



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78164** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A01N 63/00
C12R 1/125 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10482	(72) Винахідник(и): Лапа Світлана Володимирівна (UA), Положенець Віктор Михайлович (UA), Шевчук Ігор Васильович (UA), Авдєєва Лілія Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.09.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.03.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.03.2013, Бюл.№ 5	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, МСП, м. Київ, 03680 (UA)
	(74) Представник: Піскова Олена Вілліївна, реєстр. №289

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН ВІД ФІТОПАТОГЕННОЇ МІКРОФЛОРИ

(57) Реферат:

Композиція для захисту рослин від патогенної мікрофлори на основі біомаси бактерій-антагоністів роду *Bacillus*. Як бактерії-антагоністи вона містить *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 та *Bacillus subtilis* IMB B-7243 із титром 1×10^9 - 1×10^{10} КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1, а також наповнювач.

UA 78164 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології, зокрема, до композицій на основі мікроорганізмів, які забезпечують захист рослин від фітопатогенів. Запропонований препарат може використовуватися у сільському господарстві з метою захисту сільськогосподарських культур, знезараження ґрунту та захисту від хвороб, спричиненими грибовими та бактеріальними патогенами.

Провідне місце у системі захисту рослин від фітопатогенів та запобігання зниження врожаю посідають хімічні засоби. Проте використання пестицидів призводить до небажаних з точки зору екології 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 способам боротьби із хворобами рослин, які базуються на біопрепаратах, до складу яких входять мікроорганізми, зокрема, такі, що відносяться до роду *Bacillus*. Основною позитивною властивістю біологічних засобів та способів, які базуються на їх застосуванні є те, що більшість мікроорганізмів, що входять до складу таких препаратів, виділені з природних умов і тому не призводять до небажаних змін в біоценозах, а також дають змогу уникнути забруднення повітря, води і рослин стійкими хімічними сполуками. Проте арсенал біопрепаратів для боротьби з фітопатогенними хворобами, на відміну від такого для пестицидів, на сьогоднішній день є недостатнім. Тому одним з важливих напрямків сучасної біотехнології є розробка композиційних препаратів на основі мікроорганізмів, які характеризуються високою ефективністю контролю фітопатогенної мікрофлори.

На сьогодні в Україні відомі біопрепарати, які використовуються для пригнічення розвитку фітопатогенних бактерій та грибів. До таких відносяться, зокрема, Агат, Бактофіт, Планриз БТ, Псевдобактерин -2, Мікосан В та Н, Фунгістоп (триходермін). (Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Офіційне видання. - К.: Юнівест маркетинг, 2010, стор. 354-359).

В Україні є відомим препарат Триходермін, що використовується для захисту овочевих культур від кореневих гнилей, білої гнилі, фузаріозного та вертицильозного в'янення в захищеному ґрунті (Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Офіційне видання. - К.: Юнівест маркетинг, 2010, стор. 358). До складу вказаного біопрепарату входять спори гриба *Trichoderma lignorum* штаму М-40 при титрі спор 1-10 млрд/см³. Вказаний препарат демонструє антагоністичну активність щодо популяцій *Fusarium oxysporum* f.sp.cucumerinum - збудника кореневих гнилей in vitro. Проте вказаний препарат характеризується рядом недоліків при застосуванні:

- звичайне застосування Триходерміну в захищених ґрунтах приводить до надмірного заселення ґрунту видами *Trichoderma*, при цьому спостерігається пригнічення корисної мікрофлори ґрунту, а також заселення коріння рослин як звичайними патогенами, так і триходермою;

- швидке розмноження *Trichoderma* приводить до накопичення грибів роду *Fusarium* у ґрунті, що виявляє несприятливий вплив на рослини;

- види *Trichoderma* виявляється в комплексі збудників кореневих гнилей різних сімейств: Cucurbitaceae Juss., Fabaceae Lindl, Solanaceae Juss., Poaseae Barnhart, Rosaceae Juss та ін., що свідчить про фітопатогенні властивості триходерми.

