УКРАЇНА

(19) UA (11) 35420 (13) A

(51) 6 C12N1/20, A01N63/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

видається під відповідальність власника патенту

(54) ШТАМ BACILLUS SUBTILIS BS 2931 - АНТАГОНІСТ ЗБУДНИКА ПАРШІ ТА ОПІКУ ПЛОДОВИХ

(21) 99105555
(22) 12.10.1999
(24) 15.03.2001
(46) 15.03 2001, Бюл. № 2, 2001 р.
(72) Шарга Борис Михайлович
(73) УЖГОРОДСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Штам Bacillus subtilis BS 2931 - антагоніст збудника парші та опіку плодових, колекція загальноуніверситетської лабораторії біотехнології, Ужгородський державний університет.

Винахід відноситься до мікробіології, зокрема, до штаму антагоніста парші та бактеріального опіку плодових, і може бути застосований у захисті рослин.

Відомі штами-продуценти антибіотичних речовин активних проти збуднику опіку плодових [1,2]. Однак, для даних культур не показано антагонізму проти парші яблунь та груш. Відомий також штам бактерій для одержання препарату проти парші яблуні [3], однак для даного антагоніста не показано антагонізму проти опіку плодових.

Таким чином, описані штами не застосовуються як антагоністи збудників обох хвороб - парші та опіку плодових

Завданням даного винаходу є одержання штаму-антагоніста з антимікробними властивостями проти збудників обох хвороб - парші та опіку плодових.

Це завдання вирішується тим, що в якості штаму-антагоніста збудників парші та опіку плодових пропонується культура Bacillus subtilis BS 2931, що виділяє антимікробну речовину, активну проти збудників парші (Fusicladium dentriticum) та опіку плодових (Erwinia amylovora). Сутність винаходу полягає в тому, що пропонований антагоніст, порівнюючи з прототипами [1, 2, 3], має ширший спектр антимікробної дії.

Штам бактерій Bacillus subtilis BS 2931 має слідуючі ознаки. Забарвлення за Грамом - позитивне Частіше дипплобацили ніж окремі палички. Ріст на агарових середовищах сухий, на бідних або вогких поживних середовищах утворює колонії, що швидко поширюються по поверхні агарових пластин. На бульйоні без аерації утворює плівку. В аеробних умовах ріст майже відсутній. На твердих агарових середовищах утворює колонії R-типу, грязно-білого кольору. Реакція Фогес-Проскауера позитивна. Може використовувати цитрат натрію як єдине джерело вуглецю, а також у присутності органічних субстратів. Ацетат натрію не використовує. Утворює лізиндекарбоксилазу, розщеплює малонат натрію з утворенням лужних продуктів слабо. Індол та сірководень не утворює. Аргініндекарбоксилаза, аргініндегідролаза, фенілаланіндезаміназа, уреаза ; відсутність. Ксилозу, сорбіт, дульцит, мальтозу, лактозу, цукрозу - не використовує. Газ із глюкози не утворює. Еритроцити людини в умовах підвищеного вмісту CO_2 не гемолізує, лецитиназна активність у присутності хлориду натрію відсутня, а при його відсутності - наявна. Тест мацерації зрізів картоплі (сорт «Пікассо») негативний. Наявна целюлазна активність. Штам не є фітотоксичним на листі та зелених пагонах груш, яблунь, кінських бобів, пагонах персика Штам не пригнічує проростання та розвиток злаків (пшениця, кукурудза, ячмінь), бобових (кінські боби, люпин та квасоля).

Приклад 1. До 2-добових макроколоній антагоніста, що виросли на периферії поверхні пластини картопляного агару у чашці Петрі, перпендикулярними штрихами інокулюють культури збудника опіку плодових із ізотонічних суспензій 10^8 кфо/мл Потім культивують при 30°С на протязі 2-3 днів до появи зон затримки росту між колоніями антагоніста та збудника опіку. За розмірами зон встановлюють чутливість конкретних штамів E. amylovora до антимікробної речовини B. subtilis BS 2931 (Табл. 1).

