ефективне живильне середовище зі зниженою собівартістю, яке б дозволяло виділяти широкий спектр представників мікробіоти рослин (патогенних і сапрофітних).

Ця задача вирішується середовищем, яке складається з дріжджового екстракту, маніту, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 12H_2O$, NaCl, агар-агару і призначається для виділення представників мікробіоти рослин, і відрізняється тим, що концентрація дріжджового екстракту складає 0,6 г/л, а маніту - 6,0 г/л (зменшення на 40 %), а використовують середовище для виділення як патогенної, так і сапрофітної мікробіоти рослин. На середовище висівають екстракти з судин пагонів винограду, вирощують добу при 28 °C і отримують рясний ріст представників ендоефітної мікробіоти винограду.

Загальними ознаками прототипу і запропонованого середовища є те, що до складу середовища входять дріжджовий екстракт, маніт, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgSO_4 \cdot 12H_2O$, NaCl, агар-агар, і середовище використовують для виділення представників мікробіоти рослин.

Відмінними ознаками від прототипу є те, що концентрація дріжджового екстракту та маніту у складі середовища зменшена на 40 %, а модифіковане середовище використовують для виділення більш широкого спектру представників мікробіоти рослин (не тільки патогенних, а і сапрофітних).

Запропоноване середовище застосовують наступним чином. Середовище готують, змішуючи такі кількості компонентів (в 1 л дистильованої води): дріжджовий екстракт - 0,6 г, маніт - 6,0 г, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,65 г, $MgSO_4 \cdot 12H_2O$ - 0,2 г, NaCl - 0,12 г, агар-агар - 15 г. Для досліджень відбирають здерев'янілу лозу завдовжки 10 см, миють її під проточною водою з детергентом, ретельно ополіскують, фламбують, а потім подрібнюють на диски завтовшки 0,5 см. Диски поміщають в стерильні бюкси і заливають стерильною дистильованою водою так, щоб подрібнений матеріал був повністю покритий водою. Бюкси поміщають в холодильник при 4 °C, а через добу отриману суспензію висівають в кількості 100 мкл на запропоноване середовище. Посіви інкубують одну добу при 28 °C. Надалі обраховують кількість колоній, що вирости, і відбирають колонії, потрібні для наступних досліджень.

Дослідження модифікованого середовища для виділення ендоефітної мікробіоти винограду проведено на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Проводили оптимізацію поживного середовища YMA, для чого зменшували концентрації компонентів, собівартість яких була найбільшою - дріжджового екстракту і маніту (табл. 1).

Таблиця 1

Варіант	Концентрація компонентів (г/л)		Концентрація клітин через добу культивування (кл/мл)	
	Органічні компоненти	Солі	штаму <i>Agrobacterium vitis</i> U6	штаму <i>Alcaligenes faecalis</i> ОНУ 452
I	Дріжджовий екстракт - 0,8; маніт - 8,0	$K_2HPO_4 \times 3H_2O$ 0,65; $MgSO_4 \times 12H_2O$ 0,2; NaCl - 0,12	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^8$	$(7,4 \pm 0,3) \times 10^7$
II	Дріжджовий екстракт - 0,6; маніт - 6,0		$(2,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(7,6 \pm 0,5) \times 10^7$
III	Дріжджовий екстракт - 0,4; маніт - 4,0		$(1,1 \pm 0,2) \times 10^6$	$(7,2 \pm 0,3) \times 10^7$
IV (контроль)	Дріжджовий екстракт - 1,0; Маніт - 10,0		$(2,1 \pm 0,6) \times 10^8$	$(7,5 \pm 0,2) \times 10^7$
V	Дріжджовий екстракт - 0,6; Маніт - 10,0		$(1,7 \pm 0,2) \times 10^7$	$(7,6 \pm 0,6) \times 10^7$
VI	Дріжджовий екстракт - 1,0; маніт - 6,0		$(2,1 \pm 0,4) \times 10^8$	$(7,8 \pm 0,3) \times 10^7$

5 У рідкому середовищі різних варіантів вивчали ріст двох представників ендоефітної мікробіоти винограду - сапрофітного виду *Alcaligenes faecalis* штам ОНУ 452 та фітопатогенного виду *Agrobacterium vitis* штам U6.

10 1 % добової культури цього штаму засівали у рідкі середовища вищенаведених складів, поміщали у термостат при 28 °С і кожні дві години відбирали культуру, що росте, для визначення концентрації клітин на спектрофотометрі. На основі отриманих даних будували криві росту штамів *R. vitis* U6 та *A. faecalis* ОНУ 452 у середовищах різного складу, порівнюючи з кривою росту на стандартному середовищі YMA.

У I, II та VI варіантах ріст бактерій штаму *R. vitis* U6 не відрізнявся від такого у контролі (табл. 1).

15 Для штаму *A. faecalis* ОНУ 452 можна було використовувати усі тестовані нами концентрації (табл. 1).

20 Оскільки в II варіанті концентрація органічних компонентів була найменшою (дріжджовий екстракт - 0,6; маніт - 6,0 г/л, зменшення на 40 %), то даний оптимізований склад може бути рекомендовано для використання замість звичайного складу середовища YMA, що дозволить зменшити його собівартість.

Отже, для виділення ендоефітної мікробіоти винограду можна використовувати середовище YMA модифікованого складу (г/л): дріжджовий екстракт - 0,6; маніт - 6,0; $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ 0,65; $MgSO_4 \times 12H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,12; агар-агар - 15 г.

Ефективність запропонованого середовища підтверджується наступними прикладами.

