



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107122** (13) **C2**

(51) МПК (2014.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A01P 15/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 01465**

(22) Дата подання заявки: **07.02.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.11.2014**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **11.08.2014, Бюл.№ 15**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2014, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Іутинська Галина Олександрівна (UA),
Білявська Людмила Олексіївна (UA),
Козирицька Валентина Євгенівна (UA)**

(73) Власник(и):

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

(74) Представник:

Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

William D. Antibiotic Production by Marine
Microorganisms / William D. Rosenfeld,
Claude E. ZoBell // J Bacteriol. – 1947. -
№54(3) – P.393–398

Lessel E. Nomenclature of taxa of the order
Actinomycetales (Schizomycetes) / Erwin
Francis Lessel // Iowa State University. –
1961. – P. 56, 178

Pridham T. G. A Guide for the Classification of
Streptomycetes According to Selected Groups.
Placement of Strains in Morphological
Sections / T. G. Pridham, C. W.

Hesseltine, R. G. Benedict // Appl Microbiol. -
1958. - №6(1). – P.52–79

(54) ШТАМ STREPTOMYCES MARINOLIMOSUS - АНТАГОНІСТ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025, який має антагоністичну активність стосовно мікроорганізмів-збудників захворювань рослин.

UA 107122 C2

Винахід належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штаму актиноміцетів, що характеризується високою антагоністичною активністю стосовно фітопатогенної мікрофлори, зокрема здатністю до інгібування росту фітопатогенних мікроорганізмів, та може використовуватися для одержання біопрепаратів проти збудників

5 грибних та бактеріальних хвороб рослин.

Останні 2-3 роки бактеріальні хвороби рослин вийшли на рівень епіфітотій, викликаючи втрати урожаю до 30 %, а в окремих випадках 50-80 %. Має місце розвиток як бактеріозів, так і змішаних інфекцій, викликаних декількома збудниками, зокрема, бактеріомікозів. Фітопатогени, окрім зниження кількості і якості урожаю, сприяють накопиченню в рослинах, особливо в

10 продуктах урожаю, мікотоксинів, небезпечних для здоров'я людини і тварин: знижують імунітет, сприяють зростанню онкологічних захворювань.

На сьогодні провідне місце у системі захисту рослин від фітопатогенів та запобігання зниження врожаю посідають хімічні засоби. Проте використання пестицидів призводить до небажаних з точки зору екології наслідків. Розвиток та впровадження екологічно орієнтованих систем сільського господарства, одержання екологічно чистих продуктів є одним з найбільш перспективних напрямків розвитку сучасного сільського господарства. Основна роль у цьому підході належить біопрепаратам на основі корисних мікроорганізмів, які забезпечують захист рослин від фітопатогенів за рахунок екологічно безпечних засобів. Біопрепарати, створені на основі живих культур мікроорганізмів чи продуктів їх метаболізму, є високо ефективними, екологічно безпечними і все ширше впроваджуються в практику сільського господарства. Проте асортимент біологічних засобів захисту рослин, на відміну від хімічних, на сьогоднішній день є недостатнім. Тому одним з важливих напрямків досліджень є створення ефективних та екологічно безпечних біопрепаратів на основі нових штамів мікроорганізмів, зокрема, стрептоміцетів.

25 Стрептоміцети - широко розповсюджена в ґрунті група мікроорганізмів. Вони завжди привертати до себе увагу дослідників, завдяки їх здатності утворювати у процесі життєдіяльності різноманітні біологічно активні речовини.

Серед ґрунтових мікроорганізмів стрептоміцети відомі як продуценти біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків. Такі сполуки являють собою макроциклічні лактони, хінони, ароматичні сполуки, аміноглікозиди, пептоліпіди, пептиди, амінокислоти тощо. Спектр їх дії доволі широкий: пригнічення синтезу клітинних оболонок бактерій і грибів, порушення функцій мембран, пригнічення синтезу білків, пуринів, піримідинів, нуклеїнових кислот, енергетичного метаболізму, окислювального фосфорилування тощо; серед них є також антибіотики - антиметаболіти та імунодепресанти.

35 Відомий штам *Streptomyces avermitilis*; IMB Ac-5015, який є продуцентом авермектинів - сполук з антипаразитарною активністю, що використовуються у складі інсектоакарономатодцидних препаратів (UA69639, опубл. 15.08.2006 року). Вказаний штам є основою нематодцидного препарату "Аверком", який ефективний стосовно паразитів рослин, проте не виявляє активності щодо фітопатогенних бактерій.

