



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13772 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A01P 13/00  
C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ "ФРУКТОСПОРИН ФІЛД"

1

(21) u200510033

(22) 25.10.2005

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

(72) Лапа Світлана Володимирівна, Лапа Олександр Михайлович, Дрозда Валентин Федорович

(73) Лапа Світлана Володимирівна, Лапа Олександр Михайлович, Дрозда Валентин Федорович

(57) 1. Препарат для захисту рослин від збудників хвороб, що містить штам бактерії *Bacillus subtilis*,

2

який відрізняється тим, що як основний інгредієнт препарат містить біомасу бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7099, а як наповнювач містить лактозу в кількості 5 мас. %.

2. Препарат за п. 1, який відрізняється тим, що як наповнювач містить молоко в кількості 6 мас. %.

3. Препарат за п. 1, який відрізняється тим, що як наповнювач містить сироватку крові великої рогатої худоби в кількості від 2...8 мас. %.

Корисна модель відноситься до галузі сільськогосподарства і стосується використання бактеріальних препаратів для захисту рослин від збудників хвороб.

Відомо, що від 35 до 75% урожаю сільськогосподарських культур втрачається від фітопатогенних грибів та бактерій. Для захисту цих культур рекомендований до використання широкий асортимент препаратів хімічної природи [Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. - К.: Юнівест маркетинг, 2004. - 348 с.]. Але такі культури, як суниця, виноград вражаються в період росту ягід та їх дозрівання, коли застосування традиційних засобів захисту (хімічних препаратів) значно обмежено у зв'язку з необхідністю тривалого періоду очікування після обприскування. Крім того, значна кількість вирощеної продукції йде на споживання у свіжому вигляді, в зв'язку з чим вимоги до чистоти продукції значно зростають.

Відомий штам бактерії *Bacillus subtilis* ЦМГМ В-2895, для отримання препарату проти збудника сірої гнилі суниці, який рекомендується для обмеження поширення та шкідливості збудника сірої гнилі суниці - *Botrytis cinerea*. [Див. Патент України №12939, Лапа О.М., Резнік С.Р., Лапа С.В. А01N63/00, C12N1/20. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання препарату проти збудника сірої гнилі. Заявлено 25.09.1989. Опубл. 28.02.1997. Бюл. №1. - 6 с.], який є найбільш близьким технічним рішенням та вибраний в якості прототипу.

Недоліком являється те, що він використовується як:

1. Ліофільно висушена маса спороутворюючих бактерій, яка недостатньо однорідно розчиняється у воді.

2. Робоча суспензія препарату, яка призначена для обприскування рослин, досить легко седиментується, внаслідок чого рослини не рівномірно покриваються препаратом.

3. Відсутність прилипачів, змочувачів, антиоксидантів є наслідком недостатньої фізичної та біологічної стабільності препарату та незначного його контакту з рослинами.

В основу корисної моделі поставлено завдання створити препарат для захисту рослин від збудників хвороб біологічного походження, екологічно безпечний, з широким спектром антифунгальної та антибактеріальної дії.

Поставлене завдання досягається тим, що препарат для захисту рослин від збудників хвороб "Фруктоспорин Філд", що містить штам бактерії *Bacillus subtilis*, згідно корисної моделі в якості основного інгредієнта препарат містить біомасу бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7099, в якості наповнювача містить лактозу в кількості 5 мас. %; в якості наповнювача містить молоко в кількості 6 мас.%; в якості наповнювача містить сироватку крові великої рогатої худоби в кількості від 2...8 мас.%.

