



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107240** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

C12P 1/06 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 01464	(72) Винахідник(и):	Іутинська Галина Олександрівна (UA), Білявська Людмила Олексіївна (UA), Козирицька Валентина Євгенівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	07.02.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.12.2014	(74) Представник:	Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.08.2014, Бюл.№ 15	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	SU 1719431 A1, 15.03.1992 JP S62207293 A, 11.09.2011 реферат Streptomyces violarus. ATCC - Microbiology Collections. History. – 1969. (http://www.atcc.org/Global/Products/6/6/A/0/15891.aspx) Wang D. S. Microwave irradiation is a useful tool for improving isolation of actinomycetes from soil / D. S. Wang, Q. H. Xue, W. J. Zhu, J. Zhao, J. L. Duan, G. H. Shen // Microbiology. - 2013. - Volume 82. - Issue 1. - p 102-110 UA 69639 C2, 15.08.2006
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.12.2014, Бюл.№ 23		

**(54) ШТАМ STREPTOMYCES VIOLARUS, ЯКИЙ МАЄ КОМБІНОВАНУ АНТАГОНІСТИЧНУ АКТИВНІСТЬ
СТОСОВНО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА НЕМАТОД**

(57) Реферат:

Винахід належить до штаму *Streptomyces violarus* IMB Ac-5027, який виявляє комбіновану антагоністичну активність стосовно нематод та фітопатогенних мікроорганізмів, зокрема, грибів і бактерій.

UA 107240 C2

Винахід належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штамму актиноміцетів, що характеризується високою антагоністичною активністю стосовно фітопатогенної мікрофлори та нематод та може використовуватися для одержання біопрепаратів проти збудників грибних та бактеріальних хвороб рослин, а також нематодозів.

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 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 екологічних 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.

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 являються 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.

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.

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 грибкові інфекції у рослин та не проявляється стосовно бактеріальних збудників захворювань.

Задача даного винаходу полягає у розширенні спектру антагоністичної активності, направленої проти фітопатогенів, таких, як гриби, бактерії та нематоди.

Вказана задача вирішується за рахунок одержання нового штаму *Streptomyces violarus* IMB Ac-5027, який виявляє комбіновану антагоністичну активність стосовно нематод та фітопатогенних мікроорганізмів, зокрема, грибів і бактерій.

Штам *Streptomyces violarus* IMB Ac-5027 було ізольовано у 2009 році з каштанового ґрунту мису Каліакра методом поверхневого розсівання водної суспензії ґрунту.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму: *Streptomyces violarus* IMB Ac-5027 утворює спіральні конідієносці; поверхня спор вкрита шипами. Культура утворює колонії округлої форми складчасті, шкіряні. Забарвлення колоній від біло-рожевого до рожево-фіолетового в залежності від складу агаризованого середовища. Культуральні та фізіолого-біохімічні властивості наведені в Таблицях 1 та 2.

Активність штаму: штам *Streptomyces violarus* IMB Ac-5027 утворює комплекс біологічно активних речовин, що виявляють високу антагоністичну активність проти фітопатогенних бактерій, грибів та нематод.

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 міцелій змивають стерильною водою, змішують з захисним сахарозно-желатозним середовищем (1:1) і ліофілізують в ампулах. Після висушування ампули запаюють і зберігають при кімнатній температурі у темряві.

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

Сахарозно-желатозне захисне середовище: 30 % - вий розчин сахарози та 10 % - вий 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.

10 Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: *Streptomyces violarius* 1MB Ac-5027 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; pH - 7,2.

15 Генетичні особливості штаму /ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів та т.п.): *Streptomyces violarius* 1MB Ac-5027 - типовий гетеротроф - утворює спіральні спороносці (конідієносці) і спори (конідії) з шиловидними виростами. Штам чутливий до рифампіцину, тетрацикліну, фурадоніну, фуразалідону, олеандоміцину, азитроміцину, стрептоміцину, канаміцину, офлоксацину, неомицину, еритроміцину, поліміксину (зони затримки росту - від 2 до 20 мм), не чутливий до ністатину, ампіциліну, бензилпеніциліну, цефаліму, цефтазидину, метициліну.