40 Препарат Микостоп (фірма Кеміра, FI) на основі штаму актиноміцета *Streptomyces griseoviridis* (Хлопцева Р.И. Использование биофунгицидов Микостоп и Триходермин (на основе *Streptomyces griseoviridis* и *Trichoderma* spp.) в борьбе с фитопатогенными грибами возбудителями корневой гнили огурца, - Экологическая безопасность в АПК, № 3, 2003, с. 451-456) зареєстровано для використання в Росії. Зазначений штам є ефективним проти корневих гнилей, проте не виявляє впливу на бактеріальні інфекції.

45 У Росії було одержано штам актиноміцета *Streptomyces felleus*, що виявляє антагоністичні властивості по відношенню до фітопатогенних грибів (RU2052501, опубл. 20.01.1996 року). Зазначений штам входить до складу біопрепарату Арілін, який використовується для боротьби з фітопатогенними грибами. Вказаний штам є вибраним за прототип даного винаходу. Основним недоліком цього штаму є те, що його активність направлена на грибних інфекції у рослин та не проявляється стосовно бактеріальних збудників захворювань.

Задача даного винаходу полягає у розширенні спектра антагоністичної активності, направленої як проти фітопатогенних бактерій, так і грибів, що є особливо актуальним у при змішаних інфекціях рослин.

55 Вказана задача вирішується за рахунок одержання нового штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025, який має антагоністичну активність стосовно мікроорганізмів-збудників захворювань рослин.

Штам *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 ізолювано у 2009 році з каштанового ґрунту мису Каліакра методом поверхневого розсівання водної суспензії ґрунту.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму: *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 утворює прямі конідієносці; спори мають гладку поверхню. Культура утворює колонії округлої форми, складчасті, шкіряні. Окрас колоній від білого до коричневого в залежності від складу агаризованого середовища. Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості наведені в Таблицях 1 та 2.

Активність штаму: штам *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 утворює комплекс біологічно активних речовин, що виявляють високу антагоністичну активність проти фітопатогенних бактерій, грибів.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму: найкраще зберігається у ліофілізованому стані. Штам попередньо вирощують на вівсяному агарі протягом 10-14 діб при 28 °С. Спори і міцелії змивають стерильною водою, змішують з захисним сахарозно-желатозним середовищем (1:1) і ліофілізують в ампулах. Після висушування ампули запаяють і зберігають при кімнатній температурі у темряві.

Вівсяний агар (г/л): вівсяні пластівці 20,0; агар 18,0; вода водогінна до 1 л; рН - 7,2.

Сахарозно-желатозне захисне середовище: 30 %-ий розчин сахарози та 10 %-ий розчин желатину готують окремо. Сахарозу стерилізують текучим паром три рази; желатин стерилізують 20 хв. при 1,5 атм, в результаті чого утворюється желатоза. Готові компоненти з'єднують перед застосуванням у співвідношенні 1:1.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 добре росте на багатьох агаризованих (див. Табл. 1) та відповідних рідких середовищах при температурі 26-28 °С. Склад рідкого середовища для визначення антагоністичної активності проти фітопатогенних бактерій та грибів (г/л): соєва мука - 12,0; дріжджовий автолізат - 4,0; кукурудзяний екстракт - 3,0; CaCO₃-4,5; K₂HPO₄-0,5; глюкоза - 50,0; вода водогінна до 1 л; рН - 7,2.

Генетичні особливості штаму - ауksотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів та інші): *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 - типовий гетеротроф - утворює прямі спороносці (конідієносці) і спори (конідії) з гладкою поверхнею. Штам чутливий до еритроміцину, поліміксину, неоміцину, канаміцину, рифампіцину, офлокацину, перффлокацину, фуразолідону, олеандоміцину (зони затримки росту - від 10 до 36 мм), не чутливий до азитроміцину, ністатину, стрептоміцину, ампіциліну, бензилпеніциліну, цефенімому, цефтазидину, фурадоніну, метициліну.

Таблиця 1

Культуральні властивості штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025

Середовище	Пігментне забарвлення		
	Субстратний міцелій	Повітряний міцелій	Розчинний пігмент
Мінеральний агар (Гаузе-1)	Жовто-коричневий	-	Жовтий
Органічний агар (Гаузе-2)	Жовто-бурий	Білий	-
Глюкозо-нітратний агар (модиф. Чапека)	Кремowo-жовтий	Білий	-
Картопляно-глюкозний агар (КГА)	Жовто-коричневий	Білий з жовтим	Жовтий
Крохмалево-амонієвий агар (КАА)	Кремowo-тілесний	Білий	-
Гліцерин-аспарагіновий агар (ГасА)	Темно-тілесний	-	-
Глюкозо-нітратний агар (СР-1)	Буро-коричневий	Коричневий з білим	Жовто-бурий
Сахарозо-нітратний агар (Чапека)	Світло-коричневий	Сіро-білий	-
Сусло-агар (СА)	Кремowo-карміловий	Білий	-
Дріжджово-солодовий агар (ISP-2)	Пісочний	-	Шкірястий
Желатиновий агар (ЖА)	Жовто-коричневий	Білий	-
М'ясо-пептонний агар (МПА)	Жовто-коричневий	Біло-коричневий	Жовто-бурий
Вівсяний агар (ISP-3)	Жовто-коричневий	-	Жовтий