У склад композиції вводять діючу субстанцію препарату Фруктоспорин Філд - *Bacillus subtilis* IMB B-7099 - спороутворюючу бактерію та наповнювачі, за наступними технологічними елементами: нарощування біомаси на живильних середовищах, приготування препарату, ліофільне висушування та розфасовка. У підсумку отримуємо препарат Фруктоспорин Філд біологічного походження, еко-

(13) U

(11) 13772

(19) UA

логічно безпечний, з широким спектром антифунгальної та антибактеріальної дії, діючою речовиною якого є активний штам бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з одним із наповнювачів: лактоза - 5 мас.%; молоко в кількості 6 мас.%; сироватка крові великої рогатої худоби - 2...8 мас.%. Для препарату властива комплексна антимікробна дія по відношенню до комплексу збудників хвороб бактеріальної та грибної природи, котрі уражують культурні рослини. Штам цієї бактерії, відібраний в результаті попереднього скринінгу значної колекції мікроорганізмів, зокрема представників роду *Bacillus*, з тестовою оцінкою на антагоністичну активність відносно фітопатогенних бактерій та грибів, котрі уражують культурні, переважно зернові та зернобобові культури. Штам бактерії - основний інгредієнт препарату Фруктоспорин Філд, характеризується продукуванням комплексу біологічно активних речовин [Рева О.Н. Поиск продуцентов новых полипептидных антибиотиков среди штаммов *Bacillus* методом генетического типирования // Микробиол. журн. 2005. Т. 67. - №6. - С. 25-27]. Штам *Bacillus subtilis* депоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером IMB B-7100.

В процесі експериментального обґрунтування придатності препарату Фруктоспорин Філд для захисту рослин від збудників хвороб, було проведено дослідження, що штам *Bacillus subtilis* IMB B-7099 - грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу.

На МПА, сусло-агарі, середовищі Громико, картопляному агарі відмічено значний ріст. На МПА утворює складчасті колонії в'язкої консистенції, бежевого кольору, краї неправильної форми. В мазках з колоній, які виросли на МПА через 18 годин можна побачити прямі паличкоподібні клітини 2,3x1,0мкм, які розташовані поодинокі, зрідка ланцюгом. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються.

При культивуванні штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7099 на агаризованому картопляному агарі утворюються колонії світло-бежевого кольору, блискучі, в'язкої консистенції, краї рівні. На середовищі Громико - колонії бежевого кольору, складчасті, з підвищенням центром, краї зрізані, консистенція в'язка. На м'ясо-пептонному бульйоні культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, манніт, ксиліозу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогеса-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, росте на поживному середовищі з вмістом 7% NaCl, утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах і при 10% NaCl, не утворює газ з NO<sub>3</sub> в анаеробних умовах.

Приклад 1. Технологічний процес виготовлення дослідних серій препарату Фруктоспорин Філд складається з наступних етапів:

Допоміжна робота:

- підготовка посуду (миття, стерилізація);
- підготовка розчину для технології (0,85% хлориду натрію, наповнювача);
- стерилізація посуду і матеріалів;
- приготування поживних середовищ (агаризо-

ване сусло, м'ясо-пептонний агар, середовище Громико, середовище Гаузе) і дезінфікуючих розчинів (перекис водню в суміші з мийними засобами, хлорамін 4% розчин з активатором - 10% розчином нашатирного спирту, 70% етиловий спирт);

- стерилізація поживних середовищ;
- підготовка приміщень для асептичних робіт.

Підготовка штаму бактерії:

- розчинення ампули ліофілізованої культури бацили 0,85% NaCl;
- посів мікроба на поживне середовище Громико в пробірки зі скошеним агаром;
- пересів на середовище Громико в чашки Петрі через 18-22 год;
- відбір типових колоній через 18-20 год;
- красіння по Граму;
- відсів культури на поживне середовище в пробірки зі скошеним агаром на 18-22 год.

Приготування маточної суміші мікроба:

- змив мікроба з пробірок зі скошеним агаризованим поживним середовищем і визначення концентрації (титру);
- розведення змиву мікроба 0,85% NaCl до 1-3млрд/мл.

