



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **56363** (13) **U**
(51) МПК
A01N 63/02 (2011.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ БОРОТЬБИ З БАКТЕРІАЛЬНИМ РАКОМ ВІНОГРАДУ**

1

2

(21) u201008256

(22) 02.07.2010

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) ІВАНИЦЯ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСІЙОВИЧ, ТО-
ВКАЧ ФЕДІР ІВАНОВИЧ, ЛІМАНСЬКА НАТАЛІЯ
ВІКТОРІВНА, СЕРГЄЄВА ЖАННА ЮРІЇВНА, ГАВ-
РИК АЛЛА ГРИГОРІВНА(73) ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА(57) Спосіб отримання біологічного препарату для
боротьби з бактеріальним раком винограду, який
включає вирощування клітин штаму агробактерій

на живильному середовищі LB, а потім клітини осаджують центрифугуванням та надосадову рідину використовують для пригнічення збудників бактеріального раку, який **відрізняється** тим, що живильне середовище включає компоненти у кількостях, які сприяють кращому росту агробактерій (пептон 15 г, дріжджовий екстракт 10 г, NaCl - 5 г), культивування проводять протягом 48 годин для накопичення достатньої кількості бактеріоцинів для отримання біологічного препарату, а як продуценти використовують лише штами агробактерій, виділені з винограду.

Корисна модель відноситься до способів боротьби з фітопатогенами і може використовуватися для пригнічення росту та знищення збудників бактеріального раку винограду - фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium vitis*.

Даний спосіб відноситься до способів біологічного контролю захворювань рослин і може використовуватися у сільському господарстві - у розсадницьких комплексах і лабораторіях мікроклонального розмноження винограду.

Бактеріальний рак дводольних рослин інфікує велику кількість економічно важливих видів. Культурою, яка найбільш вражається цією хворобою, є виноград.

Бактеріальний рак поширений як в Україні, так і у інших країнах культивування винограду, де він спричиняє значні збитки врожаю. Одним із найперспективніших напрямків захисту рослин є використання бактеріальних штамів з антагоністичними властивостями проти фітопатогенів. На відміну від застосування хімічних речовин, використання штамів-антагоністів не порушує балансу в біоценозі.

Особливе значення даний спосіб боротьби з фітопатогенами має для молодих рослин, отриманих шляхом вегетативного розмноження. Оскільки захворювання бактеріальний рак передається через інструменти, якими обрізували хворі рослини, та через ґрунт із контамінованих патогенами ділянок, необхідним є попередження інфікування мо-

лодих здорових рослин при переносі із розсадника у ґрунт.

Збудник бактеріального раку може зберігатися в залишках хворих рослин та у ґрунті на протязі 12 років і більше, інфікуючи рослини, що висаджуються на таку ділянку. Молоді рослини, особливо ті, які були отримані шляхом щеплення, містять раневі поверхні, які приваблюють патогенні агробактерії. Крім того, поранення органів, особливо коріння, може відбуватися при пересадженні рослин.

Фенольні та полісахаридні сполуки з пораних рослинних тканин діють на агробактерії як аттрактанти. З цієї причини доцільним є застосування пропонуємого способу для боротьби з агробактеріями під час пересадження молодих рослин з метою запобігання колонізації фітопатогенами раневих поверхонь.

До ефективних біологічних засобів боротьби з фітопатогенними бактеріями відносяться бактеріоцини.

Бактеріоцини, які у випадку агробактерій називаються агроцинами, - це сполуки, задіяні у міжштамовому антагонізмі і здатні пригнічувати ріст та розмноження виключно близькоспоріднених бактерій. Отже, ці антагоністичні бактеріальні речовини не порушують рівноваги в еконішах рослинних тканин.

Досягнутий рівень в захисті рослин за участю біологічних препаратів на основі бактеріоцинів характеризується способами, описаними у наступ-

(13) **U**
(11) **56363**
(19) **UA**

них джерелах.

Відомий спосіб боротьби з патогенними агробактеріями за допомогою речовин штама *Agrobacterium vitis* F2/5, описаний в Burr T.J., Reid C.L., Tagliati E., Bazzi C., Sule S. Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells // *Phytopathol.* - 1997. - Vol. 87. - P. 706-711. Даний штам є дуже дієвим щодо пригнічення розвитку бактеріального раку на винограді, але його вплив на рослину супроводжується формуванням некрозів, внаслідок чого розвиток хвороби припиняється. Утворення некрозів є небажаним для молодих рослин, які підлягають пересаджуванню, а також для щеплених рослин.