Таблиця 2

Фізіолого-біохімічні властивості штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025

Показник	Результат спостереження
Утилізація джерел вуглецю	Росте на глюкозі, рамнозі, сахарозі, маніті; інозиті, сорбіті, маніті; слабо росте на арабінозі, ксилозі, фруктозі, целюлозі, лактозі
Утворення меланіну	Не утворює
Розрідження желатину	Не розріджує але росте
Пептонізація молока	Не пептонізує
Коагуляція молока	Не коагулює
Гідроліз крохмалю	Гідролізує
Відновлення нітратів	Відновлює до аміаку
Утворення H ₂ S	Утворює
Руйнування клітковини	Не руйнує
Відношення до антибіотиків	Чутливий до еритроміцину, неомицину, поліміксину, канаміцину і рифампіцину; не чутливий до ністатину, ампіциліну.

Запропонований згідно з винаходом штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 може бути використаний як основа комбінованого біопрепарату проти фітопатогенної мікрофлори.

5 Даний винахід може бути проілюстрований приведеними нижче прикладами конкретного здійснення.

Приклад

В експерименті досліджували антагоністичну активність заявленого штаму *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025. Культуру заявленого штаму вирощували на агаризованому або у рідкому середовищі (глибинним способом), при температурі +28±1 °C протягом 10 діб. У першому випадку використовували чашки Петрі або пробірки (по 20 мл середовища у кожному). У другому випадку культури вирощували на роторних качалках (n=240 об./хв.) у скляних колбах об'ємом 750 мл (50 мл на одну колбу). Посівний матеріал (маточна культура) вирощували впродовж доби і засівали ферментаційне середовище у кількості 5 % від об'єму.

15 Склад агаризованих середовищ для вирощування стрептоміцетів (г/л):

Вівсяний агар (ISP-3) - вівсяні пластівці 20; розчин мікроелементів (FeSO₄·7H₂O-0,1; MnCl₂·4H₂O - 0,1; ZnSO₄·7H₂O-0,1 в 100 см³ дистильованої води) 1 мл; агар 18; дистильована вода 1 л; рН 7,2. Вівсяні пластівці заливали гарячою водою на 10 годин, потім доводили до кипіння, відфільтровували через кілька шарів марлі, поєднували з розплавленим у воді агаром і доводили об'єм до 1 л.

20 Склад рідких поживних середовищ для вирощування стрептоміцетів в умовах глибинного культивування (г/л):

середовище для посівної культури (МС) (г/л): соєве борошно - 15; дріжджі сухі - 5; глюкоза - 20; водогінна вода до 1 л, рН 6,2;

25 ферментаційне середовище (ФС 2) (г/л): соєве борошно - 12,0; дріжджовий автолізат - 3,0; кукурудзяний екстракт - 3,0 мл; глюкоза - 70,0; CaCO₃-4,5; K₂HPO₄-0,3; водогінна вода до 1 л, рН 6,8-7,0, стерилізація 0,75 атм 20 хвилин;

Фітопатогенні мікроміцети для визначення антагоністичної активності запропонованого штаму вирощували протягом 7 діб у термостаті за температури 28 °C при використанні наступних агаризованих середовищ:

30 Агар Чапека (АЧ) (г/л) - глюкоза - 20; NaNO₃-2; K₂HPO₄-1; MgSO₄·7H₂O-0,5; KCl-0,5; FeSO₄-0,01; агар - 15; дистильована вода - до 1 л; рН 7,0-7,3, доводили молочною кислотою до рН 5,0-5,5.

35 Сусло агар (СА) (г/л) - сусло 7° по Баллінгу - 1 л; CaCO₃-1; агар - 15-25. До відповідної концентрації цукру сусло доводили водогінною водою. Сусло стерилізували при 0,5 атм протягом 20-30 хв., рН 5,3.

Фармакопейні бактерії (*Bacillus subtilis* B-901, *B. subtilis* B-903, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) вирощували на м'ясо-пептонному агарі.

