



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119651** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

A01P 3/00

C12P 1/04 (2006.01)

A01P 21/00

C12N 9/54 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C02F 9/14 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 08085**

(22) Дата подання заявки: **03.08.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.09.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.09.2017, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Скроцький Сергій Олександрович (UA),
Бутенко Михайло Юрієвич (UA),
Хоменко Людмила Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):

**Скроцький Сергій Олександрович,
вул. Гагаріна, 10, кв. 45, с. Шпитьки, Києво-
Святошинський район, 08122 (UA),
Бутенко Михайло Юрієвич,
вул. Волинська, 15, кв. 5, м. Київ, 03151,
Україна (UA),
Хоменко Людмила Анатоліївна,
вул. Чабанівська, 9, м. Київ, 03187, Україна
(UA)**

(54) ШТАМ *Bacillus subtilis* IMB В-7349 - ЯК САМОДОСТАТНІЙ АБО В СКЛАДІ КОНСОРЦІУМІВ БІОЛОГІЧНИЙ АГЕНТ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ, БАКТЕРІЙ ТА ВИКОРИСТАННЯ ПРИ ОЧИЩЕННІ ВІД ЗАБРУДНЕНЬ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ОРГАНІЧНИМИ РЕЧОВИНАМИ ПРИРОДНОГО ТА ШТУЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ.

(57) Реферат:

Запропоновано штам спорових бактерій *Bacillus subtilis*, який депонований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології НАН України під номером _IMB В-7349, для використання як самостійного діючого агента, так і в складі різноманітних консорціумів мікроорганізмів при отриманні біопрепаратів захисту рослин від фітопатогенних грибів, і бактерій та використання при очищенні від забруднень навколишнього середовища органічними речовинами природного та штучного походження.

UA 119651 U

Винахід відноситься до мікробіології та біотехнології та може бути застосований в сільському господарстві для захисту рослин від хвороб, та в екології при очищенні навколишнього середовища від забруднювачів органічної природи.

Відомий штам *Bacillus subtilis* IMB B7516 - продуцент комплексу ферментів з целюлозолітичною активністю (Патент України UA 102308 U, 26.10.2015, Бюл. №20), але для вказаного штаму доведена тільки целлюлозолітична активність. Та не досліджувались його антагоністичні властивості, щодо фітопатогенів та стимулююча здатність на підвищення специфічної активності інших мікроорганізмів при його застосуванні в консорціумах. Також відсутні данні щодо деструкції складних органічних речовин штучного походження також не досліджувалась.

Відомий штам *Bacillus subtilis* BS2931 характеризується антагоністичними властивостями до збудників парші та опіку плодів (Деклараційний патент на винахід UA 35420 A). Для даного штаму доведена тільки антагоністична активність до збудників хвороб рослин - *Fusicladium denticum* та *Erwinia amylovora*, але не досліджено широкий спектр таких родів фітопатогенів як *Phoma*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Fusarium*, *Microdochium*. Також не встановлена здатність штаму до деструкції складних органічних речовин, природного та штучного походження та целюлози.

Найближчим до того, що запропоновано є штам - *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128, що входить до складу біопрепарату «Фітоспорин» (Патент РФ №2099947, кл. A01N, C12N, C12R, опубл. 27.12.1997). Штам має значну антагоністичну активність по відношенню до фітопатогенних бактерій, грибів та немає даних щодо деструкції целюлози.

Целюлоза - це полісахарид, що є основною складовою клітинних стінок вищих рослин та водоростей. Целюлоза - це полімер, що складається з ланцюгів молекул β -D-глюкози, з'єднаних β -1,4-глікозидними зв'язками. Структурно - це волокнистий полімер. Целюлозні волокна механічно міцні, не розчинні у воді та стійкі до різних хімічних впливів. Розкласти целюлозу здатні мікроорганізми родів *Clostridium*, міксобактерії, деякі бактерії роду *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, мікроорганізми, які є мікрофлорою шлунку жуйних тварин та інші. Усі ці мікроорганізми є продуцентами ферментів - целюлаз. Целюлази (целюлолітичні ферменти) належать до класу гідролаз, що каталізують гідроліз 1,4-глікозидних зв'язків в молекулі целюлози з утворенням ряду олігосахаридів різного ступеню полімеризації аж до мономера глюкози.

Існує два основних типи целюлаз:

- першого типу - ендоглюканази (1,4-глюкан-4-глюканогідролази, енд-1,4-глюканаза), які гідролізують зв'язки у молекулі целюлози та деяких її розчинних похідних (карбоксиметил-, гідроксietилцелюлоза та ін.) невпорядкованим чином, утворюючи набір полі- та олігомерних фрагментів різної довжини.