Отримання біомаси:

- засівання мікробіологічних матраців "маточною" сумішшю мікроба;
  - розміщення матраців в термальну кімнату (Т 37°C на 7 діб для вирощування спор);
  - контроль на мікробну чистоту;
  - змивання бактеріальної маси.
- Приготування препарату:
- визначення концентрації (титру) мікроба в 1 мл біомаси;
  - розчинення біомаси фізіологічним розчином (у разі якщо вміст мікроорганізмів в 1мл перевищує 100млрд. кл. за оптичним стандартом мутності);

- додавання наповнювача;
- розливання біомаси в лабораторний посуд.

Ліофілізація препарату:

- заморожування;
- ліофільне сушіння;
- закупорювання посуду з препаратом.

Контроль виготовленого препарату здійснюють за:

- зовнішнім виглядом, кольором і запахом;
- бактеріальною чистотою, яку проводили методом розсіву розведеного в фізіологічному розчині ліофілізованого препарату на агаризовані живильні середовища: МПА - для росту бацил; Ендо - для росту бактерій кишкової групи; середовище Сабуро - для росту грибів; середовище з сечовиною - для росту бактерій роду *Proteus*; жовтково-сольовий агар Чистовича - для росту стафілококів. Як показали результати бактеріологічних посівів, приготувані дослідні серії біопрепарату відповідали вимогам та не були забруднені сторонньою мікрофлорою;
- безпечністю для теплокровних;
- специфічною активністю.

Технологічний процес виробництва завершується фасуванням препарату.

На основі штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з типовими морфологічними, культуральними, біо-

хімічними властивостями приготували п'ять варіантів препарату Фруктоспорин Філд з різним вмістом мікробних клітин та наповнювача у складі препарату.

Варіант 1. Препарат Фруктоспорин Філд, який містить, мас %:

Біомаса *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з титром  $5,0 \times 10^9$  КУО/мл - 95%;  
Наповнювач (лактоза) - 5%.

Варіант 2. Препарат Фруктоспорин Філд, який містить, мас %:

Біомаса *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з титром  $1,0 \times 10^9$  КУО/мл - 94%;  
Наповнювач (молоко) - 6%.

Варіант 3. Препарат Фруктоспорин Філд, який містить, мас %:

Біомаса *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з титром  $0,5 \times 10^9$  КУО/мл - 92%;  
Наповнювач (сироватка крові ВРХ) - 8%.

Варіант 4. Препарат Фруктоспорин Філд, який містить, мас %:

Біомаса *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з титром  $1,0 \times 10^9$  КУО/мл - 97%;  
Наповнювач (сироватка крові ВРХ) 3%.

Варіант 5. Препарат Фруктоспорин Філд, який містить, мас %:

Біомаса *Bacillus subtilis* IMB B-7099 з титром  $5,0 \times 10^{10}$  КУО/мл - 98%;  
Наповнювач (сироватка крові ВРХ) - 2%.

Приклад 2. Експериментально в лабораторних умовах визначали позитивний результат впливу препарату Фруктоспорин Філд щодо тест-культур - збудників хвороб сільськогосподарських культур. Дослідження проводили методом відстроченого антагонізму за методом Єгорова [Егоров В.С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Высш. шк., 1986. - 448 с.]. Для цього вміст однієї ампули розчиняли в 1мл фізіологічного розчину. Отриману суміш висівали петлею в центр чашки Петрі з агаризованим середовищем Гаузе №2 (для вивчення активності щодо бактеріальних тест-культур) і на картопляний агар (для дослідження антагоністичної активності щодо тест-культур грибів). Посіви інкубували в термостаті при 28°C протягом 72 год. До культури, яка виросла, підсівали штрихом тест-мікроорганізми (500 млн. суспензії добових культур бактерій і суспензії грибних спор в фізіологічному розчині). Чашки з тест-культурами бактерій інкубували в термостаті при 37°C протягом 18 год., з грибними тест-культурами при 28°C протягом 5 діб. Облік результатів проводили за величиною зон затримки росту тест-культур. Контролем росту тест-культур слугувало паралельне вирощування їх на чашках з агаризованим середовищем Гаузе №2 і картопляним без культури-антагоніста. Отримані результати досліджень представлені в табл. 1, 2, 3.