Широкого застосування на Україні набув біопрепарат Бактофіт на основі штаму бактерій *Bacillus subtilis* ІПМ-215, що використовується для обробки зернових культур з метою захисту їх від бактеріальних та грибкових патогенів (Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні: Офіційне видання. - К.: Юнівест маркетинг, 2010, стор. 356). Вказаний біопрепарат, що застосовується у формі змочуваного порошку для захисту рослин від борошнистої роси та кореневих гнилей, є вибраним як прототип запропонованої корисної моделі. Одним з недоліків зазначеного препарату є те, що він характеризується вузьким спектром фінгіцидної дії. Слід зазначити також низьку технологічність обробки рослин цим препаратом, що обумовлює, зокрема, необхідність його застосування декілька разів за сезон. Крім того, робоча суспензія Бактофіту при обприскуванні легко седиментується, що робить неможливим рівномірне нанесення біопрепарату.

Задачею даної корисної моделі є створення композиції для захисту рослин від фітопатогенної мікрофлори (грибів та бактерій), яка є більш ефективною за рахунок розширення спектру збудників хвороб рослин, які можуть піддаватися контролю. Додатковий технічний ефект, який забезпечує композиція, полягає у тому, що вона може застосовуватися як для обробки рослин, так і для знезараження ґрунту.

Вказана задача вирішується за рахунок створення композиції, що містить біомасу штамів бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 та *Bacillus subtilis* IMB B-7243 із титром $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1, та наповнювач при наступному співвідношенні, %:

біомаса штамів бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 та *Bacillus subtilis* IMB B-7243 із титром $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1
наповнювач

92-98
2-8.

Біомасу мікроорганізмів отримують шляхом вирощування поверхневим способом на твердому поживному середовищі сусло-агарі протягом 7-10 діб (у залежності від % спороутворення) при температурі культивування 37 °С. Як наповнювач використовують стерильну водну суміш, яка містить 1 % желатину та 4 % лактозу у перерахунку на загальний об'єм наповнювача.

Штам *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 являє собою 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 з краями неправильної форми. На картопляному агарі - колонії світло-бежевого кольору, блискучі, в'язкої консистенції, краї рівні. На середовищі Громико - колонії бежевого кольору, складчасті, з підвищеним центром, краї зрізані, консистенція в'язка.

В мазках з колоній, які вирости на МПА, через 18 годин можна побачити прямі паличкоподібні клітини розміром $1,6 \times 0,6$ мкм, які розташовані поодинокі, попарно та зрідка ланцюгом. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються. На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, манніт, ксилізу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, росте при концентрації NaCl 7 %, утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах і при концентрації NaCl 10 %, не утворює газ з NO_3^- в анаеробних умовах. Умови культивування: культивується на середовищі сусло-агар, МПА, Громико, картопляному агарі. Штам зберігається на сусло-агарі, середовищі Громико (МПА+СА), агаризованому середовищі Гаузе № 2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз в рік.

Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7243 був виділений з ґрунту і являє собою грампозитивні аеробні спороутворюючі палички, які продукують каталазу. На МПА, сусло-агарі, середовищі Громико відмічено інтенсивний ріст, утворює матові складчасті колонії бежевого кольору з порізними краями. В препаратах, виготовлених з чистої культури, яка вирости на МПА при 37 °С, час культивування - 18 годин, та забарвлених за Грамом, реєструються прямі паличкоподібні клітини розміром $2,1 \times 1,0$ мкм, розташовані поодинокі, зрідка ланцюгами. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються. На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, арабінозу, манніт, ксилізу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогес-Проскауера, гідролізує крохмаль, желатину, утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах.

Культивування можна проводити на середовищах - МПА, середовищі Громико, агаризованому середовищі Гаузе № 2 при температурі 137 °С. Штам зберігається на МПА, середовищі Громико, агаризованому середовищі Гаузе № 2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз на рік. Проявляє антагоністичну активність стосовно бактерій родів *Xantomonas*, *Clavibacter*, *Pseudomonas* та *Erwinia*.

Для обробки рослин використовують зазначену композицію при нормі витрати робочої рідини 500-600 л/га. Запропоновану композицію використовують шляхом наземного обприскування ґрунту з подальшим дискуванням або шляхом замочування кореневих розсади безпосередньо перед висаджуванням у ґрунт (суниці, лісові культури та ін.), або шляхом замочування насіння. Використання описаного біопрепарату дає можливість знизити інфекційний фон щодо фітопатогенних мікроорганізмів у ґрунті та забезпечити довготривалий та ефективний захист рослин від збудників хвороб.

