



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90260

(13) C2

(51) МПК (2009)
C12N 1/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КУЛЬТУРАЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ТА СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ НИТЧАСТИХ ГРИБІВ

1

2

(21) a200609672

(22) 08.02.2005

(24) 26.04.2010

(86) PCT/EP2005/001262, 08.02.2005

(31) 04003036.3

(32) 11.02.2004

(33) EP

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 2010 р.

(72) ПАНШО-МІРАБЕЛЬ ЕЛІЗАБЕТ, FR/FR

(73) UREA KASALE S.A., CH

(56) WO A 8806407, 07.09.1988

McCoy C.W. ET AL: "A SIMPLIFIED MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF HIRSUTELLA THOMPSONII" JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 31, no. 1, January 1978 (1978-01), pages 137-139,
LIU X Z ET AL: "Nutritional requirements of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*" BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 12, no. 3, June 2002 (2002-06), pages 381-393,
BASTOS C N: "EFFECT OF TEMPERATURE, PH AND NUTRITION ON GROWTH AND SPORULATION OF TRICHODERMA STROMATICUM SP. NOV., AN ANTAGONIST OF COCOA WITCHES' BROOM PATHOGEN" 2000, SUMMA PHYTOPATHOLOGICA, GRUPO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, PIRACIEABA, ES, PAGE(S) 73-77 ,
CAYROL JC, DJIAN-CAPORALINO C, PANCHAUD-MATTEI E: "La lutte biologique contre les ne'matodes phytoparasitaires" LE COURRIER DE LA CELLULE ENVIRONNEMENT, [Online] no. 17, 1 August 1992,

(57) 1. Культуральне середовище для вирощування нитчастих грибів, яке містить мелясу в кількості від 60 до 65%, сахарозу в кількості від 10 до 15%, рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до набухання в кількості від 10 до 15% і дріжджовий екстракт у кількості від 10 до 15%.

2. Культуральне середовище за п. 1, яке додатково містить джерело мінерального азоту в кількості від 5 до 8%.

3. Культуральне середовище за п. 2, у якому джерело мінерального азоту являє собою вторинний кислий фосфат амонію.

4. Спосіб одержання нитчастих грибів, насамперед грибів-нематофагів, у промисловому масштабі, який полягає в тому, що здійснюють посів конідій вказаних грибів у культуральне середовище за п. 1 і витримують культуральне середовище при температурі 23-30°C протягом 5-10 днів для оцінки репродукції й росту грибів.

5. Спосіб одержання нитчастих грибів, насамперед грибів-нематофагів, у промисловому масштабі, який полягає в тому, що здійснюють посів конідій вказаних грибів у культуральне середовище за п. 1 і витримують культуральне середовище при температурі 23-30°C протягом 5-10 днів для оцінки репродукції й росту грибів, причому в культуральне середовище поступово додають у невеликих кількостях джерело мінерального азоту, переважно починаючи із четвертого дня після посіву конідій.

Даний винахід стосується галузі фітосанітарних агентів.

Зокрема, винахід стосується культурального середовища для нитчастих грибів (гіфоміцетів), більш конкретно грибів-нематофагів.

У цей час усе більш широке застосування знаходять мікроорганізми й, насамперед гриби, як фітосанітарні агенти.

У продажі вже є продукти на основі грибів, призначені для боротьби з комахами, фітопато-

генними грибами й іншими паразитами, характерними для сільськогосподарських культур.

Наприклад, у патенті US 5811092 описані агенти-нематофаги, які застосовують для боротьби з нематодами, які належать до родів *Meloidogyne*, *Heterodera* і *Ditylenchus*, які являють собою в основному штами нитчастого гриба *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

Вказані нематоди викликають серйозні захворювання, які уражають рослинність і обумовлені

(13) C2

(11) 90260

(19) UA

грибами, й наносять великий економічний збиток, що приводить до втрати 50-70% урожаю.

Застосування грибів-нематофагів як альтернативи загальноприйнятим антипаразитичним хімічним засобам (таким, наприклад, як метилбромід, трихлорнітромаметан, дихлорпропен і т.д.) для внесення в ґрунт до її обробки або карбаматів, які наносять безпосередньо на культури, дозволяє уникнути серйозних проблем, таких як необхідність стерилізації ґрунту, порушення екологічного балансу й потенційна токсичність для людини й тварин.