Як показали досліди, оптимальна кількість мікробних клітин *Bacillus subtilis* IMB B-7099 в 1мл фізіологічного розчину складає  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  КУО/мл (об'ємний вміст 92-98%). Застосування кількості мікробних клітин *Bacillus subtilis* IMB B-7099 в 1мл фізіологічного розчину  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  КУО/мл (об'ємний вміст 92-98%) значно знижувало ефективність дії проти основних фітопатогенних

організмів в польових дослідах, а кількість мікробних клітин *Bacillus subtilis* IMB B-7099 в 1мл фізіологічного розчину  $1 \times 10^{11}$ - $1 \times 10^{12}$  КУО/мл (об'ємний вміст 92-98%), суттєво не підвищували ефективність дії робочої рідини.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, штам *Bacillus subtilis* IMB B-7099 характеризується специфічною антагоністичною активністю щодо культур фітопатогенних мікроорганізмів, збудників хвороб сільськогосподарських рослин, зокрема до фітопатогенних грибів р. *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Colletotrichum* та бактерій: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*.

Приклад 3. Для встановлення ефективності застосування препарату Фруктоспорин Філд в польових умовах дослідження проводили на дослідному полі Інституту садівництва УААН в 2003-2005 рр. Сорти суниці Зенга-Зенгана та Коралова 100. Повторність дослідів 4-х кратна. Обприскували рослини суниці до цвітіння та фазу дозрівання плодів суспензією препарату Фруктоспорин Філд з титром 5 млрд.кл/мл з нормою витрати робочої рідини 500-600л/га. Результати представлено в табл. 1.

Отримані результати порівнювали з прототипом - фунгіцидом Еупарен М, 50% з.п. Обприскували рослини препаратом з нормою витрати 2,0кг/га.

Приклад 4. Експериментально обґрунтовували дієвість та позитивний вплив препарату Фруктоспорин Філд на розвиток сірої гнилі винограду в умовах Агрофірми "Білозерський", Білозерського району, Херсонської області. Сорт Молдова. Для отримання статистично вірогідних показників, дослід проводили в 4-х кратній повторності. Результати експертної оцінки засобу наведено у таблиці 2.

Встановлено, що біологічний препарат Фруктоспорин Філд застосовується шляхом обприскування рослин ( $1 \times 10^9$  клітин та спор у 1мл води). Очевидні його переваги перед існуючими препаратами, зокрема прототипом. За тестовими показниками запропонований препарат Фруктоспорин Філд перевищував прототип. Відзначається він і технологічністю виконання та екологічністю усіх операцій, що вигідно виділяє його від відомих препаратів

Приклад 5. Експериментально в лабораторних умовах визначали токсикологічні характеристики (вірулентність, токсичність, токсигенність) препарату Фруктоспорин Філд відносно теплокровних тварин (миші). В результаті досліджень встановлено, що препарат не вірулентний, не токсичний, не токсигенний для тварин та не виявляє негативної дії на корисні організми біоценозу.

Приклад 6. Обґрунтування дієвості препарату Фруктоспорин Філд та величини отриманого позитивного результату внаслідок його використання для захисту посівів гречки від сірої гнилі. Дослідження проводились на двох сортах: Крупинка та Українка, у польовому експерименті впродовж 2003-2004 років. У загальному масиві посівів формувались варіанти дослідів площею не менше 0,5га у трьохкратній повторності. Проведено одне обприскування рослин препаратом в період початку прояву збудника сірої гнилі, з розрахунку  $1 \times 10^9$

клітин та спор основного інгредієнту препарату - штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7099 у 1мл води. Вміст наповнювача лактози в кількості 5 мас.%. Погодні умови сприяли появі збудника сірої гнилі.

