



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119652** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12R 1/38** (2006.01)**C12P 1/04** (2006.01)**A01N 63/02** (2006.01)

A01P 3/00

A01P 7/02 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

A01P 21/00

A01P 15/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21)** Номер заявки: **u 2017 08121****(22)** Дата подання заявки: **04.08.2017****(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 р-н, 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 БАКТЕРІЙ *Pseudomonas aureofaciens* - ІМВ В-7559, ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ ЯК САМОСТІЙНОГО ДІЮЧОГО АГЕНТА, ТАК І В СКЛАДІ РІЗНОМАНІТНИХ КОНСОРЦІУМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ ОТРИМАННІ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН З АНТИМІКРОБНОЮ, ФУНГІЦИДНОЮ, ЕНТОМОПАТОГЕНОЮ ТА РІСТСТИМУЛЮЮЧОЮ ДІЄЮ****(57) Реферат:**

Запропоновано штам *Pseudomonas aureofaciens* МБ- 17, який депонований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології НАН України під номером ІМВ В-7559, для створення як самостійного діючого агента, так і в складі різноманітних консорціумів мікроорганізмів при отриманні біопрепаратів захисту рослин від фітопатогенних грибів і бактерій та шкідників.

UA 119652 U

Корисна модель належить до мікробіології та біотехнології та може бути застосована в сільському господарстві для захисту рослин від хвороб та комах-шкідників.

Втрата біля третини врожаю сільськогосподарських культур відбувається внаслідок хвороб, які спричинені патогенними організмами, в результаті чого зменшується продуктивність рослин, погіршується якість врожаю, та навіть інколи відмічається загибель рослин.

Відомо, що чисельність шкідливих для рослин організмів висока, так налічується понад 70 000 комах шкідників в світі та близько 50 000 видів фітопатогенних грибів та мікроорганізмів.

Ці проблеми частково або повністю вирішуються за допомогою хімічного методу, а саме застосування токсичних для шкідників фунгіцидів, інсектицидів, які досить дорогі та відносно небезпечні для довкілля. Тому в сучасній агробіотехнології присвячується багато уваги проблемі безпеки захисту рослин для людини і навколишнього середовища. Ефективним та екологічно чистим методом захисту рослин від фітопатогенів є використання природних немодифікованих мікроорганізмів, які можуть бути антогоністами фітопатогенних грибів та бактерій та мають ентомопатогенними властивостями, а також за рахунок синтезу різних метаболітів (фітогормонів, стимуляторів росту тощо) позитивно впливають на ріст та розвиток рослин. Так відомо, що для захисту сільськогосподарських рослин використовують метод обробки насіння або рослин, що ростуть у відкритому і закритому ґрунті, препаратами мікроорганізмів-антагоністів фітопатогенів таких видів, як *Bacillus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Frankia*. Більшість з цих мікроорганізмів відносять до ризосферних мікроорганізмів і здатні синтезувати регулятори росту рослин (фітогормони), покращувати фосфорне живлення рослин, фіксувати атмосферний азот, індукувати резистентність фітопатогенів за рахунок синтезу антибіотиків і сідерофорів. Використання таких штамів знаходить широке застосування в сучасній агробіотехнології. Найбільш популярними є біопрепарати для захисту рослин на основі роду *Pseudomonas* (Гаупсин, Планриз, Агат, Бізар, Псевдобактерин).

Відомий патент [патент RU 2352629, кл. C12N 1/20, 2006.01], в якому описаний штам бактерій для захисту та покращення росту рослин, що ростуть на ґрунтах забруднених поліциклічними ароматичними вуглеводнями. Недоліком патенту є вузький спектр антагоністичної активності штаму по відношенню до фітопатогенних грибів та бактерій.

Описано використання штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7096 з додатковим вмістом біогумусу та мікроелементів для боротьби з хворобами спричиненими грибовими патогенами. Недоліком є відсутність антагоністичної дії на фітопатогени. Тільки встановлена підвищення врожайності культур винограду, пшениці, ячменю, томатів, огірків на 28-35 %. [Пат. 44245. Біопрепарат для захисту рослин від фітопатогенних мікроорганізмів].

Відомо, що штам *Pseudomonas putida* 17 [Пат. РФ 2213774 штам бактерій *Pseudomonas putida* для получения препарата против заболеваний пшеницы, вызываемых грибами фитопатогенами] пригнічує розвиток захворювань пшениці, що викликані твердою головною на кореневими гнилями. Встановлено, що передпосівна обробка пшениці суспензією цього штаму збільшує врожайність зерна (на 66,02 %), але не вказана дія цього штаму на фітопатогенні мікроорганізми та на комах-шкідників.