25 Приклад 1

Здійснювали посіви з 8 зразків лози винограду сорту Піно чорний на середовище модифікованого складу. Для цього здерев'янілу лозу завдовжки 10 см мили під проточною водою з детергентом, ретельно ополіскували, фламбували, а потім подрібнювали на диски завтовшки 0,5 см. Диски поміщали в стерильні бюкси і заливали стерильною дистильованою водою так, щоб подрібнений матеріал був повністю покритий водою. Бюкси поміщали в холодильник при 4 °С, а через добу отриману суспензію висівали в кількості 100 мкл на середовища для культивування мікроорганізмів, виділених з рослинних тканин. Посіви інкубували добу при 28 °С.

35 Порівнювали чисельність мікробіоти, встановлену таким чином, з чисельністю, підрахованою при рості бактерій на контрольному середовищі YMA звичайного складу (табл. 2).

Таблиця 2

№ зразка	YMA контроль	YMA модифікованого складу
1	$(2,0 \pm 0,7) \times 10^6$	$(5,4 \pm 1,8) \times 10^6$
2	$(4,5 \pm 0,4) \times 10^5$	$(3,5 \pm 0,6) \times 10^6$
3	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,1 \pm 0,5) \times 10^5$
4	$(7,5 \pm 1,3) \times 10^6$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^7$
5	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^5$	$(4,0 \pm 0,7) \times 10^6$
6	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^6$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^7$
7	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^5$	$(3,0 \pm 0,8) \times 10^5$
8	$(2,6 \pm 0,5) \times 10^6$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^6$

Видно, що чисельність мікробіоти або не відрізнялась від такої на контрольному середовищі YMA звичайного складу (зразки №№ 1, 3, 7, 8), або була більшою на порядок (зразки №№ 2, 4, 5, 6). Отже, модифіковане середовище можна успішно застосовувати для виділення ендоефітної мікробіоти винограду.

Приклад 2

Здійснювали висів мікробіоти винограду з лози 10 рослин, інфікованих бактеріальним раком, так само, як це було описано у прикладі 1. Для виявлення фітопатогенних *Agrobacterium vitis* і *Agrobacterium tumefaciens* серед усіх інших виділених штамів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Тестували ДНК із суміші усіх колоній, для чого використовували тест-набір для виділення ДНК ("АмпліСенс", Росія). Реакційну суміш для проведення ПЛР з метою виявлення збудника бактеріального раку готували згідно з методикою, запропонованою J. Haas et al. (1995): 5,8 мкл дейонізованої води; 4 мкл 5x ПЛР буфера ("АмпліСенс", Росія); 2,0 мкл 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (200 мМ); 1,0 мкл кожного із 10 мМ праймерів (0,5 мМ); 0,4 мкл Taq-полімерази; 0,8 мкл 50 мМ Mg⁺⁺; 5 мкл проби ДНК.

Використовували праймери до ділянки гена ізопентенилтрансферази *ipt*, ділянки гена ендонуклеази *VirD₂* та ділянки гена *virC* ДНК збудників бактеріального раку. ДНК бактерій ампліфікували з даними праймерами шляхом чергування 1 хвилини денатурації при 94 °C, 1 хвилини відпалу при 52 °C, 1 хвилини елонгації при 72 °C, і кількість таких циклів дорівнювало 40.

За позитивний контроль мали патогенний штам *A. tumefaciens* C58, за негативний контроль - деіонізовану воду. Облік результатів класичної ПЛР проводили за допомогою електрофорезу.

Виявилося, що в усіх досліджених зразках за допомогою модифікованого нами середовища було виділено збудники бактеріального раку, належність яких до виду *Agrobacterium vitis* була підтверджена наявністю в геномах виділених штамів генних послідовностей *virC*, *ipt* та *virD₂* до генів патогенності, які кодують синтез цитокінінів, регуляторні функції та ендонуклеази - фактори патогенності, притаманні збудникам бактеріального раку.

Отже, за допомогою модифікованого середовища можна успішно виділяти фітопатогенні бактерії.

Приклад 3.

Виділяли мікробіоту судин винограду на живильне середовище модифікованого складу так само, як це було описано у прикладі 1.

З колоній, що вирости на різних живильних середовищах після посівів ендоефітної мікробіоти винограду, здійснювали пересіви шляхом переколу бактеріальною петлею безпосередньо на бактеріальний газон *A. tumefaciens* C58. Газон попередньо засівали добовою культурою фітопатогена, використовуючи 0,8 % середовище LB. Надалі газони культивували при 28 °C протягом 1-2 діб, а потім виявляли наявність зон затримки росту культури фітопатогена.

Виявилося, що один з виділених штамів утворював велику зону затримки росту на газоні фітопатогена *R. radiobacter* C58. Розмір зони затримки росту становив 8-10 мм.

З колонії, що створювала зону затримки росту патогену, здійснювали пересів біомаси для подальшої ідентифікації. За біохімічними властивостями виділений штам-антагоніст було віднесено до виду *Alcaligenes faecalis*.

Отже, запропоноване середовище можна застосовувати для виділення штамів-антагоністів.

Таким чином, встановлено, що запропоноване середовище передбачає використання меншої кількості компонентів, що здешевлює його використання, і дозволяє виділяти як фітопатогенні бактерії, так і сапрофітні бактерії-антагоністи.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб модифікації середовища YMA для виділення ендофітної мікробіоти винограду, який полягає в тому, що середовище готують з дріжджового екстракту, маніту, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, $MgSO_4 \times 12H_2O$, NaCl, агар-агару та застосовують для виділення представників мікробіоти рослин, який **відрізняється** тим, що концентрація дріжджового екстракту складає 0,6 г/л, а маніту - 6,0 г/л, а використовують середовище для виділення як патогенної, так і сапрофітної мікробіоти рослин.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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