- другого типу - целобіогідролази (1,4-D-глюкан-4-целобіогідролази, екзоцелобіогідролази), які гідролізують молекули целюлози, утворюючи майже виключно целобіозу, яку вони відщеплюють від невідновлювальних кінців полісахариду. Характерна властивість двох типів целюлаз - наявність синергізму при їх спільній дії на високовпорядкованих форм целюлози (бавовняне волокно, мікросталічна целюлоза).

Патент UA95427 (опубл. 25.12.2014) описує штам гриба *Chaetomium globosum* IMB F-100063, який призначений для одержання комплексу целюлаз з метою розкладання рослинних решток та підвищення урожайності сільськогосподарських культур. Була вивчена здатність гриба розкласти солом'яну озимої пшениці. Ефективність деструкції за результатами лабораторного експерименту складала 31,5 %. Недоліком є те, що представники виду *C. globosum* здатні викликати деякі захворювання та алергічні реакції в людини.

Патент UA102308 (опубл. 26.10.2015) описує продуцент целюлозолітичних бактерій штам *Bacillus subtilis* IMB B-7516 здатний до продукування целюлаз, а антагоністична властивість, щодо фітопатогенних мікроорганізмів його не визначалась (Патент UA102308 опубл. 26.10.2015).

Задачею винаходу було виділення штаму, що мав властивості до деструкції складних органічних речовин, зокрема целюлози та також проявляв значну антагоністичну властивість, щодо бактерійних та грибкових збудників хвороб рослин. Що дозволило б отримувати комплексні біопрепарати широкого спектру дії, та створювати за їх допомогою нові ефективні агро- та екологічні технології.

Поставлена задача вирішувалась тим, що було виділено штам спорових бактерій *Bacillus subtilis*, який проявляв значну целюлозолітичну і одночасно антагоністичну активність щодо різноманітних фітопатогенів. Штам було виділено ТОВ «НВП МІКРОБІО БІОТЕХНОЛОГІЇ» з солом'яної підстилки для ВРХ та задепоновано в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7349. Основними критеріями

при його виділенні слугували його целюлозна активність та антагоністична активність до таких збудників як *Fusicladium denticum*, *Erwinia amylovora*, *Phoma*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Fusarium*, *Microdochium*, важливою характеристикою була відсутність токсичності та патогенності до рослин та теплокровних тварин. Ідентифікація штамів проводилась з використанням молекулярно-генетичних методів.

Морфолого-культуральні ознаки:

Культура штаму характеризується наступними властивостями - грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, що продукують каталазу. На м'ясо-пептонному агарі (МПА), сусло-агарі дають рясний ріст. На МПА утворюють сірувато-білі, дрібні колонії з хвилястими краями, в'язкої консистенції. Ріст в рідкому середовищі супроводжується помутнінням середовища, утворенням плівки та осаду. Через 18 годин росту в мазках культури виявляються прямі паличковидні клітини, розміром 3-5х0,6-1 мкм, розташовані поодинокі, попарно чи ланцюжком. Клітини рухливі. При спороутворенні клітина не роздувається. Спори овальні, розміром 0,9х0,6 мкм, розташовані в клітині ексцентрично. Культура ферментує глюкозу, в-галактозу, лактозу, сахарозу та мальтозу. Не розкладає маніт, інозит, сорбіт та арабінозу. Дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крахмал, желатин, сечовину, утилізує цитрат натрію з глюкозою, малонат натрію не використовує, слабо росте в анаеробних умовах. Редує нітрати, не утворює індол та сірководень. В лабораторних умовах штам *Bacillus subtilis* IMB B-7349 здатний розщеплювати рослинні рештки на 20-60 % в залежності від їх типу.

Умови культивування: культивується на таких середовищах, як сусло-агар, МПА, картопляний агар.

Спосіб визначення: штам культивується на мінеральному середовищі з додаванням поживних залишків (1-2 %) в якості єдиного джерела карбону. По закінченню культивування (10-12 діб) відзначається зменшення маси рослинних решток на 18-25 % для пшеничної соломи, та для кукурудзи та соняшника.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового культивування штаму: зберігається на середовищі сусло-агар, Громико (МПА+СА), під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз в рік.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму та інтенсифікації продукування його целюлозолітичних ферментів та його розмноження можна проводити на середовищах аналогічного складу.

Приклад 1. Вирощування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349.

Культивування бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7349 здійснювали в колбах місткістю 750 мл з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв.) при 28°C, оптимальне значення pH 6,0-8,0 упродовж 18-36 годин на рідкому мінеральному середовищі наступного складу (г/л): K_2HPO_4 - 6,0; KH_2PO_4 - 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2, $(NH_4)_2SO_4$ - 1,15. Як джерело вуглецю та енергії використовували глюкозу (10 г/л), натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-CMC) 0,5 %, фільтрувальний папір 1 %, бавовняну вату 1 %, целобіозу 1 %, пшеничну солому 1 %, соняшник 1 % та кукурудзу 1 % (мас). Як посівний матеріал використовували добуву культуру вказаного штаму, вирощену на МПА, а також культуральну рідину, що була вирощена на середовищі, яке має приведений вище склад. Посівний матеріал вносили з розрахунку 3-5 об. % культуральної рідини.

