



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 682** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 01N 63/00, C 12N 1/20 //(C 12N 1/20, C 12R 1:38)**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2004031748, 10.03.2004

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2005

(46) Дата публикации: 15.08.2005

(72) Изобретатель:

Киприанова Елена Андреевна, UA,
Гораль Сергей Викторович, UA

(73) Патентовладелец:

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И
ВИРУСОЛОГИИ ИМ. АКАДЕМИКА
Д.К.ЗАБОЛТНОГО НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНЫ, UA

(54) ИНСЕКТОФУНГИЦИДНЫЙ БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ И БОЛЕЗНЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению комплексного биопрепарата для защиты растений от вредителей и возбудителей заболеваний. Экологически безопасный комплексный инсектофунгицидный препарат создан на основе двух штаммов - *Pseudomonas aureofaciens* IMB В-7096 и *Pseudomonas aureofaciens* IMB В-7097. Оба штамма характеризуются энтомопатогенной, антифунгальной и антибактериальной активностью, которая обусловлена синтезом пигментов феназинового ряда, и стимулирующим

действием на развитие растений. Препарат может быть использован для борьбы с грибковыми заболеваниями винограда, с корневыми гнилями других сельскохозяйственных культур (пшеницы, ячменя, гороха), а также для обработки урожая овощных культур при хранении.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

У А 7 3 6 8 2 C 2

У А 7 3 6 8 2 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 682** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 01N 63/00, C 12N 1/20 //(C**
12N 1/20, C 12R 1:38)

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2004031748, 10.03.2004
(24) Effective date for property rights: 15.08.2005
(46) Publication date: 15.08.2005

(72) Inventor:
Kiprianova Olena Andriivna, UA,
Horal Serhii Viktorovych, UA
(73) Proprietor:
ACADEMICIAN ZABOLOTNYI MICROBIOLOGY
AND VIROLOGY INSTITUTE OF NATIONAL
ACADEMY OF SCIENCES, UA

(54) **INSECTOFUNGICIDE BIOPREPARATION FOR PEST AND DISEASE CONTROL OF FARM CROPS**

(57) Abstract:

The invention relates to biotechnology, namely to obtaining of complex biopreparation for pest and pathogen control of plants. Ecologically safe complex insectofungicide preparation is produced on the base of such two strains as *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7096 and *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7097. Both strains are characterized by entomopathogenic, antifungal and antibacterial activity resulting from synthesis of pigments of phenazine series and by

stimulation effect on plants growth. The preparation can be used for control of vine fungus diseases, root rots of other farm crops (wheat, barley, pea), as well as for treatment of harvest of vegetable crops while storing.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 8, 15.08.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 3 6 8 2 C 2

U A 7 3 6 8 2 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 682** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 01N 63/00, C 12N 1/20 //(C**
12N 1/20, C 12R 1:38)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2004031748, 10.03.2004

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2005

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(декларційного патенту): 15.08.2005

(72) Винахідник(и):
Кіпріанова Олена Андріївна, UA,
Гораль Сергій Вікторович, UA

(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ.
АКАДЕМІКА Д.К.ЗАБОЛОТНОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, UA

(54) ІНСЕКТОФУНГІЦИДНИЙ БІОПРЕПАРАТ ДЛЯ БОРОТЬБИ ІЗ ШКІДНИКАМИ І ХВОРОБАМИ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

(57) Реферат:

Винахід відноситься до біотехнології, а саме до одержання комплексного біопрепарату для захисту рослин від шкідників і збудників захворювань. Екологічно безпечний комплексний інсектофунгіцидний препарат створено на основі двох штамів - *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7096 та *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7097. Обидва штами характеризуються

ентомопатогенною, антифунгальною і антибактеріальною активністю, яка зумовлена синтезом пігментів феназинового ряду, і стимулюючою дією на розвиток рослин. Препарат може бути використаний для боротьби з грибовими захворюваннями винограду, з корневими гнилями інших сільськогосподарських культур (пшениці, ячменю, гороху), а також для обробки врожаю овочевих культур при зберіганні.

U A 7 3 6 8 2 C 2

U A 7 3 6 8 2 C 2

Опис винаходу

Винахід відноситься до біотехнології, а саме до одержання комплексного біопрепарату для захисту рослин від шкідників і збудників захворювань.