Таким чином, гриби-нематофаги особливо придатні для застосування в «органічному землеробстві», однак це є відносно дорогим внаслідок труднощів одержання їх у великих кількостях у промисловому масштабі.

Отже, існує необхідність у створенні більш дешевих грибів-нематофагів, які можна застосовувати в сільському господарстві.

В основу даного винаходу була покладена задача розробити культуральне середовище для нитчастих грибів і, насамперед для грибів-нематофагів, яке дає можливість одержувати такі мікроорганізми з високим виходом у промислового масштабі й протягом коротких періодів часу, що дозволяє істотно знизити вартість кінцевого продукту.

Відповідно до винаходу таку проблему вирішують за допомогою культурального середовища для нитчастих грибів, яке містить принаймні одне джерело вуглецю, вибране із групи, яка включає мелясу, солодовий екстракт і сахарозу, і принаймні одне джерело органічного азоту, вибране із групи, яка включає дріжджовий екстракт і рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до набухання.

Переважаю на частку вищевказаного принаймні одного джерела вуглецю припадає від 70 до 85мас.% сухої маси культурального середовища, а на частку вищевказаного принаймні одного джерела органічного азоту припадає від 15 до 30мас.% культурального середовища.

Культуральне середовище, запропоноване в даному винаході, може містити також джерело мінерального азоту, яке представляє собою нітрати амонію або солі. Вищевказане джерело мінерального азоту, як правило додають у культуральне середовище поступово протягом періоду росту грибів у кількості, яка становить не більше 10мас.% у перерахунку на суху масу культурального середовища й, як правило, у кількості від 5 до 8мас.%.

Переважаю до складу культурального середовища, запропонованого в даному винаході, входить солодовий екстракт у кількості від 75 до 85мас.% і дріжджовий екстракт у кількості від 15 до 25мас.% (відсотки дані, як вказано наприкінці даного опису, у вигляді мас.% у перерахунку на суху масу культурального середовища).

До складу іншого переважного культурального середовища, запропонованого у винаході, входить меляса в кількості від 60 до 65%, сахароза в кількості від 10 до 15%, рідина, отримана після замочування зерен кукурудзи до набухання в кількості від 10 до 15% і дріжджовий екстракт у кількості від

10 до 15%. Переважаю до складу такого культурального середовища входить також джерело мінерального азоту в кількості від 5 до 8%, насамперед вторинний кислий фосфат амонію.

До складу ще одного переважного культурального середовища, запропонованого у винаході, входить два джерела вуглецю, тобто солодовий екстракт у кількості від 25 до 30% і меляса в кількості від 40 до 45%, а також рідина, отримана після замочування зерен кукурудзи до набухання, у кількості від 25 до 30%.

Далі даний винахід більш докладно пояснений на прикладах варіантів здійснення винаходу, наведених з метою ілюстрації, але не обмеження його обсягу.

Перед описом прикладів автори вважають за доцільне дати деякі визначення, які стосуються компонентів культурального середовища, запропонованого у винаході.

Як джерела вуглецю застосовують солодовий екстракт і/або мелясу, і/або сахарозу.

Солодовий екстракт одержують за допомогою проростання зерен хлібних злаків (як правило, ячменю). При проростанні утворюються специфічні ферменти (амілази), які забезпечують перетворення крохмалю в цукри. До складу солодового екстракту входить мальтоза, вітаміни й багато мікроелементів у кількості, що становить приблизно 60%.

Меляса являє собою побічний продукт цукрової промисловості й знаходиться у формі коричнево-чорної в'язкої рідини, що містить воду в кількості 10%, сахарозу в кількості 35%, інші цукри в кількості 20% і попіл в кількості 15%.

Як джерела органічного азоту застосовують дріжджовий екстракт і рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до набухання.

Дріжджовий екстракт одержують шляхом аутолізу *Saccharomyces cerevisiae* і він знаходиться у формі дрібнодисперсного світло-жовтого порошку, легко розчинного у воді. Дріжджовий екстракт містить пептиди, вільні амінокислоти, пуринові й піримідинові основи, а також водорозчинні вітаміни В-групи. У дріжджовому екстракті загальний вміст азоту становить 10% і вміст α -амінового азоту становить 5%.

Рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до розбухання, одержують шляхом замочування зерен кукурудзи протягом 24-48 год при 50°C у воді, яка містить діоксид сірки. Цей реагент дозволяє руйнувати білкову сітку, яка оточує крохмальні зерна, і дає перевагу, яка полягає в запобіганні розвитку небажаних мікроорганізмів у процесі замочування. У рідині, отриманій після замочування зерен кукурудзи до набухання, загальний вміст азоту становить 7% і α -амінового азоту 1,7%, у її склад входить також цукор у кількості 5%, калій у кількості 4%, фосфор у кількості 3% і різні мінерали в кількості 17%.

При створенні винаходу тестували різні культуральні середовища, які містять різні вказані вище джерела вуглецю й азоту. Ці середовища можна розділити на наступні три класи:

клас 1: середовища, у яких основним джерелом вуглецю є солодовий екстракт;

клас 2: середовища, у яких основним джерелом вуглецю є меляса;

клас 3: середовища, у яких основним джерелом вуглецю є солодовий екстракт і меляса.

Відсотковий вміст джерела органічного азоту в середовищах, запропонованих у винаході, можна знижувати шляхом заміни частини такого джерела органічного азоту на джерело неорганічного азоту (нітрати амонію або його похідні), які поступово додають у невеликих кількостях у процесі культивування.

Таке додавання неорганічного азоту в процесі культивування забезпечує переважне постачання мікроорганізму поживними речовинами й у випадку нитчастих грибів посилення філаментів міцелію.

Заміна частини джерела органічного азоту на джерело неорганічного азоту дає також перевагу з погляду зниження вартості виробництва, оскільки джерела органічного азоту (дріжджовий екстракт і рідина, отримана після замочування зерен кукурудзи до набухання, є найбільш дорогими компонентами культурального середовища, запропонованого у винаході).

Культуральне середовище, запропоноване у винаході, особливо переважно застосовувати для одержання нитчастих грибів родини Moniliales. У наведених нижче прикладах застосовували, зокрема нитчасті гриби *Arthrotrichum conoides* Dreschsler.

Приклад 1

У цьому прикладі описане культуральне середовище класу 1.

Вирощування нитчастих грибів здійснювали в колбі Ерлена об'ємом 300мл, яка містить 150мл культурального середовища.

Середовище містило солодовий екстракт у концентрації 20г/л і дріжджовий екстракт у концентрації 4г/л і її стерилізували перед посівом конідій розглянутого гриба.

Культивування здійснювали протягом 6 днів після посіву при температурі приблизно 27°C.

На третій день із культурального середовища брали зразки для визначення вмісту сухої маси (г/л) і кількості відростків (КУО/л). Для визначення сухої маси 20мл культурального середовища піддавали фільтрації й потім сушили в печі при 100°C протягом 24год. Кількість відростків оцінювали в 1мл культурального середовища.

Узагальнення отриманих результатів дано в наведеній нижче таблиці 1.

Таблиця 1

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	6	0	0,00
3	5,26	1,505	$1,92 \times 10^8$
4	5,79	3,345	$1,30 \times 10^9$
5	6,56	5,05	$3,07 \times 10^9$
6	6,11	9,895	$4,43 \times 10^9$

Приклад 2

Тест, описаний у прикладі 1, повторювали в мініреакторі об'ємом 2л, який містить 1,2л культурального середовища, описаного в прикладі 1.

Експериментальні умови були такими ж, як і в прикладі 1, за винятком того, що збір зразків починали через один день після посіву конідій.

Використовуваний реактор являв собою круглодонний контейнер, обладнаний лопатевою мішалкою, пристроями, які нагрівають і охолоджують, пристроями для продування повітрям, а також зондами для вимірювання значення pH, концентрації O_2 і температури.