Таблиця 1

Культуральні властивості штаму *Streptomyces violarius* 1MB Ac-5027

Середовище	Пігментне забарвлення		
	Субстратний міцелій	Повітряний міцелій	Розчинний пігмент
Мінеральний агар (Гаузе-1)	Фіолетовий	Білий	Рожево-фіолетовий
Органічний агар (Гаузе-2)	Темно-фіолетовий	Сірувато-білий	Рожево-фіолетовий
Глюкозо-нітратний агар (модиф. Чапека)	Рожево-бузковий	Фіолетово-рожевий	Рожевий
Картопляно-глюкозний агар (КГА)	Рожево-фіолетовий	Ніжно-рожевий	-
Гліцерин-аспарагіновий агар (ГасА)	Оранжево-рожевий	-	-
Глюкозо-нітратний агар (СР-і)	Фіолетово-карміловий	-	Рожево-фіолетовий
Глюкозо-аспарагіновий агар (ГлАсА)	Оранжево-рожевий	-	-
Сахарозо-нітратний агар (Чапека)	Рожевий	Блідо-рожевий	Блідо-бузковий
Гліцерин-нітратний агар (ГНА)	Блідо-рожевий	-	-
Сусло-агар (СА)	Блідо-рожевий	Білий	Рожево-фіолетовий
Органічний агар Праузера № 79	Буро-коричневий	Білий	Жовто-бурий
Дріжджево-солодовий агар (ISP-2)	Біло-теракотовий	Білосніжний	-
Желатиновий агар (ЖА)	Кремовий	Білий	-
Яєчно-альбуміновий агар (ЯА)	Рожево-білий	-	-
Вівсяний агар (ISP-3)	Оранжево-рожевий	Білий з рожевим відтінком	З рожевим відтінком

Таблиця 2

Фізіолого-біохімічні властивості штаму *Streptomyces violarius* IMB Ac-5027

Показник	Результат спостереження
Утилізація джерел вуглецю	Росте на глюкозі, рамнозі, арабінозі, ксилітозі, фруктозі, целюлозі, лактозі, целобіозі, мальтозі, маніті, інозиті, сорбіті; слабо росте на сахарозі, рафінозі, інозиті
Утворення меланіну	Не утворює
Розрідження желатину	Не розріджує але росте
Пептонізація молока	Пептонізує
Коагуляція молока	Не коагулює
Гідроліз крохмалю	Гідролізує
Відновлення нітратів	Відновлює до аміаку
Утворення H ₂ S	Не утворює
Руйнування клітковини	Росте, не руйнує
Відношення до антибіотиків	Чутливий до стрептоміцину, канаміцину, офлоксацину, азитроміцину, неоміцину, фуразалідону, рифампіцину, еритроміцину, тетрацикліну, фурадоніну, поліміксину, олеандоміцину; не чутливий до ампіциліну, бензилпеніциліну, цефепіму, цефтазидину, метициліну, цефтазидин.

Запропонований згідно з винаходом штаму *Streptomyces violarius* IMB Ac-5027 може бути використаний для одержання комплексного біопрепарату, направленою як проти

5 фітопатогенної мікрофлори, так і нематод.

Даний винахід може бути проілюстрований приведеними нижче прикладами конкретного здійснення.

Приклад 1

В експерименті досліджували антагоністичну активність заявленого штаму *Streptomyces violarius* IMB Ac-5027. 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 Нетрі або пробірки (по 20 мл середовища у кожен). У другому випадку культуру 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

15 доби і засівали ферментаційне середовище у кількості 5 % від об'єму.

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; pH 7,2. Вівсяні пластівці заливали гарячою водою на 10 годин, потім доводили до

20 кипіння, відфільтрувати через кілька шарів марлі, поєднували з розплавленим у воді агаром і доводили об'єм до 1 л.

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

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

- ферментаційне середовище (FC 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, pH 6,8-7,0, стерилізація 0,75 атм 20 хвилин;

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

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; pH 7,0-7,3, доводили молочною кислотою до pH 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., pH 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.

Антагоністичні властивості стрептоміцетів визначали методом агарових блоків (поверхнєве вирощування) або методом циліндриків (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 стрептоміцета.

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 ІМБ ПАНУ: *Pseudomonas syringae* 8511 (УКМ В-1027^Т) - 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-1154) - вівса і пшениці; *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9060 - вівса; *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571 - сої; *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8541 (УКМ В-1019) - сої; *P. corrugata* 9070 - томатів; *Xanthomonas vesicatoriae* 7790 - томатів і перцю; *X. translucens* 7696 - пшениці; *X. axonopodis* pv. *glycines* 9075 (УКМ В-1 162) - 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 ІМБ ПАНУ: *Alternaria alternata* 16814 - збудник альтернаріозу плодів томатів; *Fusarium oxysporum* 54201 - збудник фузаріозу плодів томатів; *F. oxysporum* п.33 - збудник кореневої гнилі гороху; *Nigrospora oryzae* 16864 - збудник нігроспоріозу кукурудзи.