Біологічні засоби захисту рослин, які посідають все значніше місце на ринку продуктів біотехнології, є як правило моновалентними і спрямовані тільки проти комах-шкідників або мікроорганізмів - патогенів рослин. В той же час досить привабливим є створення на основі мікроорганізмів комплексних біопрепаратів, які мають кілька видів корисної активності. До перспективних з цієї точки зору мікроорганізмів відносяться штами *Pseudomonas aureofaciens*, антифунгальним властивостям яких присвячено чимало повідомлень [Смирнов, Киприанова, 1990; Becker et al., 1990, Thomashow et al., 1990]. Нами було показано, що поряд з високою антибактеріальною та антифунгальною активністю деякі штами цього виду мають виражені ентомопатогенні властивості.

Задачею винаходу є створення на основі активних штамів *Pseudomonas aureofaciens* біопрепарату з комплексною антимікробною, антифунгальною, ентомопатогенною і рістстимулюючою дією для захисту сільськогосподарських культур від хвороб і шкідників.

Як прототип запропонованого препарату може розглядатися препарат Агат 25К для підвищення врожаю рослин [Патент Російської Федерації №2111196 від 20.05.98], який містить інактивовані бактерії *Pseudomonas aureofaciens* штам Н16 у вигляді пасти. Препарат використовується для обробки насіння і обприскування посівів ячменю, пшениці, цукрових буряків. Він гальмує розвиток кореневих гнилей, септоріозу, фузаріозу, бурой іржі, підвищуючи тим самим врожай сільськогосподарських культур. Проте цей препарат містить лише один штам бактерій з обмеженим спектром антифунгальної активності, спрямованим проти кількох видів грибних патогенів.

Як аналог препарату може розглядатися штам бактерій *Pseudomonas aureofaciens* 51 [Патент Російської Федерації №2203945 від 10.05.2001], використовуваний для передпосівної обробки насіння пшениці. Препарат, одержаний на основі штама, ізольованого з орних ґрунтів Башкортостану, гальмує розвиток захворювань пшениці, які спричиняються твердою сажкою та кореневими гнилями. Проте це є моновалентний препарат, що складається з одного штама бактерій, він не має ентомопатогенної активності і не діє на шкідливі комахи, а пігмент, з яким пов'язаний антимікробний і рістстимулюючий ефект препарату, має досить помірну антимікробну активність. Тому спектр дії препарату обмежений і його застосування дає позитивні результати тільки при захворюваннях пшениці, які спричиняються грибними патогенами.

В основу винаходу було поставлено завдання створення екологічно безпечного комплексного інсектофунгіцидного препарату на основі штамів *Pseudomonas aureofaciens*, яке б забезпечило його широке використання для захисту овочевих, злакових, плодкових культур, виноградних насаджень, лісових масивів від комах-шкідників і грибних і бактеріальних хвороб і стимулювання розвитку рослин.

Поставлене завдання вирішується тим, що біопрепарат містить клітинну біомасу в суміші з середовищем вирощування двох штамів: *Pseudomonas aureofaciens* УКМ В-111 та *Pseudomonas aureofaciens* УКМ В-306.

Названі штами відібрані в результаті широкомасштабного дослідження значної колекції мікроорганізмів, зокрема представників виду *Pseudomonas aureofaciens*, на антагоністичну активність щодо фітопатогенних грибів і бактерій. Вони характеризувалися значною антибіотичною активністю, зумовленою синтезом антибіотиків - похідних феназину (табл.1).

Ентомоцидна активність різних штамів *Pseudomonas aureofaciens* щодо гусені яблуневої плодожерки 5-го віку коливалась у широких межах, досягаючи у окремих штамів і в різних дослідах 90% (табл.2).

Як видно з наведених в таблицях даних, найбільш значні антифунгальні властивості виявив штам В-111, а найвищий процент загибелі яблуневої плодожерки і колорадського жука спричиняв штам В-306. Виявлено значну ентомоцидну активність названих штамів відносно ряду шкідників, причому в більшій мірі вона проявлялася у штаму В-306. (табл.3). Жоден з штамів не виявляв антагоністичної дії щодо іншого; вони добре росли у змішаній культурі. На основі обох цих культур і було створено комплексний препарат, названий гаупсином.

Обидва штами депоновані в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номерами 1МВ В-7096 та 1МВ В-7097.

Спосіб одержання гаупсина включає спільне вирощування обох штамів в глибинній культурі на органо-мінеральному середовищі з вмістом загального азоту 1,8-2,5% (в тому числі амінного азоту 0,15-0,30%), редуруючих речовин 1,8-2,5%, сполук фосфору 0,04-0,07%, калію 0,05-0,07%, магнію 0,005-0,01%. Джерелом органічних сполук є побічні продукти харчової промисловості. Як посівний матеріал використовуються бульйонні культури штамів В-111 і В-306, одержані вирощуванням на качалці, з титром 5×10^9 - 1×10^{10} клітин/мл.

