



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **82921** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A01N 63/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 00181	(72) Винахідник(и): Сергєєва Жанна Юріївна (UA), Крилова Катерина Дмитрівна (UA), Ліманська Наталія Вікторівна (UA), Васильєва Наталя Юріївна (UA), Іваниця Володимир Олексійович (UA), Товкач Федір Іванович (UA), Басюл Олена Владленівна (UA), Коротаєва Надія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.01.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.08.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.08.2013, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)

(54) СПОСІБ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ХВОРОБИ "ЧОРНА НІЖКА" З ВИКОРИСТАННЯМ ЛАКТОБАЦИЛ ТА АВТОЛІЗАТУ ЕРВІНІЙ

(57) Реферат:

Спосіб захисту рослин від хвороби "чорна ніжка" з використанням лактобацил та автолізу ервіній полягає в тому, що для обробки коренів розсади овочів використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації 3×10^8 КУО/мл. Корені обробляють комплексною сумішшю, до складу якої додатково входить автолізат бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що дозволяє знищити збудників хвороби рослин "чорна ніжка".

U
UA 82921 U

Корисна модель належить до способів боротьби з фітопатогенами і представляє собою засіб біологічного контролю захворювань рослин. Даний спосіб може застосовуватися в сільському господарстві для знищення фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora* - збудників хвороби «чорна ніжка» багатьох сільськогосподарських культур.

«Чорна ніжка» вражає надземні та підземні частини таких рослин, як картопля, томати, морква, капуста, в період вегетації. У рослин прикоренева частина стебла загниває і приймає різноманітне забарвлення (від жовто-коричневого до чорного). Такі стебла відстають у рості. Їх листя жовтіє, стає хлоротичним. Верхнє листя дрібне, жорстке, скручується вздовж центральної жилки. Хворі стебла ростуть під гострим кутом. Джерелом інфекції є вражені рослинні залишки у ґрунті або на його поверхні (у них збудник може зберігатись до 2 років). У епіфітотійні роки інфікування рослин досягає 16-20 %. Тому особливо необхідними є обробки розсади під час висадження у відкритий ґрунт, що зменшує ризик появи інфекції. Під час обробки комплексною сумішшю бактеріофаги і бактеріоцини, які містяться в автолізаті клітин ервіній вбивають фітопатогенні бактерії. Це дає можливість молочнокислим бактеріям колонізувати ризосферу рослин.

Бактерії роду *Lactobacillus* є мікроорганізмами з найвищим рівнем безпеки для людини та навколишнього середовища. Багато видів лактобацил (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus viridescens* та ін.) населяють філосферу та ризосферу рослин і можуть захищати рослини шляхом синтезу антагоністичних речовин - органічних кислот, перекису водню, бактеріоцинів. При внутрішньовидовому конкуруванні у штамів фітопатогенних ервіній відбувається виділення бактеріофагів і бактеріоцинів, що допомагає штамам, які здатні продукувати ці частки, заселяти нову екологічну нішу.

Досягнутий рівень в області біологічних препаратів за участю бактерій роду *Lactobacillus* і бактеріофагів *Erwinia carotovora* представлено в наступних джерелах.

Відомий спосіб захисту рослин, описаний в Wang H., Yan Y., Wang J., Zhang H., Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 // PloS ONE. - 2012. - Vol. 7, № 1: e29452. doi: 10.1371/journal.pone.0029452. Запропоновано застосовувати штами *Lactobacillus plantarum* проти фітопатогенних грибів, в тому числі - проти представників роду *Fusarium*. Недоліком описаного способу біологічного захисту є невизначеність дії на збудників бактеріальних хвороб рослин.

Відомий спосіб застосування лактобацил у комерційному препараті "Біофіт-1", описаний в <http://www.mtpk panda.eom/ru/preparaty/l.html>. Препарат "Біофіт-1" містить консорціум молочнокислих, азотфіксуючих, фотосинтезуючих, амоніфікуючих мікроорганізмів, сахароміцетів, антагоністів патогенних грибів і бактерій родів *Lactobacillus*, *Trichoderma*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradi rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Saccharomyces* і *Agrobacter*. Препаратом рекомендують обробляти насіння, садивний матеріал, сіянці та дорослі рослини.

Недоліками двох даних способів є невивченість дії складових препарату щодо збудників бактеріального раку дводольних рослин. Крім цього, відомий спосіб застосування бактерій роду *Lactobacillus* у складі препаратів "Біофіт-1" та "Активатор ґрунтової мікрофлори" передбачає обробку рослин консорціумом бактерій. Проводити таке компонування окремих складових консорціуму складно, представники різних бактеріальних видів мають різні ростові характеристики та потреби у поживних речовинах, а також терміни виживання на рослинних поверхнях.