Запропоновану композицію одержували наступним способом. Для цього штами, що входять до складу препарату, вирощували поверхневим способом на твердому поживному середовищі сусло-агар протягом 7-10 діб при температурі 28 °С. Вирощену біомасу змивали стерильним фізіологічним розчином. В якості наповнювача використовували 1 % желатину і 4 % лактозу від загального об'єму отриманої кількості суспензії. Композицію штамів змішували у співвідношенні 1:1.

Приклад 1. Експериментально в лабораторних умовах визначали антагоністичну активність запропонованої композиції щодо тест-культур фітопатогенів - збудників хвороб сільськогосподарських культур. Дослідження проводили методом радіальних штрихів за

Єгоровим (Єгоров, 1986). Для цього досліджувану композицію вносили в центр чашки Петрі з картопляним агаром та чашки інкубували в термостаті при 28 °С протягом 48 год. До композиції підсівали штрихом тест-культури грибів або бактерій (500 млн суспензії клітин мікроорганізмів у фізіологічному розчині). Засіяні таким чином чашки Петрі інкубували при 28 °С протягом 3-5 діб.

5 Облік результатів проводили за величиною зон затримки росту тест-культур фітопатогенних мікроорганізмів. Контролем росту тест-культур слугувало паралельне вирощування їх на чашках з агаризованим картопляним середовищем без культур, які входять до складу композиції. Отримані результати досліджень представлені в Табл. 1.

Таблиця 1

Антагоністична активність композиції штамів щодо фітопатогенів, збудників хвороб
сільськогосподарських культур

Тест-культури	Зони затримки росту тест-культур, мм
<i>Alternaria alternata</i>	21
<i>Botrytis cinerea</i>	20
<i>Cladosporium spp.</i>	16
<i>Fusarium solani</i> var. <i>arigillaceum</i>	11
<i>F. oxysporum</i>	12
<i>F. gibbosum</i>	11
<i>F. solani</i>	10
<i>F. moniliformis</i> v. <i>lactis</i>	10
<i>Verticillium spp</i>	21
<i>Pseudomonas cepacia</i> 4207	20
<i>Xantomonas campestris</i> 80036	25
<i>X. maltophilia</i>	19
<i>X. malvacearum</i> 6518	24
<i>X. phaseoli</i> 262	22
<i>X. ampelina</i> 10 a	27
<i>X. vesicatoria</i>	25

10 Отримані результати свідчать про те, що композиція штамів проявляє специфічну антагоністичною дію та характеризується високою та середньою активністю щодо культур фітопатогенних мікроорганізмів, збудників хвороб сільськогосподарських рослин.

15 Приклад 2. У польових умовах ефективність запропонованої композиції проти комплексу хвороб - кореневі гнилі, сірої грилі та вертицильозного в'янення визначали на полях ПП "Тарасівський", Київської обл., Києво-Святошинського р-н., с. Тарасівка, де висаджували розсаду суниці сорту Зенга-Зенгана. Схема захисту суниці передбачала: 1-поверхневий обробіток ґрунту, 2 - замочування розсади суниці перед посадкою в ґрунт, 3 - вприскування рослин до цвітіння. Для цього поверхню ґрунту обробляли шляхом обприскування композицією

20 у відповідності з даною заявкою, а саме титр 1×10^9 КУО/мл. Норма витрати робочої рідини складала 500 л/га. Використовували ранцевий оприскувач. Для знезараження від патогенної мікрофлори перед посадкою кореневище суниці занурювали в робочий розчин, який використовували для обробки ґрунту на 20 хв. Як еталон використовували фунгіцид Байлетон фірми Байер Кропсаєнс (DE). Результати ефективності дії запропонованої композиції на розвиток хвороби та вплив на урожайність у порівнянні з еталоном представлені в Таблицях 2 та 3.

25

Таблиця 2

Ефективність запропонованої композиції щодо комплексу хвороб суниці (Суниця, сорт Зенга-Зенгана. ПП "Тарасівський", Київська обл., Києво-Святошинський р-н, с.Тарасівка) 2010-2011 рр.