Аналогом є Патент 79812. Україна. Спосіб одержання біопрепарату "біоксін" для захисту рослин від хвороб, викликаних фітопатогенними грибами. В якому досліджувались два штами *Pseudomonas aureofaciens* та їх синергічна дія на фітопатогени рослин.

Крім цього у всіх перерахованих аналогах та прототипі немає відомостей про активність виділених штамів мікроорганізмів по відношенню до комах-шкідників.

Відомий патент [патент RU 2380886, кл C1], в якому як мікроорганізми-антогоністи фітопатогенів рослин використовували штам бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2188 Д. Цей штам був здатний до синтезу феназін-1-карбонової кислоти, яка має властивості інгібувати розвиток широкого кола ґрунтових фітопатогенів. В результаті цього у рослин збільшувалась стійкість до розповсюджених хвороб рослин, викликаних грибами або мікроорганізмами. Недоліком є відсутність даних про стимулювання росту рослин та захист від комах шкідників.

Використання бактерій для інокуляції культурних рослин є однією з перспективних агротехнологій, які можуть забезпечити рослини ефективним захистом від фітопатогенів та тим самим зменшити використання пестицидів в сільському господарстві.

Задачею корисної моделі є виділення нового штаму, який можливо використовувати для захисту рослин від фітопатогенних грибів та бактерій і для боротьби з комахами. Що дозволило б отримувати комплексні біопрепарати широкого спектру дії, та створювати за їх допомогою нові ефективні агротехнології.

Поставлена задача вирішувалась тим, що було виділено новий штам, який можливо використовувати для захисту рослин від фітопатогенних грибів, бактерій і комах-шкідників. Штам

Pseudomonas aureofaciens Mb-24 був ізольований в 2013 р. з ґрунту яблуневого саду в Київській області та задепоновано в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B- 7559.

На основі культурально-морфологічних досліджень та фізіолого-біохімічних ознак культуру визначили як *Pseudomonas aureofaciens* [за визначником бактерій Берджи. - М.: Мир, 1997]. Культура депонована в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером IMB B- 7559. Штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB B- 7559 не є генетично модифікованим штамом.

Штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 належить до мікроорганізмів, не патогенних для людини та не потребує спеціальних мір поводження.

Дуже важливими характеристиками штаму були його фунгіцидні та бактеріоцидні властивості, а також здатність до стимулювання росту та вплив на комах-шкідників.

Принципальні специфічні продукти.

Речовини фітогормональної та антибіотичної (антимікробної та антифунгальної) природи та ентомопатогенний токсин.

Морфолого-культуральні ознаки:

Грамнегативні короткі, рухомі палички, розміром $0,5 \times 1,5$ мкм. При культивуванні 48 год. при 28°C на м'ясо-пептонному агарі (МПА) колонії жовто-оранжевого кольору, круглі, гладкі, блискучі не прозорі, діаметр 3-4 мм. Пігмент яскраво-оранжевий. Пігментація на діагностичних середовищах Кінга для флюорисціюючих псевдомонад: Кінг А - пігмент відсутній; Кінг Б - утворюється жовто-зелений флюорисціюючий пігмент. У рідких поживних середовищах (МПБ) утворюється рівномірна муть. Аероби, окислювальний тип метаболізму. Температурний діапазон росту: $4-37^\circ\text{C}$. Оптимальна для росту температура 28°C . При 42°C не ростуть. Та витримує 3 % NaCl при рості на МПБ. Молекулярний азот не фіксує. Пептонізує і згортає молоко. Засвоює з утворенням кислоти глюкозу, ксилізу, сахарозу, арабінозу, рафінозу, фруктозу. Як джерело вуглецю використовує мальтозу, бутанол, гексанол, маніт, гліцерин, бензойну кислоту, пропіонову кислоту, антранілову кислоту, бурштинову кислоту, оскетоглутарову кислоту, піруват, лактат, цитрат, фенілаланін, серин, лейцин, аргінін, аланін, валін, триптофан, орнітин, пролін, лізин, тирозин. Не засвоює лактозу, етанол, пропанол, сорбіт, ацетамід, малеїновий кислоту, адипінова кислота, оксалат, ізомасляну кислоту, треонін, метіонін, цистеїн, гексан, декан, октадекан, формальдегід, фенол.

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

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

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

Приклад 1. Вирощування штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 та отримання його біомаси.

Культивування бактерій *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 здійснювали в колбах місткістю 750 мл з 100 мл рідкого мінерального середовища наступного складу (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ -17,2; KH_2PO_4 -3,0; NaCl-0,5, NH_4Cl -1,0, глюкоза 2,0, на качалці (220 об/хв.) при 28°C , оптимальне значення pH 7,0 упродовж 24-36 год.