Відомий спосіб захисту овочевих культур від хвороб, який описано в Сергієнко В.Г., Титова Л.В., Антипчук А.Ф., Перковська Г.Ю. Спосіб захисту овочевих культур від хвороб. Патент по заявці а200507295. Опубл. 22.07.2005. Авторами патенту запропоновано обробляти рослини в період вегетації біологічним препаратом, який містить азотофіксуючі бактерії *Azotobacter chroococcum* (Азотобактерин 20 та Азотобактерин 9Т) в концентрації 0,1-0,5 % (титр бактерій 10^8 кл/мл) самостійно або в сумішах з фунгіцидом Ридоміл Голд МЦ, 68 WG зі зменшеною на 20 % нормою витрати. Недоліками даного способу є сумісне використання фунгіциду, який знижує екологічність запропонованого способу захисту овочевих культур і забруднює оточуюче середовище; азотфіксуючі бактерії характеризуються більш складним процесом культивуванням ніж лактобацили, що робить технологію виробництва біологічного препарату менш економічно вигідною.

Найбільш близьким до запропонованого способу є «Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням лактобацил». Патент України на корисну модель № 75360. Опубл. 26.11.2012. Бюлетень 22 (найближчий аналог). Спосіб полягає в тому, що для обробки рослин використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які культивують протягом 48 годин у середовищі MRS. Бактерії *Lactobacillus plantarum* для обробки рослин виділяють з

рослинних поверхонь, з молочнокислих продуктів і неферментованих грибів, і суспензії культур, що вирости, залишають у рідкому середовищі MRS, в якому бактерії було вирощено. Лактобацилами обробляють рослини для захисту від бактеріального раку дводольних, спричиненого *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium vitis*.

Недоліком відомого способу є те, що для обробки рослин у найближчому аналозі використовують лише штами лактобацил, як монопрепарат, який у випадку захворювань рослин, зі швидшим розвитком симптомів ураження (в тому числі чорна ніжка), виявляється неефективним.

В основу корисної моделі поставлена задача створити ефективний спосіб захисту розсади овочів від збудників чорної ніжки з використанням живих клітин лактобацил *Lactobacillus plantarum* та автолізу клітин *Erwinia carotovora*.

Поставлена задача вирішується здійсненням способу захисту рослин від хвороби «чорна ніжка» з використанням лактобацил та автолізу ервіній, який полягає в тому, що для обробки коренів розсади овочів використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації 3×10^8 КУО/мл, і відрізняється тим, що корені обробляють комплексною сумішшю, до складу якої додатково входить автолізат бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що дозволяє знищити збудників хвороби рослин «чорна ніжка». Лактобактерії виділяють антагоністичні метаболіти і знижують рН середовища, що негативно впливає на життєздатність фітопатогенних ервіній. Цей процес займає в середньому 2-3 дні. Максимальна ефективність дії бактеріофагів і бактеріоцинів у автолізаті ервіній встановлена для адгезованих на поверхні рослинних тканин клітин фітопатогенних ервіній і відбувається безпосередньо в момент контакту з патогенами. Отже, висока ефективність суміші забезпечується двостадійним процесом взаємодії окремих компонентів з фітопатогенами.

Спільними ознаками найближчого аналога і запропонованого способу є те, що для обробки рослин використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які культивують протягом 48 годин у середовищі MRS.

Запропонований спосіб відрізняється від найближчого аналога тим, що бактерії *Lactobacillus plantarum* для обробки рослин використовуються не у монопрепараті, а у суміші з автолізатом клітин *Erwinia carotovora*, який містить бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини, і двокомпонентною сумішшю обробляють кореневу систему розсади овочів для захисту від чорної ніжки, спричиненої *Erwinia carotovora*.

Запропонований спосіб застосовується наступним чином: бактерії *Lactobacillus plantarum* вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації 3×10^8 КУО/мл, автолізат клітин *Erwinia carotovora* (у концентрації 1×10^{10} КУО/мл) одержують шляхом спонтанної індукції на рідкому оптимізованому мінімальному середовищі, стерилізацію від живих клітин ервіній, що вижили після автолізу, проводять при температурі 60 °C протягом 10-15 хв. Компоненти змішують у рівних співвідношеннях. Сумішшю обробляють кореневу систему проростків перед наступним висаджуванням у ґрунт, який може бути інфікований збудниками «чорної ніжки». Для цього у ємності, заповнені сумішшю, занурюють корені рослин. Обробці підлягає розсада безпосередньо перед висадкою у відкритий ґрунт. Перед занурюванням у суміш допускається змивання водою залишків ґрунту з кореневої системи рослин. Витрати суміші - на 100 проростків - 1,5-2 л. Час обробки - 1 година. Кратність використання 1,5-2 л суміші до 5 разів. За цей час лактобактерії встигають прикріпитися до рослинних тканин, де виступатимуть у ролі антагоністів до фітопатогенів, а бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини - адгезуватися на рослинних поверхнях. Надалі проростки відразу ж висаджують у ґрунт, не струшуючи залишки суміші і не промиваючи корені водою.

Ефективність запропонованого способу підтверджується прикладами.

Приклад № 1.