Приклад 2. Дослідження розкладання целюлозовмісних решток штамом *B. subtilis* IMB B-7349.

При дослідженні ступеню розкладання целюлозовмісних субстратів запропонованим штамом замість глюкози в синтетичне поживне середовище вносили поживні залишки із розрахунку 1,2 г абсолютно сухої маси целюлозовмісного субстрату на 100 мл поживного середовища. Після 10 діб культивування залишки целюлозовмісного субстрату відокремлювали від культуральної рідини, висушували та розраховували відсоток його розкладання за формулою:

$$B = 1 - (B_0 \cdot B_1 / B_0) \times 100$$

де B_0 - початкова вага субстрату; B_1 - кінцева вага субстрату.

Як поживні залишки у досліді використовували пшеничну солому, соняшникове та кукурудзяне бадилля, оскільки вони значно відрізняються між собою полісахаридним складом. Так, до складу пшеничної соломи, входить значна кількість целюлози та лігніну, до соняшника - пектинові речовини, до кукурудзяного бадилля - геміцелюлоза.

Було встановлено, що штам *B. subtilis* IMB B-7349 здатний до деструкції пшеничної соломи на рівні 15-35 %, соняшника - 41-45 % і кукурудзи - на рівні 25-48 % у залежності від типу використаного джерела азотного живлення.

Відомо, що на ефективність розкладання рослинних решток значно впливає кількісний вміст целюлозовмісних решток. Тому, нами було досліджено ефективність розкладання поживних 30

залишків при їх різному вмісті в середовищі культивування (1 мас. % та 2 мас. %).

Як видно з приведених даних, штам *B. subtilis* IMB B-7349 - запропонований штам - є продуцентом ферментів з целюлозолітичною активністю, що розщеплюють поживні рослинні рештки різного походження. Також штам *B. subtilis* IMB B-7349 є активним продуцентом липаз та протеаз. Вказаний штам може використовуватися у сільському господарстві, та для очищення навколишнього середовища від органічних забруднювачів різного походження.

Приклад 3. Виявлено, що *Bacillus subtilis* IMB B-7349 має антагоністичну активність по відношенню до наступних мікроорганізмів із родів *Phoma*, *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Fusarium*, *Microdochium* (табл. 1).

Визначення антифунгальної активності даного штаму проводили методом зустрічних культур на МПА. В чашках Петрі висівали агаровий блок з міцелієм патогену, бактерійний штам наносили методом штриха на відстані 4 см від блоку патогену. Культуру інкубували протягом 20 діб при температурі +29°C. Контроль - чисті культури патогенів та бактерій, які були посіяні окремо. Результати знімали на 5-у, 10-у, 15-у та 20-ту добу. Відмічали характер взаємодії патогенів та бактерії, наявність або відсутність зон, їх розмір, колір, щільність. Ступінь інгібування росту патогену визначали за формулою:

$$I = (1 - (A/B)) \times 100,$$

де I - % інгібування;

A - ріст патогену в варіанті;

B - ріст патогену в контролі.

Штамм *Bacillus subtilis* IMB B-7349 активно інгібував ріст наступних фітопатогенів: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale* (F.nivale), *Pyrenophora tritici-repentis* *Erwinia amylovora*, *Phoma*, *Puccinia*, *Microdochium*.

Таблиця 1

Антифітопатогенна активність штаму *B. subtilis* IMB B-7349

Рід фітопатогену	Хвороба	Інгібування росту фітопатогену за різний час інкубування, %		
		7 доба	12 доба	18 доба
<i>Fusarium graminearum</i>	Фузаріоз колосу, прикоренева гниль	35,2	61,4	62,3
<i>Fusarium culmorum</i>	Фузаріоз колосу	51,3	53,2	53,2
<i>Microdochium nivale</i> (F.nivale)	Сніжна пліснява	21,4	55,4	51,1
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Жовта пятнистість листа	82,2	94,3	96,5
<i>Erwinia amylovora</i>	Бактеріальний опік фруктових дерев	25,3	33,2	54,4
<i>Phoma</i>	Фомоз, зональна пятнистість	44,9	58,3	65,2
<i>Puccinia</i>	Фіто іржа	38,7	66,4	72,3

Відмічались значні морфологічні та культуральні зміни в розвитку фітопатогенів під дією вторинних метаболітів штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349: відсутність повітряного міцелію в грибних культур, лізис та зменшення міцелію, що сформувався. Інгібування росту грибних та бактеріальних фітопатогенів.