Варіанти	Норма витрати, титр	Розвиток хвороби, %	Ефективність дії, %
запропонована композиція (B.amyloliguefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	титр 1×10^9 КУО/мл	0,2	67,85
Еталон (Байлетон), 25 % з.п.	0,24 кг/га	0,3	57,1
Контроль		0,7	-
HIP ₀₅		0,2	

Таблиця 3

Урожайність суниці при використанні запропонованої композиції (суниця, сорт Зенга-Зенгана. ПП "Тарасівський", Київська обл., Києво-Святошинський р-н., с.Тарасівка), 200 2010 рр.

Варіанти обробки	Маса ягоди, г	Урожайність, ц/га			
		2009 р.	2010 р.	середня за 2 р.	відношення до урожайності в контролі, %
Контроль (без обприскування)	10,4	84,7	88,0	86,35	100
Еталон (Байлетон, 25 % з.п., 0,24 кг/га)	11,3	92,6	95,0	93,8	108,7
Запропонована композиція (B.amyloliguefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	11,8	104,0	110,0	107,0	123,9
HIP ₀₅	-	25,5	13,6	14,1	-

- 5 Як видно з представлених результатів, запропонована композиція на основі бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 та *Bacillus subtilis* IMB B-7243 з титром 1×10^9 КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1, забезпечувала захист суниці від ураження хворобами, такими, як кореневі гнилі, сіра гниль, вертицильозне в'янення суниці, які інтенсивно розвиваються за сприятливих для їх розвитку умов та дозволить отримати прибавку врожаю.

- 10 Приклад 3. У даному експерименті вивчали ефективність запропонованої композиції щодо ураження рослин картоплі мокрою бактеріальною гниллю під час вегетації рослин та бульб після збирання врожаю. Досліди проводились в господарстві Немешаєво, Київської обл. на сортах Слов'янка, Веста, Тетерів в трьохкратній повторності В першому варіанті висаджували візуально здорові необроблені бульби (контроль). В другому варіанті використовували фунгіцид Татту, к.с. з нормою витрати 3 л/га, робочим розчином якого обприскували рослини картоплі під час вегетації. В третьому варіанті бульби перед посадкою обробляли розчином запропонованої композиції.

15 Так, у варіанті з застосуванням запропонованої композиції у всіх трьох сортів відзначалась найменша ступінь ураження мокрою гниллю як під час вегетації, так і після збору врожаю в порівнянні з контролем. (Таблиця 4).

Таблиця 4

Ефективність дії препаратів щодо поширення мокрої бактеріальної гнилі картоплі

№ п/п	Варіант досліджу	Ступінь ураження мочною бактеріальною гниллю, %	Ефективність дії препарату, %
Слов'янка			
1	Контроль	4,3	3,5
2	Татту, к.с. (еталон)	2,5	41,8
3	Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	2,0	53,5
Веста			
1	Контроль	21,9	
2	Татту, к.с. (еталон)	12,3	43,8
3	Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	12,1	44,7
Тетерів			
1	Контроль	38,9	
2	Татту, к.с. (еталон)	22,5	42,7
3	Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	20,5	47,3

В результаті досліджень встановлено, що запропонована композиція проявляла високу ефективність щодо зниження ураження картоплі збудниками мокрої бактеріальної гнилі під час вегетації, при цьому ефективність дії була вищою ніж при застосування хімічного фунгіциду.

При вивченні впливу застосованих препаратів на продуктивність картоплі нами встановлено, що при обробці бульб сорту Слов'янка перед посадкою запропонованою композицією урожайність виросла на 13,0 % у порівнянні з контролем, сорту Веста - на 27,5 %, а сорту Тетерів - на 11,1 % (Табл. 5).