У складі суміші використовувались клітини штаму *Lactobacillus plantarum* ОНУ-87 і автолізат штаму *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1.

На проростках рослин томатів *Lycopersicon esculentum* дію суміші лактобактерій *Lactobacillus plantarum* та автолізу клітин *Erwinia carotovora* перевіряли після появи третьої пари листків. Для цього корені проростків занурювали у дослідні рідини на 1 год, а потім саджали у ґрунт. Кожний дослідний варіант виконувався у 7 повторях. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95 %. Для моделювання зараження та процесу інфекції чорної ніжки (позитивний контроль) корені проростків занурювали у суспензію культур патогенних штамів ервіній (кожна у концентрації 3×10^8 КУО/мл). Дослідні варіанти через одну годину після інфікування вносили у суміш молочнокислих бактерій та автолізу ервіній. Позитивним контролем слугували варіанти інфіковані суспензією культур

патогенних штамів ервіній, негативним контролем були рослини оброблені суспензією молочнокислих бактерій, автолізатом ервіній, суспензією молочнокислих бактерій та автолізатом, стерильною дистильованою водою, мінімальним оптимізованим середовищем, поживними середовищами LB (для ервіній) та MRS (для лактобактерій). Через 5-7 днів обраховували результати.

Проведені дослідження на рослинах томатів *L. esculentum* (сорт «Південна Пальміра») показали, що у варіантах негативного контролю (суспензія молочнокислих бактерій, автолізат ервіній, дистильована вода, оптимізоване мінімальне середовище, поживні середовища LB та MRS) не виявлено негативного впливу на проростки. В групі рослин *L. esculentum* позитивного контролю на сьому добу обробки коренів автолізатом ервіній патогенність дослідних штамів ервіній на рослинах томату склала 80 %. Дослідні рослини томатів, які спершу інфікували суспензією культур патогенних штамів ервіній, а потім вносили у суміш лактобактерій і автолізату ервіній, не виявили симптомів ураження.

Отже ефективність комплексної суміші у випробуваннях на рослинах томату *L. esculentum* склала 100 %. Це пояснюється тим, що бактерії-збудники лише адгезуються на поверхні коренів і не здатні проникати глибоко у тканини, і швидко можуть бути знищені бактеріофагами та бактеріоцинами автолізату або продуктами життєдіяльності лактобактерій.

Приклад № 2.

У складі суміші використовувались клітини штаму *Lactobacillus plantarum* ОНУ-87 і автолізат штаму *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1.

В іншому варіанті досліді (умови досліді ті ж, що у прикладі № 1), розсаду за одну годину до інфікування фітопатогенами вносили у суміш молочнокислих бактерій та автолізату ервіній. Через 5-7 днів обраховували результати.

Проведені дослідження показали, що у варіантах негативного контролю не виявлено негативного впливу на проростки. В групі рослин *L. esculentum* позитивного контролю на сьому добу патогенність на рослинах томату склала 80 %. Дослідні рослини томатів, які спершу вносили у суміш лактобактерій і автолізату ервіній, а потім інфікували суспензією культур патогенних штамів ервіній, не виявили симптомів ураження. Таким чином, і в цьому дослідному варіанті ефективність комплексної суміші у випробуваннях на рослинах томату *L. esculentum* склала 100 %.

Застосування лактобацил у даному способі спрямоване саме на збудників чорної ніжки - фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora*, розвиток хвороби пригнічується представниками лише одного виду бактерій - *Lactobacillus plantarum*, до складу препарату входить автолізат фітопатогенних ервіній, що містить бактеріофаги і бактеріоцини, який забезпечує високу ефективність захисної дії. Запропонований спосіб захисту відрізняється екологічністю, бо містить виключно природні компоненти (лактобацили, очищений автолізат клітин ервіній), економічністю, впливом на ервіній, збудників «чорної ніжки», на декількох етапах життєвого циклу цього патогену.

Таким чином встановлено, що запропонований спосіб є більш ефективним, ніж найближчий аналог, дозволяє застосовувати для обробки рослин живі клітини та автолізат клітин та має виражений ефект пригнічення розвитку хвороби «чорна ніжка» сільськогосподарських рослин.

Розробка нового ефективного способу для захисту рослин від хвороби «чорна ніжка» за допомогою лактобацил та автолізату ервіній проводилась Науково-навчальним біотехнологічним центром та кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за держзамовленням Міністерства освіти і науки, молоді і спорту України (№ НУ/3-2011) і за держбюджетною темою № 477.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб захисту рослин від хвороби "чорна ніжка" з використанням лактобацил та автолізату ервіній, який полягає в тому, що для обробки коренів розсади овочів використовують молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum*, які вирощують 48 годин на рідкому середовищі MRS до концентрації 3×10^8 КУО/мл, який відрізняється тим, що корені обробляють комплексною сумішшю, до складу якої додатково входить автолізат бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, який містить бактеріофаги і макромолекулярні бактеріоцини, що дозволяє знищити збудників хвороби рослин "чорна ніжка".

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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