Узагальнення отриманих результатів наведено нижче в таблиці 2

Таблиця 2

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	6	0	0,00
1	5,51	1,175	$2,50 \times 10^6$
2	5,5	1,3825	$1,80 \times 10^7$
3	6,61	1,59	$8,50 \times 10^7$
4	5,4	4,03	$9,60 \times 10^8$
5	5,13	4,29	$1,27 \times 10^9$
6	5,08	5,625	$3,10 \times 10^9$
7	5,5	7,848	$6,08 \times 10^9$

У результаті після закінчення семи днів культивування одержували приблизно 8г грибів на літр культурального середовища, які містять $6,08 \times 10^9$ відростків.

Приклад 3

У даному прикладі описаний тест, проведений з культуральним середовищем, яке належить до класу 2.

Культивування нитчастих грибів здійснювали в колбах Ерлена об'ємом 300мл, які містять 150мл культурального середовища.

Середовище містило мелясу в кількості 25г/л, сахарозу в кількості 5г/л, рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до набухання в кількості 5г/л, і дріжджовий екстракт у кількості 5г/л і її стерилізували перед посівом конідій розглянутого гриба.

Культуру інкубували протягом 6 днів після посіву при температурі приблизно 27°C.

Починаючи із третього дня, брали зразки культурального середовища для визначення сухої маси (г/л) і кількості відростків (КУО/л). Для визначення сухої маси 20мл культурального середовища піддавали фільтрації й потім сушили в печі при 100°C протягом 24год. Кількість відростків оцінювали в 1мл культурального середовища.

Узагальнення отриманих результатів дано в наведеній нижче таблиці 3.

Таблиця 3

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	5,07	0	0,0
3	4,87	1,58	$3,2 \times 10^7$
4	4,20	3,82	$1,0 \times 10^8$
5	6,46	6,76	$1,0 \times 10^9$
6	6,98	9,995	$3,5 \times 10^9$

Приклад 4

Тест, описаний у прикладі 3, повторювали відповідно до методу, описаного в прикладі 2, у міні-реакторі об'ємом 2л, який містив 1,2л культурального середовища, описаного в прикладі 3. Експериментальні умови були такими ж, що й у прикладі 3, за винятком того, що збір зразків починали через один день після посіву конідій.

Узагальнення отриманих результатів наведено нижче в таблиці 4.

Таблиця 4

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	5,07	0	0,00
1	5,04	2,675	$9,90 \times 10^7$
2	5,01	3,9	$3,00 \times 10^8$
3	5,44	5,125	$5,00 \times 10^8$
4	6,11	8,295	$8,20 \times 10^8$
5	6,69	2,75	$1,07 \times 10^9$
6	7,32	3,485	$2,10 \times 10^9$
7	7,65	10,164	$3,77 \times 10^9$

Результати, наведені для періоду часу після п'ятого дня, можуть здатися аномальними, однак вони обумовлені лише надлишковою концентрацією грибів у культуральному середовищі, що не дозволяло далі відбирати гомогенні зразки.

Останній зразок брали безпосередньо з реактора.

У цьому випадку протягом семи днів одержували більше 10г грибів на літр культурального середовища із вмістом відростків $3,77 \times 10^9$.

Приклад 5

У цьому прикладі описаний тест, проведений з використанням культурального середовища класу 3.

Культивування нитчастого гриба здійснювали в колбі Ерлена об'ємом 300мл, яка містить 150мл культурального середовища.

Середовище містило мелясу в кількості 15г/л, солодовий екстракт у кількості 10г/л і рідину, отриману після замочування зерен кукурудзи до набухання в кількості 10г/л, і стерилізували перед посівом конідій розглянутого гриба.

Культуру інкубували протягом 6 днів після посіву при температурі приблизно 27°C.

Починаючи із третього дня, брали зразки культурального середовища для визначення сухої маси (г/л) і кількості відростків (КУО/л). Для визначення сухої маси 20мл культурального середовища піддавали фільтрації й потім сушили в печі при 100°C протягом 24год. Кількість відростків оцінювали в 1мл культурального середовища.

Узагальнення отриманих результатів дано в наведеній нижче таблиці 5.

Таблиця 5

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	4,7	0	0,00
3	4,49	1,82	$2,38 \times 10^7$

4	4,62	3,815	$1,78 \times 10^8$
5	5,25	5,57	$1,23 \times 10^9$
6	6,03	8,555	$1,35 \times 10^9$

Приклад 6

Тест, описаний у прикладі 5, повторювали відповідно до методу, описаного в прикладі 2, у міні-реакторі об'ємом 2л, який містив 1,2л культурального середовища, описаного в прикладі 5. Експериментальні умови були такими ж, що й у прикладі 5, за винятком того, що збір зразків починали через один день після посіву конідій.