Результати дослідів наведені в таблиці показують, що на рівні статистичної вірогідності запропонований препарат Фруктоспорин Філд перевищує результат прототипу (табл. 4).

Приклад 7. Посіви насінневого люпину, сорт Кастричник. Умови досліджень аналогічні тим, що

описані у прикладі 6. Встановлено виражений показник позитивного результату внаслідок використання препарату Фруктоспорин Філд у порівнянні з прототипом.

Таким чином, препарат Фруктоспорин Філд, у запропонованому способі, суттєво переважає за величиною позитивного результату по відношенню до збудника сірої гнилі на багатьох сільськогосподарських культурах.

Таблиця 1

Експертна оцінка антагоністичної активності препарату Фруктоспорин Філд для захисту суниці від сірої гнилі (Дослідне поле Інституту садівництва УААН, 2004-2005 рр.)

Способи, що оцінюються	Уражено ягід, 2004 р., %	Уражено ягід, 2005 р., %	Середнє за 2 роки	Біологічна ефективність, %
Сорт Зенга-Зенгана				
Фруктоспорин Філд (спосіб, що пропонується)	7,0	2,4	4,7	75,8
Спосіб - прототип	11,9	7,8	9,9	49,2
Еупарен, 50% з.п., 2кг/га	5,4	4,0	4,7	76,0
Контроль	15,7	30,1	22,9	-
HIP <sub>05</sub>	2,6	3,5	2,4	-
Сорт Коралова 100				
Фруктоспорин Філд (спосіб, що пропонується)	3,7	3,6	3,7	82,3
Спосіб - прототип	2,9	4,8	3,9	80,3
Еупарен, 50% з.п., 2кг/га	3,3	3,4	3,3	84,5
Контроль	25,2	17,2	21,2	-
HIP <sub>05</sub>	2,4	1,6	2,6	-

Таблиця 2

Експертна оцінка величин позитивного результату внаслідок використання препарату Фруктоспорин Філд для захисту винограду від сірої гнилі (Агрофірма "Білозерський", Білозерський р-н., Херсонської обл., 2004-2005 рр.)

Способи, що оцінюються	Уражено сірою гниллю, %	Розвиток хвороби, %	Біологічна активність, %
Фруктоспорин Філд (спосіб, що пропонується)	9,2	8,2	80,6
Спосіб-прототип	19,2	16,3	62,7
Еупарен, 50% з.п., 2кг/га	18,8	53,2	74,4
Контроль	68,7	-	-
HIP <sub>05</sub>	-	2,6	-

Таблиця 3

Експертна оцінка величин позитивного результату внаслідок використання препарату Фруктоспорин Філд для захисту гречки від сірої гнилі та супутніх збудників хвороб

Способи, що оцінюються	Сорт "Крупинка"			Сорт "Українка"		
	ураження хворобами, %	розвиток хвороб, %	урожай, ц/га	ураження хворобами, %	розвиток хвороб, %	урожай, ц/га
Фруктоспорин Філд (спосіб, що пропонується)	4,7	3,9	24,1	4,1	2,8	25,2
Спосіб-прототип	8,9	7,2	21,6	12,8	11,2	23,4
Контроль	28,6	22,9	17,1	30,5	28,2	18,2
HIP <sub>05</sub>	-	-	2,4	-	-	1,9

Таблиця 4

Експертна оцінка величин позитивного результату внаслідок використання препарату Фруктоспорин  
Філд для захисту люпину жовтого від сірої гнилі та супутніх збудників хвороб

Способи, що оцінюються	Ураження хворобами при зберіганні врожаю, %		
	Ураження	Розвиток хвороби	Урожай, ц/га
Фруктоспорин Філд (спосіб, що пропонується)	7,3	4,9	11,6
Спосіб-прототип	1,2	6,4	9,7
Контроль	28,5	12,2	8,9
HIP <sub>05</sub>	-	-	1,2