Приклад 2. Зрізи поверхні зелених груш сорту «Конференція» обробляють суспензією B. subtilis BS 2931 (10^{12} кфо/мл), дають підсохнути в потоці стерильного повітря і інокулюють по краплині (0,01 мл) суспензії E. amylovora штам 684 (10^6 кфо/мл), або будь-який інший з наведених штамів

(19) UA (11) 35420 (13) A

опіку плодових. Загнивання плодів, виділення з уражених плодів спостерігаються тільки в контролі (груші, інокульовані лише збудником опіку).

Приклад 3. Зрізи груш притуляли до добового газону B. subtilis BS 2931, далі інокулювали суспензію опіку плодових (10^8 кфо/мл), як описано вище. Оброблені бацилами груші не розвивають симптомів опіку.

Приклад 4. Фільтрат 4-добової культури B subtilis BS 2931 вирощеної на бульйоні або визначеному рідкому поживному середовищі заморожують при - 70°С, а далі ліофілізують при -20°С. Залишок розчиняють у стерильній водопровідній воді так, щоб одержати 20-кратний концентрат. До 1 мл суспензії конидій (10^6 спор/мл), одержаної шляхом змивів листя яблуні із симптомами парші додають 9 мл концентрату. Поки спори ще не осіли, краплину суміші наносять на стерильне предметне скло в чашці Петрі з вологим фільтрпапером Витримують при 18-20°С на протязі доби, а далі краплини накривають покривними скельцями і під світловим мікроскопом оглядають препарати по 5 незалежних поль зору на препарат.

Приклад 5. До 25 мл сусла у 250 мл колбах Ерленмеєра додають по 0,02 мл суспензії антагоніста (10^8 кфо/мл) та збудника парші (10^5 спор/мл) з чистої культури. Культивують при 24°С на протязі доби. Далі проводять мікроскопію 3 незалежних проб по 5 поль зору на препарат. Встановлюють довжину первинних гіф у пробах із спільного культивування та в контролі, коли спори гриба інкубували без бацил

Таким чином, пропонований штам є антагоністом як бактеріального опіку плодових, так і парші. Він може бути використаний для створення препарату для захисту рослин від вказаних хвороб.

1. Abo-E1-Dahab, El-Goorani M. A. 1964: Antagonistic effect of a Bacillus subtilis strain upon Erwinia amylovora. Phytopathology 54: 1285 - 1286.

2. Шарга Б. М., Турянця А. І. Антагоніст збудника опіку плодових. Патент України. № 18402, С1, A01N 63/04; C12N 1/14; Бюл. №6, 25. 12. 97. (прототип)

3. Майданик С. М Штам бактерий Bacillus sp. для получения препарата против парши яблони. Авторское свидетельство СССР № 1347445 C12N 1/20, A01N 63/00// (C12N1/20; C12 R 1:07) 28 01.86 (для служебного пользования экз № 000356), (прототип)

Таблиця 1

Антагоністична активність E. amylovora до збудника опіку плодових на чашках Петрі

Штам E. amylovora	Рослина-господар	Чутливість до антибіотику B. subtilis BS 2931
Ea-4#	яблуня	+
Ea- 95 #	яблуня	++
659 *	яблуня	++
691 *	яблуня	++
Ea-311#	айва	+
610 *	глід	++
651 *	глід	++
Ea 103#	мушмула	+
684 *	глід	++
NCPPB 2024	груша	++
NCPPB 8705	груша	++
661 *	горобина (Sorbus sp.)	++

Примітка:

штам одержано від д-ра V. Gavrilovic (Югославія),

* штам одержано від д-ра P. Sobiczewski (Польща),

+ штам чутливий до антибіотику (зона затримки росту між макроколонією антагоніста та збудника опіку 1-15 мм),

++ штам високочутливий до антибіотику (зона затримки росту між макроколонією антагоніста та збудника опіку більша 15 мм).

Таблиця 2

Антагоністична активність B. subtilis BS 2931 до збудника парші Fusicladium dentriticum

Середовище	Розвиток збудника парші	
	Кількість проросших конидій, n %± SE	Довжина первинних гіф (мкм), n ± SE
Стерильна водопровідна вода (контроль)	65 ±11	160±25
20-кратний концентрат фільтрату 4-добової культури	0	0
Змішана добова сусло-культура	3±0,4	10±3

Примітка:
SE - стандартна похибка,
n - середнє значення за результатами 15 визначень.

Тираж 50 екз.
Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03