Таблиця 5

Урожайність картоплі залежно від використаних препаратів

Варіант	Урожайність з одного куща, кг	Приріст врожаю	
		кг	%
Слов'янка			
Контроль	0,8	0	0
Тату (еталон)	0,8	0	0
Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis 1MB B-7243)	0,9	0,12	13,0
Веста			
Контроль	0,6	0	0
Татту (еталон)	0,6	0,03	4,9
Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	0,8	0,22	27,5
Тетерів			
Контроль	0,4	0	0
Татту (еталон)	0,6	0,2	3,3
Запропонована композиція (B.amyloliquefaciens IMB B-7099+B.subtilis IMB B-7243)	0,5	0,05	11,1

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено, що обробка бульб композицією штамів перед посадкою дозволяє знизити ступінь ураження рослин мокрою гниллю під час вегетації та збільшити приріст врожаю на 11,1-27,5 %.

- 5 Приклад 4. В умовах сховища випробовували композицію запропонованих штамів на бульбах товарної картоплі сорту Тетерів з метою встановлення її лежкості в умовах зберігання. Варіанти досліду: контроль - без обробки порівнювали з варіантом, у якому бульби обробили суспензією з титром $1-3 \times 10^9$ КУО/мл, норма витрати 15 г /л. Бульби картоплі зберігали в приміщенні при температурі 18 °С з метою створення умов для розвитку гнилей картоплі. Строк зберігання 2-4 місяці, періодично (через 10-14 днів) проводили візуальний огляд та облік розвитку гнилі. Результати досліду вказані в таблиці 6.

Таблиця 6

Зберігання картоплі, яка оброблена запропонованою композицією
(строк зберігання 4 місяці)

Варіант	Температура зберігання, °С	Розвиток хвороб (бактерії р. <i>Erwinia</i> , гриби <i>Fusarium</i>), %	Збережені бульби, %	Підвищення лежкості картоплі в порівнянні з контролем, %
Контроль (без обробки)	+2 °С	56,64,81	43,44,81	-
Запропонована композиція (В. <i>amyloliquefaciens</i> IMB B-7099+В. <i>subtilis</i> IMB B-7243)	+2 °С	36,94,75	63,14,75	19,76,76

- 15 З таблиці 6 видно, що при обробці бульб картоплі культурами бацил, які мають виражені антагоністичні властивості щодо штамів - збудників гнилі картоплі, в лабораторних дослідах досягається значне підвищення зберігання картоплі у порівнянні з контролем.

Таким чином, застосована композиція штамів бацил для захисту бульб картоплі при зберіганні дозволить зменшити розвиток гнилі під час зберігання в 1,5-3 рази та збільшити термін їх зберігання у сховищі.

- 20 Приклад 5. Ефективність запропонованої суспензії проти збудника клястероспоріозу сливи визначали в садових насадженнях ДГ "Новосілки". Ефективність дії двократної обробки суспензією композиції з титром 1 млрд. КУО/мл після цвітіння становила 78 %, а при збільшенні титру до 3 млрд. КУО/мл була дещо вищою і складала 94,0 %. (Таблиця 7).

Таблиця 7

Ефективність дії Спорофіту проти клястероспоріозу сливи
(ДГ "Новосілки", 2010-2011 р.)

Варіанти	Норма витрати, л/га	Ураження листя, %	Розвиток хвороби, %	Ефективність, %
Контроль (без обробки)	-	23,0	5,7	-
Запропонована композиція титр (1×10^9 КУО/мл)	3,0	15,0	1,8	78,0
Запропонована композиція титр (3×10^9 КУО/мл)	3,0	14,0	1,5	94,0
HIP ₀₅		2,1	0,9	

25

Таким чином, застосування композиції з титром 3×10^9 КУО/мл дозволить знизити ураження та розвиток клястероспоріозу сливи.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Композиція для захисту рослин від патогенної мікрофлори на основі біомаси бактерій-антагоністів роду *Bacillus*, яка **відрізняється** тим, що як бактерії-антагоністи вона містить *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7099 та *Bacillus subtilis* IMB B-7243 із титром 1×10^9 - 1×10^{10} КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1, а також наповнювач, при наступному співвідношенні компонентів, %:
біомаса штамів бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B- 7099 та *Bacillus subtilis* IMB B- 7243 із титром 1×10^9 - 1×10^{10} КУО/мл, узятих у співвідношенні 1:1 92-98
наповнювач 2-8.
2. Композиція згідно з пунктом 1, яка **відрізняється** тим, що як наповнювач використовують стерильну водну суміш, що включає 1% желатину та 4% лактози.

10

Комп'ютерна верстка М. 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