Відомий спосіб боротьби зі збудниками бактеріального раку на основі штаму *A. radiobacter* K84, описаний Kerr A., Panagopoulos C.G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control // *Phytopath.Z.* - 1977. - Vol. 70. - P. 172-179, але цей штам не може використовуватися на винограді, оскільки не є антагоністом по відношенню до штамів, які уражують саме виноград. Агроцин K84, отриманий з цього штаму, широко застосовується для пригнічення бактеріального раку на інших дводольних рослинах.

Відомий спосіб отримання бактеріоцину зі штаму *Agrobacterium vitis* E26, описаний Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // *Plant Pathol.* - 2003. - Vol. 52. - P. 134-139, що дозволяє пригнічувати розвиток пухлин на винограді. Спосіб полягає у тому, що клітини штаму культивують деякий час у рідкому живильному середовищі, а потім у певній фазі росту осаджують центрифугуванням і надосадову рідину використовують для пригнічення патогенних штамів.

Недоліками цього способу є задовгий термін культивування для отримання бактеріоцину - 72 години, і необхідність використання складного живильного середовища складом: глюкоза - 5 г, глутамат натрію - 5 г, K_2HPO_4 - 3 г, NaH_2PO_4 - 1 г, NaCl - 1 г, KCl - 0,15 г, $CaCl_2$ - 0,01 г, $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 2,5 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,3 г, дріжджовий екстракт - 5 г, гідролізат казеїну - 5 г, набір амінокислот (виробництво «Difco») - 5 г. При виробництві великих кількостей бактеріоцинів застосування деяких компонентів даного живильного середовища є економічно не вигідним.

Відомий спосіб отримання агроцину D286 зі штамом *A. tumefaciens* D286, описаний в Henderson M., Askjaer L., Thomson J.A., Montagu van M. Broad-host-range agrocin of *Agrobacterium tumefaciens* // *Appl. Environm. Microbiol.* - 1983. - Vol. 45, № 5. - P. 1526-1532 (прототип). Спосіб полягає в тому, що клітини штаму-продуцента, виділеного з рослини евкаліпту, вирощують на живильному середовищі LB складом пептон - 10 г, дріжджовий екстракт - 5 г, NaCl - 10 г, і найбільша кількість бактеріоцину накопичується на 12-й годині культивування. Клітини у даній фазі росту осаджують центрифугуванням та надосадову рідину використовують для пригнічення патогенних штамів.

Недоліком відомого способу є те, що після максимального виходу бактеріоцинів (12-та година культивування) їх активність швидко зменшується при подальшому культивуванні. Через це не встигає накопичуватися кількість бактеріальних клітин, достатня для отримання необхідної кількості активного бактеріоцину. Крім того, агроцин, що виділяється штамом *A. tumefaciens* D286, не пригнічує патогенні агробактерії, виділені з винограду, і тому не може бути застосованим для захисту винограду.

Розробка нового більш ефективного способу проводилась кафедрою мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за держзамовленням Міністерства освіти і науки України (№ НУ/448 - 2009 від 06.07.2009).

Задача, на вирішення якої спрямована пропонуєма корисна модель: створити більш ефективний спосіб отримання біологічного препарату для боротьби зі збудниками бактеріального раку, який полягає в тому, щоб запобігти некрозам, підібрати термін культивування, який би дозволяв отримати достатню кількість бактеріоцину, активність якого не зменшувалась би, і в той самий час термін культивування не був би занадто довгим, підібрати середовище, на якому би виростала більша кількість агробактерій, і отриманий біологічний препарат був би дієвим проти захворювання саме на винограді.

Ця задача вирішується способом, який полягає в тому, що клітини штаму агробактерій вирощують на живильному середовищі LB, а потім клітини осаджують центрифугуванням та надосадову рідину використовують для пригнічення збудників бактеріального раку, згідно корисної моделі, що живильне середовище містить компоненти у кількостях, які сприяють кращому росту агробактерій (пептон - 15 г, дріжджовий екстракт - 10 г, NaCl - 5 г), культивування проводять на протязі 48 годин для накопичення достатньої кількості бактеріоцинів для отримання біологічного препарату, а у якості продуцентів використовують лише штам агробактерій, виділені з винограду.