Посівний матеріал в кількості 5% від загального об'єму середовища вносили в 100-літровий ферментер з 70л середовища наведеного вище складу. Температура вирощування - 25-27 °, аерація - 1 об'єм повітря на 1об. середовища / хв., перемішування - 250об./хв., тривалість ферментації - 24год.

Спільний ріст бактерій в умовах аерації супроводжується інтенсивним синтезом антибіотично активних феназинових пігментов, про що свідчить оранжево-червоне забарвлення культуральної рідини.

Препарат, одержаний в ферментері, містить $1.0-1.2 \times 10^{11}$ клітин в мл і не поступається за продуктивністю препаратам, одержаним при роздільному вирощуванні штамів В-311 та В-306 (табл.4)

Гаупсин не вірулентний і не токсичний для лабораторних тварин і людини, не виявляє негативної дії на корисні організми біоценозу, може використовуватися в будь-яку фазу розвитку рослин (цвітіння, збір врожаю).

Рідка форма гаупсина - нативна культуральна рідина з клітинами, одержана вирощуванням в балонах на

качалці або культуральна рідина з клітинами з ферментера, розведена водним розчином стабілізатора до титру 1×10^{10} кл./мл, характеризується високим рівнем активності на протязі трьох місяців зберігання при кімнатній температурі.

З використанням рифампіцин-стійких мутантів *Pseudomonas aureofaciens* встановлено, що при обприскуванні листя рослин гаупсин в високих титрах зберігався протягом 7 днів.

Результати польових випробувань рідкої форми гаупсину наведені в табл.5.

Препарат в нормі витрати 2-3л/га ефективно знижував враженість плодів яблуною плодожеркою (92-93%) і грибними захворюваннями (94-96%). В цілому за показниками ефективності щодо плодожерки, гальмування грибних захворювань, врожайності та рентабельності гаупсин не поступався хімічним пестицидам. Встановлено, що поряд з інсекто-фунгіцидними властивостями, гаупсин проявляв стимулюючу дію на рослини (табл.6). Передпосівна обробка насіння гаупсином не лише знижувала ураженість рослин кореневими гнилями, але й підвищувала протягом вегетації їх стійкість до борошнистої роси на зернових, фітофторозу на картоплі, фітофторозу і макроспоріозу на помідорах, що сприяло підвищенню врожайності цих культур на 14-70%.

На протязі останніх років гаупсин також зарекомендував себе проти таких хвороб і шкідників як оїдиум, мільдю, чорна плямистість, сіра гниль, борошниста роса, аскохітоз, вертицильоз, септоріоз, фузаріоз, пероноспороз, тверда сажка, багато видів листокруток, попелиць, п'ядунів, вогнівок, плодожерок та ін. Гаупсин не тільки захищає рослини, гальмує розвиток і поширення хвороби, але й позитивно впливає на саму рослину, "лікує" її.

Гаупсин з успіхом використовується для передпосівної обробки насіння, замочування розсади, обробки виноградних насаджень та лісових масивів від шкідників.

Встановлено, що штами *Pseudomonas aureofaciens* стійкі до засобів хімічного захисту рослин, тому гаупсин сумісний з більшістю фунгіцидів і може використовуватися у вигляді бакових сумішей.

Таблиця 1

Феназінсинтетуюча і антагоністична активність штамів <i>Pseudomonas aureofaciens</i>											
Активність і речовини, які її обумовлюють		NN штаммов									
		B-108	B-109	B-110	B-111	B-112	B-113	B-114	B-306	B-360	B-361
Синтез феназінів, мг/л культурального середовища	Феназін-1 -карбонова кислота	сл**	353	329	520	160	382	354	386	405	250
	2-оксифеназін-1 -карбонова кислота	сл	70	55	128	16	90	60	75	76	38
	2-оксифеназін	-	сл	10	35	-	27	10	20	16	-
Антагонізм щодо фітопатогенних грибів*	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	19	11	>30	0	>30	>30	>30	>30	21
	<i>Trichothecium roseum</i>	0	>30	10	>30	4	13	18	12	13	8
	<i>Verticillium dahliae</i>	2	16	8	>30	0	16	18	16	0	7
	<i>Helminthosporium gramineum</i>	8	>30	>30	>30	5	>30	>30	>30	>30	14
	<i>Mucor plumbeum</i>	7	19	19	>30	6	>30	>30	>30	13	8
Антагонізм щодо фітопатогенних бактерій*	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6	20	>30	>30	5	14	>30	20	>30	10
	<i>Erwinia carotovora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	LO	0
	<i>Erwinia aroidea</i>	0	12	10	22	0	7	12	10	8	8
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	8	>30	>30	>30	10	>30	>30	>30	19	>30
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	6	>30	>30	>30	11	>30	18	16	>30	>30
	<i>Pseudomonas syringae</i>										
		0	18	15	16	8	10	15	13	17	6
	<i>pv. pisi</i>	2	14	0	20	0	18	14	17	10	0
<i>pv. vignae</i>	4	19	12	18	7	9	18	12	12	10	
<i>pv. lachrymans</i>											