Приклад 4. Для оцінки біологічної ефективності зерна озимої пшениці обробляли культуральною рідиною штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349, яку вирощували в колбах на МПБ. Культивування проводили протягом 48 год.

Створювали штучний інфекційний фон шляхом змішування (інокулювання) прокаленого піску та інфекційного порошку (4 г на 250 г піску). Для приготування концентрату фітопатогену використовували штам *Fusarium culmorum*, який попередньо культивувався методом твердофазної ферментації на зерні. Порошок отримували шляхом висушування та подрібнення до порошкоподібного стану. Отриманий порошок перемішували з піском та зволожували. Отриману суміш в стаканчиках інкубували при температурі +27°C та вологості 50% протягом 4-ох діб, після чого висівали озиму пшеницю сорту «Подолянка» попередньо оброблену культуральною рідиною штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349.

Облік результатів проводили через 18 діб. Для цього рослин виймали з ґрунту, промивали кореневу систему та аналізували ділянки коренів, що були вражені гнилями. На основі проведеного аналізу визначали біологічну активність препарату для захисту від даного захворювання.

5

Таблиця 2

№ п/п	Назва діючого агента (штама мікроорганізмів)	Розповсюдження грибкового враження, %	Біологічна активність
1	Контроль (інфікування без обробки)	82,3	0
2	Bacillus subtilis 128 ВНИИСХМ (діючий агент біопрепарату «Фітоспорин» (розв. в рекомендованих дозах)	45,4	55,2
3	Bacillus subtilis IMB B-7349 культуральна рідина	18,1	79,3

Встановлено (табл. 2), що біологічна активність штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349, щодо антагонізму до гриба *Fusarium culmorum* в натуральному досліді становить 79,3%, а у штаму *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ (діючий агент біопрепарату «Фітоспорин» цей показник - 55,2% та є меншим за показники для штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349 в 1,44 рази.

10

Приклад 5. Було перевірено вплив обробки культуральною рідиною штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349 насіння пшениці сорту «Подільська» на урожайність зерна та його питому вагу та склад (табл.3).

Дані дослідження доводять позитивний вплив передпосівної обробки зерна розчинами, що містять клітини штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349, та доцільність його використання як окремо, так і в комплексних препаратах для стимулювання росту та захисту рослин.

15

Таблиця 3

№	Елемент біологічного впливу	Урожайність, ц/га	Маса 1000 зерен, г	Вміст білку, %	Вміст клейковини, %
1	Зерно сорту «Подільська» без обробки	49	1,27	14,1	31,4
2	Зерно сорту «Подільська», попередньо замочене в культуральній рідині штаму <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7349	58	1,36	16,4	36,3

Приклад 6. Було перевірено вірулентність даного штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7349, як показника патогенності у гострих дослідів на моделі білих мишей.

20

Для дослідження брали завис клітин і спор концентрацією КУО 4×10^9 та 24×10^9 у 1 мл. Дослідження проводили на безпородних білих мишах вагою 18 ± 2 г. Тварини адаптувались до умов утримання протягом 15 діб. Матеріал для досліджень вводили перорально через зонд та внутрішньочеревно за допомогою ін'єкцій. Нагляд за тваринами після затравки та ін'єкцій проводили протягом 14 діб.

25

Критерієм авірулентності слугувало відсутність інфекційної патології протягом 14 днів. Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей. Інфективність (інвазивність) штаму визначали за можливих природних шляхів поступлення останніх в організм, а саме по спроможності клітин проникати тканини органів тварин після введення *per os*. Мишам вводили перорально одноразово в максимальних дозах, що не приводили до загибелі тварин. Через 14 днів спостережень тварин убивали шляхом дислокації шийних хребців та проводили розтин та макроскопічне дослідження внутрішніх органів та висіви їх зразків та поживний агар (СА) для виявлення ретрокультур.

30

Проаналізувавши результати гострих досліджень було встановлено, що штам *Bacillus subtilis* IMB B-7349 - належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин - безпородних білих мишей.

35

Середнолетальні дози культури у гострих дослідях не досягнуті $LD_{50 \text{ per os}} > 12 \times 10^9$ та $LD_{50 \text{ в ч}} > 2 \times 10^9$ клітин\мишу і перевищують рекомендовані порогові значення для непатогенних штамів. По відсутності вірулентності штам можна віднести до 4 класу небезпеки мікроорганізмів: «малонебезпечних практично без алергенної та загальнотоксичної дії».

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7349 як самостійний або в складі консорціумів біологічний агент в складі біологічних препаратів для захисту рослин від фітопатогенних грибів, бактерій.

10 2. Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7349 за п. 1, який **відрізняється** тим, що використовують як самостійний або в складі консорціумів біологічний агент в складі біологічних препаратів для очищення навколишнього середовища від органічних забруднювачів природного та штучного походження.

15

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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