Використання у якості продуцентів штамів агробактерій, виділених саме з винограду, а не з інших рослин, підвищує здатність препарату специфічно пригнічувати збудників бактеріального раку винограду, оскільки такі штам-продуценти мають високий потенціал до конкуренції з іншими штамми, що населяють таку саму еконішу. Культивування штамів-продуцентів, виділених з винограду, на протязі 48 годин дозволяє отримати достатню кількість клітин, кожна з яких слугує джерелом бактеріоцину, та накопичити стабільні бактеріоцини, активність яких не зменшується на протязі такого терміну.

Загальними ознаками найближчого аналога і пропонуємого способу є те, що у якості штамів-продуцентів використовують агробактерії, які культивують на рідкому живильному середовищі, а потім клітини осаджують центрифугуванням та надосадову рідину використовують як джерело бактеріоцинів.

Відмінними ознаками пропонуємого способу

від найближчого аналога є те, що агробактерії, призначені для отримання біологічного препарату, виділяють лише з рослин винограду, а штамми-продуценти бактеріоцинів культивують на середовищі LB пропонуємого складу, а саме - пептон - 15 г, дріжджовий екстракт - 10 г, NaCl - 5 г, і час культивування складає 48 годин.

Пропонуємий спосіб застосовують наступним чином: штамми-продуценти бактеріоцинів, виділені з винограду, культивують на пропонуємому середовищі LB (пептон - 15 г, дріжджовий екстракт - 10 г, NaCl - 5 г) на протязі 48 годин, після чого клітини осаджують центрифугуванням (12 000 об/хв, 10 хвилин) і відбирають надосадову рідину, яка містить бактеріоцини. Чутливість бактерії-збудника бактеріального раку до дії бактеріоцину перевіря-

ють шляхом нанесення надосадової рідини на щойно засіяний "газон" культури, що тестується. Результат дії біологічного препарату бактеріоцину оцінюють після інкубації чашок Петрі з посівами при 28°C на протязі 24 годин. Вимірюють діаметр зони пригнічення росту тестованої культури та роблять висновок щодо її чутливості та ефективності дії бактеріоцинів.

Ефективність пропонуємого способу підтверджується дослідженнями, результати яких наведено у таблицях 1, 2, 3.

Порівнювали ріст бактерій ендоефітної мікробіоти здерев'янілих пагонів винограду на живильному середовищі LB звичайного та пропонуємого складів. Результати досліджень наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Ріст бактерій ендоефітної мікробіоти здерев'янілих пагонів винограду на середовищах різного складу, КУО/г

Середовище	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4	Зразок 5
LB	$(4,1 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(4,2 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^7$
LB*	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(6,2 \pm 0,4) \cdot 10^8$	$(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(4,6 \pm 0,2) \cdot 10^8$

Примітка: * - середовище пропонуємого складу

Як видно з наведених даних, при виділенні бактерій з тканин винограду більша кількість представників мікробіоти виростили на середовищі LB пропонуємого складу, тобто ріст бактерій на ньому був значно ефективнішим.

Для наступних досліджень використовували пропонуєме середовище LB, оскільки його використання дозволяє отримати більшу кількість бактерій.

Перевіряли перехресну дію бактеріоцинів штамів агробактерій, виділених з винограду (*Agrobacterium* sp. 15, 5, 6, 8, 14), і референтного

штаму *A. tumefaciens* C58, виділеного з вишні. Даний штам є добре вивченим штамом агробактерій, якій застосовують як контрольний у багатьох лабораторіях світу. Описаним способом перевіряли дію бактеріоцинів цього референтного штамів і бактеріоцинів штамів, виділених з тканин винограду у лабораторії кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. У якості штамів, які тестувалися на чутливість до бактеріоцинів, використовували штамми збудників бактеріального раку винограду. Результати наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Перехресна дія бактеріоцинів штамів, виділених з різних рослин

Номер штама-продуцента	Номер штама збудника бактеріального раку, який перевіряли на чутливість											
	9	11	13	14	5	6	8	7	1	15	C58	%
15	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	45
5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	45
C58	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	27

Примітка: "+" - наявність зони пригнічення росту; "-" - відсутність зони пригнічення росту

На прикладі наведених продуцентів видно, що бактеріоцини агробактерій, виділених з винограду, є або більш ефективними (45% чутливих штамів збудника) від бактеріоцинів відомого референтного штамів C58, виділеного з вишні. Тобто при пошуку та використанні штамів, виділених з винограду, можна досягти більшої ефективності боротьби зі збудниками бактеріального раку винограду.