40 Антагоністичні властивості стрептоміцетів визначали методом агарових блоків (поверхневе вирощування) або методом циліндрів (глибинне вирощування) (Бурцева С.А., Сирбу Т.Ф., Сланина Т.Ф. Антагонистические свойства новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы // Микробиология і біотехнологія. 2007. № 1. - С. 40-45 або Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. - М.: Изд-во Московского университета, 1991.-303 с.).

Вказані методи базуються на дифузії продуктів метаболізму стрептоміцетів або рідкої культури у поживний агар, засіяний тест-культурою. Тест-культури висівали на поверхню відповідного поживного середовища, розтирали скляним стерильним шпателем для отримання рівномірного суцільного росту, накладали агарові блоки культури стрептоміцету, або розміщували скляні циліндрики, в які вносили по 0,2 мл культуральної рідини чи етанольних екстрактів біомаси стрептоміцету.

Про наявність антагоністичної активності стрептоміцету свідчили зони відсутності росту тест-об'єкту навколо блоків після інкубації від 2 до 7 діб у термостаті за температури 28 °С. Вимірювали діаметр зон відсутності росту, мм.

У досліджах використовували наступні фітопатогенні бактерії, отримані з колекції відділу фітопатогенних бактерій ИМБ НАНУ: *Pseudomonas syringae* 8511 (УКМ В-1027¹) збудник захворювань бузку; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8291 (УКМ В-1015) - пшениці; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 7886 (УКМ В-1016) - пшениці; *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9129 (УКМ В-І 154) - вівса і пшениці; *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9060 - вівса; *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571 - сої; *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8541 (УКМ В-І019) - сої; *P. corrugata* 9070 - томатів; *Xanthomonas vesicatoriae* 7790 - томатів і перцю; *X. translucens* 7696 - пшениці; *X. axonopodis* pv. *glycines* 9075 (УКМ В-І 162) - сої; *X. axonopodis* pv. *glycines* 8609 - сої; *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* 102 - картоплі і томатів; *Pantoea agglomerans* 8490 - бобових, а також фітопатогенні гриби, отримані з колекції відділу фізіології і систематики мікроміцетів ИМБ НАНУ: *Alternaria alternata* 16814 - збудник альтернаріозу плодів томатів; *Fusarium oxysporum* 54201 - збудник фузаріозу плодів томатів; *F. oxysporum* n.33 - збудник кореневої гнилі гороху; *Nigrospora oryzae* 16864 - збудник нігроспоріозу кукурудзи.

Антагоністична активність заявленого штаму *Streptomyces marinolimosus* ИМБ Ас-5025 стосовно фармакопейних культур є представленою у Таблиці 3. Антагоністична активність запропонованого штаму стосовно фітопатогенних бактерій та грибів представлена у Таблиці 4.

Таблиця 3

Антагоністична активність штаму *Streptomyces marinolimosus* ИМБ Ас-5025 стосовно фармакопейних культур мікроорганізмів

Культури стрептоміцетів	Зони відсутності росту тест-культури, мм					
	<i>B. subtilis</i> B 901	<i>B. subtilis</i> B 903	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
<i>Streptomyces marinolimosus</i> ИМБ Ас-5025	15,5	10,5	11	17	0	17,5

Таблиця 4

Антагоністична активність штаму *Streptomyces marinolimosus* ИМБ Ас-5025 стосовно фітопатогенних бактерій та грибів

Фітопатогенні бактерії та гриби	Зони відсутності росту тест-культур, мм
<i>Pseudomonas syringae</i> В-1027 ¹	0/12**
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> В-1015	0/0
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> В-1016	42/26
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> В-1154	28/22
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9060	0/34
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 (соє)	16/16
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> В-1019	26/14
<i>P. corrugata</i> 9070	0/18
<i>Xanthomonas viscaloriae</i> 7790	0/0
<i>X. translucens</i> 7696	16/22
<i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> В-1162	0/20
<i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609	0/18
<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> 102	14/30
<i>Pantoea agglomerans</i> 8490	48/0
<i>Alternaria alternata</i> 16814	21/30
<i>Fusarium oxysporum</i> 54201	19,5/16
<i>F. oxysporum</i> n.33	14/12
<i>Nigrospora oryzae</i> 16864	27/23

Примітка: *«-» - не визначали.

** у чисельнику - екстракт з міцелію; у знаменнику - культуральна рідина;

Таким чином, запропонований новий штам *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 виявляє виражену антагоністичну активність стосовно широкого спектра фітопатогенів, як бактерій, так і грибів, що являє собою значну перевагу у порівнянні із відомими технічними рішеннями.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам *Streptomyces marinolimosus* IMB Ac-5025 - антагоніст фітопатогенних мікроорганізмів.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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