Антагоністична активність заявленого штаму *Streptomyces violaceus* 1МВ Ас-5027 стосовно фармакопейних культур с представленою у Таблиці 3. Антагоністична активність запропонованого штаму стосовно фітопатогенних мікроорганізмів та грибів представлена у Таблиці 4.

Таблица 3

Антагоністична активність штаму *Streptomyces violaceus* ІМБ Ас-5027 стосовно фармакопейних культур мікроорганізмів

Культура стрептоміцету	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 violaceus</i> ІМБ Ас-5027	23,5	26,5	40,5	32	0	33

Таблиця 4

Антагоністична активність штаму *Streptomyces violarius*
IMB Ас-5027 стосовно фітопатогенних бактерій та грибів

Фітопатогенні бактерії та гриби	Зони відсутності росту тест-культур, мм
<i>Pseudomonas syringae</i> B-1027	o/o
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> B-1015	0/38
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> B-1016	0/14
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> B-1154	-*
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9060	28/0
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571 (соє)	0/0
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> B-I 019	38/0
<i>P. corrugata</i> 9070	0/0
<i>Xanthomonas visicatoriae</i> 7790	12/14
<i>X. translucens</i> 7696	20/0
<i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> B-1162	22/16
<i>X. anoxopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8609	28/0
<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> 102	14/-
<i>Pantoea agglomerans</i> 8490	18/12
<i>Alternaria alternate</i> 16814	21/-
<i>Fusarium oxysporum</i> 54201	17/-
<i>F. oxysporum</i> n.33	15/-
<i>Nigrospora oryzae</i> 16864	18/12

Примітка: *«-» - не визначали.

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

Приклад 2

Визначення в системах *in vitro* нематоцидної активності проводили на основі вивчення здатності штаму пригнічувати рухливість нематод у водних розчинах. У досліджах використовували нематоди роду *Meloidogune*, які викликають захворювання кореневої системи рослин мелойдогіноз. Живий матеріал отримували з яйцевих мішків, оскільки з яєць з'являються личинки II віку, які однорідні за віком та розміром. Для цього в тепличних умовах вирощували рослини томатів нестійкого до нематод сорту, потім проводили їх зараження личинками галових нематод. Через 40 днів вегетації рослини викопували, а з галів, які утворились на коренях, вилучали яйцеві мішки та отримували живі личинки нематод.

Нематоди в кількості 10-20 особин розміщували у комірках мікропланшету, де їх культивували у 100 мкл дистильованої води в присутності етанольних екстрактів біомаси штаму *Streptomyces violarius* IMB Ас-5027 протягом 0,5-24 годин при 28±1 °С. Дослід проводили в чотирьохкратній повторності.

Через 0,5; 1; 2; 3; 4 та 24 години культивування визначали під мікроскопом:

- загальну кількість нематод А;
- кількість активно рухомих нематод В;
- кількість напіврухомих нематод С;
- кількість нерухомих нематод D.

Величину показника нематоцидної активності оцінювали за відсотком загибелі нематод, який вираховували за формулою

$$1 - \frac{B + (C \times 0,5) + (D \times 0)}{A} \times 100\% \quad (1)$$

Дані щодо нематоцидної ефективності штаму *Streptomyces violarius* IMB Ас-5027 представлені у Таблиці 5.

Таблиця 5

Нематоцидна активність запропонованого штаму у порівнянні із препаратом "Аверком"

Варіант	% загибелі нематод при різній тривалості інкубації					
	0,5 год.	1 год.	2 год.	3 год.	4 год.	24 год.
Аверком	83	95	100	100	100	100
<i>Streptomyces violarius</i> IMB Ac-5027	59	67	58	85	81	100

- 5 Таким чином, запропонований новий штам *Streptomyces violarius* IMB Ac-5027 виявляє виражену комбіновану активність стосовно широкого спектру фітопатогенних мікроорганізмів, а також нематод, що являє собою значну перевагу у порівнянні із відомими технічними рішеннями.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 10 Штам *Streptomyces violarius* IMB Ac-5027, який має комбіновану антагоністичну активність стосовно фітопатогенних мікроорганізмів та нематод.

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