Узагальнення отриманих результатів наведено нижче в таблиці 6.

Таблиця 6

День	pH	Суха маса (г/л)	КУО/л
0	4,7	0	0,00
1	4,61	2,905	$5,60 \times 10^6$
2	4,7	3,085	$6,00 \times 10^7$
3	4,56	3,265	$1,23 \times 10^8$
4	6,11	5,295	$3,20 \times 10^8$
5	5,99	5,88	$7,00 \times 10^8$
6	6,94	6,305	$9,50 \times 10^8$
7	7	10,026	$2,22 \times 10^9$

Протягом семи днів одержували більше 10г грибів на літр культурального середовища із вмістом відростків $2,22 \times 10^9$.

Приклад 7

Культуральне середовище, описане в прикладі 3, модифікували як вказано нижче для зменшення вмісту двох джерел органічного азоту, які є найбільш дорогими компонентами:

25г/л меляси;

5г/л сахарози;

2,5г/л рідини, отриманої після замочування зерен кукурудзи до розбухання;

2,5г/л дріжджового екстракту.

У такому культуральному середовищі проводили тестування культури (А), з використанням вказаного вище гриба з метою порівняння з результатами тестування двох інших культур (Б та В), у яких застосовували таке ж культуральне середовище й у які послідовно додавали, починаючи із четвертого дня, джерело мінерального азоту.

У тесті Б. Починаючи із четвертого дня (більш конкретно, на четвертий, шостий і восьмий день) тричі додавали по 0,21г вторинного кислого фосфату амонію, так що загальна кількість вказаного інгредієнта становила 0,63г, а в тесті В, починаючи із четвертого дня (більш конкретно, на четвертий, шостий і восьмий день) тричі додавали по 0,28г, так що загальна кількість доданого інгредієнта становила 0,84г.

Тести проводили в колбах Ерлена об'ємом 500мл, які містять 300мл культурального середовища, яке стерилізували перед посівом конідій.

На дев'ятий і останній день культивування загальний вміст азоту в культуральному середовищі (А) становив 0,85г/л, у той час як у середовищах, у яких додавали вторинний кислий фосфат амонію

(А і Б), він становив 1,05г/л (А) і 1,26г/л (Б), відповідно.

Починаючи із третього дня з культуральних середовищ через кожні два дні, брали зразки для визначення сухої маси (г/л) і кількості відростків (КУО/л). Для визначення сухої маси 20мл культу-

рального середовища піддавали фільтрації й потім сушили в печі при 100°C протягом 24год. Кількість відростків оцінювали в 1мл культурального середовища.

Узагальнення отриманих результатів дано в наведеній нижче таблиці 7.

Таблиця 7

День	А рН	А СМ	А КУО	Б рН	Б СМ	Б КУО	В рН	В СМ	В КУО
0	5,06	0,00	0,00	5,06	0,00	0,00	5,09	0,00	0,00
3	4,92	3,94	$5,50 \times 10^8$	4,80	2,84	$2,50 \times 10^4$	4,80	3,36	$2,50 \times 10^4$
5	5,12	3,44	$1,75 \times 10^8$	4,89	4,57	$4,73 \times 10^8$	5,30	3,48	$3,05 \times 10^8$
7	6,68	6,45	$1,58 \times 10^9$	5,47	8,32	$3,15 \times 10^9$	6,39	5,48	$4,00 \times 10^9$
9	7,14	8,63	$3,20 \times 10^9$	5,44	11,30	$7,25 \times 10^9$	5,86	7,86	$6,78 \times 10^9$

СМ = суха маса (г/л).

КУО = кількість відростків/літр.

Як видно з наведеної вище таблиці, додавання джерела мінерального азоту, насамперед у невеликих кількостях (тест Б), дозволяє істотно

збільшувати кількість сухої маси, яку одержують, починаючи із сьомого дня культивування, і досягати більш ніж 100%-ного збільшення кількості відростків, отриманих протягом цього ж періоду культивування.