Для підбору найкращого часу культивування

агробактерій з метою отримання бактеріоцинів штамми-продуценти культивували 12, 24 і 48 годин при температурі 28°C у рідкому середовищі LB зміненого складу. Після цього культуру осаджували центрифугуванням та відбирали надосадову рідину, яку наносили у об'ємі 2 мкл на "газон" чутливого штамів збудника бактеріального раку винограду (табл. 3).

Таблиця 3

Розмір зон лізису чутливого штаму *Agrobacterium* sp. 9 в залежності від часу культивування продуцентів

Штам-продуцент	12 годин	24 години	48 годин
<i>Agrobacterium</i> sp. 5K	3-4 мм	5-6 мм	7-9 мм
<i>Agrobacterium</i> sp. 7K	3-4 мм	4-5 мм	7-9 мм
<i>Agrobacterium</i> sp. 11K	1-2 мм	3-4 мм	5-7 мм
<i>Agrobacterium</i> sp. 29д	1-2 мм	5-6 мм	7-9 мм

Культивування на протязі 48 годин призвело до більш потужного виходу бактеріоцинів, про що свідчила наявність більших та чіткіших зон лізису на газоні тест-культури.

У зв'язку з цим для подальшого отримання бактеріоцинів використовували 48-годинну культуру агробактерій даних штамів.

Таким чином встановлено, що пропонуємий спосіб з подовженням терміном інкубації штамів-продуцентів, зміненням складом живильного середовища та використанням агробактерій, виділених з винограду, є більш ефективним, ніж у прототипі, способом боротьби з бактеріальним раком винограду.

Приклад

У якості штамів-продуцентів використовували три штами агробактерій, виділені з рослин винограду півдня України (*Agrobacterium* sp. 29, *Agrobacterium* sp. 7, *Agrobacterium* sp. 11). Біологічний препарат бактеріоцинів отримували запропонованим способом: штамми-продуценти культивували на пропонуємому середовищі LB (пептон - 15 г, дріжджовий екстракт - 10 г, NaCl - 5 г) протягом 48 годин у термостаті TC-80M-2, після чого клітини осаджували 10 хв. на центрифугі SIGMA 3-30K (12 000 об./хв.) і відбирали надосадову рідину, яка містила бактеріоцини.

На тест-рослинах за допомогою скальпеля робили штучні поранення для імітації процесів, які можуть відбуватися при отриманні садивного матеріалу в умовах виробництва. На місця поранень наносили біологічний препарат бактеріоцинів, отриманий пропонуємым способом. Після цього місця поранень заражали суспензією культури штаму збудника бактеріального раку винограду. На поранені частини рослин поміщали зволожену вату і обгортали їх парафільмом для імітації умов, сприятливих для розвитку бактеріального раку винограду.

Усі зараження проводили у трьох повторностях. Таким самим чином заражали контрольні тест-рослини, які не оброблялись бактеріоцинами (позитивні контролю).

Через 21 день після зараження проводили облік результатів, для чого враховували наявність пухлин та вимірювали їх розміри. Ефективність дії бактеріоцинів враховували як відсотки здорової рослинної тканини у порівнянні з пухлинною у позитивному контролі, зараженому збудником і не обробленому бактеріоцинами, в якому розміри пухлини становили 3,5 x 5,5 x 20,0 мм.

Результати випробовування біологічного препарату, отриманого пропонуємым способом, наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Випробування біологічного препарату бактеріоцинів, отриманих пропонуємым способом, на рослинах

Штам-продуцент	Розміри пухлин, мм (висота, ширина, довжина)	Ефективність дії бактеріоцинів, %
не застосовувався	3,5 x 5,5 x 20,0	-
<i>Agrobacterium</i> sp. 11	1,1 x 1,1 x 1,0	96-98%
<i>Agrobacterium</i> sp. 7	2,1 x 1,0 x 1,1	94-95%
<i>Agrobacterium</i> sp. 29	2,0 x 1,5 x 1,0	94-95%

На рослинах, оброблених бактеріоцинами, спостерігалися лише незначні зміни у тканинах, які не можна назвати справжніми пухлинами.

З наведеного прикладу видно, що за використання біологічного препарату, отриманого пропонуємым способом, спостерігається значне пригнічення розвитку пухлиноутворення, яке становить від 94 до 98%.

Спосіб може бути рекомендованим для отримання препаратів для біологічного захисту рослин у виноградарстві, особливо на етапах отримання садивного матеріалу.

Аналізуючи сукупність відомих і відмінних ознак пропонуємого способу разом з позитивним ефектом, отриманим при його використанні, можна зробити висновок, що пропонуємий спосіб містить усі необхідні і достатні ознаки корисної моделі.