Як посівний матеріал використовували добову культуру вказаного штаму, вирощену на МПА, а також культуру, яку вирощували на середовищі з вищенаведеним складом. Як джерело вуглецю і енергії при одержанні посівного матеріалу використовували глюкозу. Посівний матеріал вносили з розрахунку 3-5 об. % культуральної рідини.

Приклад 2. Вивчення антагоністичної активності нового штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 по відношенню до фітопатогенних грибів та мікроорганізмів.

Антагоністичну дію нового штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 на фітопатогенні гриби вивчали методом агарових блочків (Нетрусов А. И., 2005). Культуру бактерій *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 висівали на поверхню поживного агару (МПА з 2 % гліцерину) і вирощували впродовж 2-3 діб при 28°C . Потім вирізали диски (агарові блочки) з культурою штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 і переносили на поверхню картопляного агару з тест-культурою фітопатогеного гриба (суспензію гриба висівали глибинним способом з розрахунку близько 100 спор на 1 мл середовища) і інкубували 2-3 доби при температурі $28-30^\circ\text{C}$. Наявність антагоністичних властивостей визначали через 7-10 діб, заміряючи зону відсутності росту та спостерігаючи за зміною морфології колонії фітопатогенів. Облік проводили по зонам відсутності або пригнічення росту тест-культури навколо агарового блочку з культурою штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559.

Вивчення антагоністичної активності штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 по відношенню до фітопатогенних мікроорганізмів (*Erwinia carotovora*, *Erwinia aroidea*, *Erwinia amilovora*, *Erwinia herbicola*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae*) проводили в чашках Петрі методом лунок. Після інкубування при 28° С впродовж 24 год. візуально реєструють зони пригнічення росту фітопатогенних бактерій навколо лунок з культурою тестованого штаму. За діаметром зон пригнічення росту визначають антагоністичну активність нового штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559. Результати представлені в таблиці 1 і свідчать про те, що новий штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 має широкий спектр антагоністичної дії на фітопатогенні гриби та мікроорганізми. Встановлено, що штам активно пригнічував ріст фітопатогенних грибів видів *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, слабше - *Fusarium nivale*, *Fusarium solani*, *Fusarium heterosporum*, *Pythium altum*, *Pythium oligandrum*. Штами фітопатогенних мікроорганізмів *Erwinia aroidea* та *Pseudomonas syringae* проявляли чутливість до дослідженого штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559. Не пригнічував ріст *Erwinia carotovora* та *Erwinia herbicola*, був активним антагоністом по відношенню до *Erwinia amilovora*, *Xanthomonas vesicatoria*.

Таблиця 1

Антагоністична дія штаму *Pseudomonas aureofaciens*
IMB B-7559 на тест-культури фітопатогенних грибів та бактерій

№	Вид фітопатогенних грибів та мікроорганізмів	Діаметр зони пригнічення росту міцелію або мікроорганізмів, мм
Тест-культури фітопатогенних грибів		
1	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	29, 3±1,15
2	<i>Fusarium culmorum</i>	26,0±4,00
3	<i>Fusarium nivale</i>	22,0±2,00
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	25,3±1,15
5	<i>Fusarium solani</i>	22,7±2,31
6	<i>Fusarium heterosporum</i>	21,3±2,31
7	<i>Rhizoctonia solani</i>	32,7±3,06
8	<i>Pythium altum</i>	23,3±2,31
9	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	38,3±6,51
10	<i>Pythium oligandrum</i>	20,0±1,73
Тест-культури фітопатогенних мікроорганізмів		
1	<i>Erwinia carotovora</i>	8,3±1,15
2	<i>Erwinia aroidea</i>	22,3±0,58
3	<i>Erwinia amilovora</i>	32,7±3,06
4	<i>Erwinia herbicola</i>	9,3±1,15
5	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	30,0±2,00
6	<i>Pseudomonas syringae</i>	18,0±2,64

Приклад 3. Інсектицидні активність штаму *P. aureofaciens* IMB B-7559 оцінювали на гусені яблуневої плодожерки (*Cydia pomonella*) і личинках колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) за стандартними методиками біотестування бактеріальних штамів на комах. Для тестування ентомоцидної активності дослідженого штаму використовували бактеріальну суспензію з титром 1×10^8 кл./мл (за оптичним стандартом), якою інфікували гусень яблуневої плодожерки (5-го покоління) шляхом її короткочасного занурення в розчин з клітинами штаму *P. aureofaciens* IMB B-7559. Інфікованих комах розсаджували в пробірки, які поміщали в камери де підтримувалась постійна температура (25 °C) та вологість повітря (70 %). Контролем слугувала не інфікована гусень яблуневої плодожерки. Результати дослідів враховували кожні 5 діб (1,5 місяці) до виходу імаго з тих плодожерок, що залишилися в живих. Ентомоцидну дію нових штамів вивчали в лабораторних умовах. Біотест - личинки колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera) молодшого віку (4-го покоління). Досліди проводили в 3-х повторях в скляних ізоляторах з зволоженням піском (шар -3-4 см), куди поміщали личинки жука (10 шт) і, оброблені бактеріальною суспензією (титр 1×10^6) листя картоплі. Обробленим кормом личинки харчувалися 3 доби, після чого корм міняли на необроблений. Загальну смертність визначали після виходу молодих жуків, шляхом підрахунку мертвих личинок в піску.

Для визначення летальних концентрацій (ЛК) комах-шкідників інфікували добовою культурою штаму *P.aureofaciens* IMB B-7559 в різних розведеннях ($10^3 - 10^9$ кл./1 мл). ЛК 90 - це концентрація бактеріальних клітин, що викликають 90 % смертність дослідних комах.

Таблиця 2

Вид комах-шкідників	Загальна смертність, %	Вихід імаго, %	ЛК 90, кл/мл
Гусінь яблуневої плодожерки (<i>Cydia pomonella</i>)	74	67	$2,19 \pm 0,04 \times 10^5$
Личинки колорадського жука (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera))	55	66	$7,03 \pm 0,06 \times 10^8$

5

Ентомопатогенні властивості штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559

У зв'язку з нечисельними даними про ентомопатогенну активність мікроорганізмів роду *Pseudomonas* була досліджена токсичність цих бактерій для найбільш розповсюджених комах-шкідників, таких як гусінь яблуневої плодожерки (*Cydia pomonella*) та личинки колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera)). Встановлено, що досліджений штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 був найбільш токсичний для гусені яблуневої плодожерки (загальна смертність – 74 %), менш токсичним (55 %) для личинок колорадського жука *L. decemlineata* (Coleoptera).

Летальна концентрація (ЛК 90) для гусені яблуневої плодожерки становила $2,19 \pm 0,04 \times 10^5$ мікробних клітин в 1 мл робочої суспензії і для личинок колорадського жука $-7,03 \pm 0,06 \times 10^8$ кл/мл. Аналіз культуральної рідини, якою обробляли комах, свідчить про те, що штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 продукує ентомопатогенний токсин. Такий висновок був зроблений після обробки прогрітою культуральною рідиною (5 хв при 100 °C), тобто вільною від живих клітин штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559, про що свідчить висока смертність комах при їх обробці цією рідиною. Загибель гусені яблуневої плодожерки становила в цих умовах 60 %.

Приклад 4. Оцінку рістстимулюючої дії бактеріальної суспензії проводили по показникам енергії проростання та схожості насіння пшениці в лабораторних умовах. Вивчали вплив культуральної рідини *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559 на здатність стимулювати ріст рослин пшениці (сорт Подолянка). Для цього проводили передпосівну обробку насіння вищеназваних рослин з розрахунку 50 мл суспензії клітин досліджуваного штаму. Контрольне насіння рослин обробляли водою. Оброблене насіння висівають у ґрунт. Паралельно висівають насіння пшениці, оброблені водою (контроль). Стимулюючий ефект препарату оцінюють по приросту біомаси до і після обробки насіння пшениці культуральною рідиною. Результати представлені в таблиці 3.

30

З таблиці видно, що запропонований штаму має здатність стимулювати ріст рослин на 18-25 %.

Таблиця

Вплив передпосівної обробки насіння пшениці сорту
Подолянка культуральною рідиною штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559

Варіант досліджу	Загальна маса рослин, г	Маса надземної частини, г	Маса коренів, г
Контроль	15,1	54,88	1,52
Після обробки штамом <i>Pseudomonas aureofaciens</i> IMB B-7559	18,2 (+20,5 %)	68,40 (+25,0 %)	1,80 (+18,4 %)

Таким чином, новий штаму *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7559, має антагоністичну активність щодо широкого спектра фітопатогенних мікроорганізмів, має ентомопатогенні властивості по відношенню до комах-шкідників рослин, та стимулює ріст рослин і може використовуватися в складі біопрепаратів для підвищення врожаю сільськогосподарських рослин.

35

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 1. Штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB В-7559 як самостійний або в складі консорціумів біологічний агент в складі біологічних препаратів для захисту рослин від фітопатогенних грибів, бактерій.
- 10 2. Штам *Pseudomonas aureofaciens* IMB В-7559 за п. 1, який **відрізняється** тим, що його використовують як самостійний або в складі консорціумів біологічний агент в складі біологічних препаратів для боротьби з шкідниками рослин.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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