* зона затримки росту тест-культур в мм;
** речовина присутня на хроматограмі в слідових кількостях

Таблиця 2

Ентомоцидна активність штамів <i>Pseudomonas aureofaciens</i> щодо гусениці яблуною плодожерки та личинки коларадського жука				
N штама	Гусениці яблуною плодожерки (L5)		Личинки коларадського жука (L4)	
	Загальна смертність, %	Вихід імаго, %	Загальна смертність, %	Вихід імаго, %
B-108	31	69	45	55
B-109	80**	20	30	70
B-110	30	70	30	70
B-111	70**	30	55**	45
B-112	35	65	25	75
B-113	40	60	30	70
B-114	62*	38	50*	50

5

B-306	85**	15	60**	40
B-360	26	74	30	70
B-361	62*	38	40	60
Контроль (без обробки)	25	75	25	74
НСР 0,95	12,2		22,0	
НСР 0,99	22,4		40,4	

* Дані, достовірність яких порівняно з контролем доказана на 95%-ному рівні
** Дані, достовірність яких порівняно з контролем доказана на 99%-ному рівні

10

Ентомоцидна активність штамів <i>Pseudomonas aureofaciens</i>			
Вид комах	Стадія розвитку	СК ₅₀ * для штамів №№	
		B-306	B-111
Свинцево-смуриста листокрутка	L2	1,2	8,7
Сітчаста листокрутка	L2	0,6	11,7
Смородинова криво вуса листокрутка	L3	1,1	16,7
Гронова листокрутка	L2	0,9	2,0
Яблунева плодожерка	L5	0,2	1,7
Сливова плодожерка	L5	0,4	1,4
Яблунева міль	L3	0,4	1,3
Агурсова вогнівка	L4	0,6	10,7
Сливовий п'ядун	L4	0,3	38,3
Колорадський жук	L4	4,2	14,7

*СК₅₀ - кількість клітин в млн./мл, яка зумовлює 50%-ну загибель комах

15

20

25

30

Продуктивність і біологічна активність штамів <i>Pseudomonas aureofaciens</i> УКМ B-111 і УКМ B-306 при роздільному і сумісному культивуванні в умовах аерації				
N штамма	Продуктивність (млрд.клітин в мл) після 24год. росту на кукурузно-мяясному середовищі		Діаметр зони затримки росту <i>Fusarium oxysporum</i>	Смертність гусениць яблуневої плодожерки з
	в балонах на качалці	в ферментері	в мм	поправкою на смертність у контролі
B-111	11,5±1,78	121,8±8,8	48,0	73,3±8,8
B-306	13,2±0,89	114,7±10,2	20,8	96,7±3,3
B-111+B-306	12,9±1,11	119,0±7,8	32,8	91,2±5,7

35

40

У

7

8

С

45

50

55

60

65

Використання гаупсину для захисту плодового саду від яблуневої плодожерки, парші і плодівих гнилей							
Год	Варіант	Норма витрат л/га	Кратність обробок	Врожайність, ц/га	Ураженість плодів зйомного врожаю, - хворобами	%плодожеркою	Біологічна ефективність %
1992*	Контроль	0	0	86,3	6,30	27,9	-
	Гаупсин	3	3	123,6	0,48	1,7	93,6
	Еталон	***	3	120,8	0,50	1,2	95,0
1993**	Контроль	0	0	71,8	14,70	33,1	-
	Гаупсин	2	4	97,9	1,21	1,3	94,8
	Еталон	***	4	98,7	1,04	1,1	95,5
1994*	Контроль	0	0	89,6	8,70	12,2	-
	Гаупсин	2	3	107,8	0,65	0,6	94,0
	Еталон	***	3	107,4	0,60	0,6	94,3
1996**	Контроль	0	0	48,4	6,90	97,6	-
	Гаупсин	3	4	141,4	0,18	8,8	91,4
	Еталон	****	4	169,7	0,16	4,7	95,3
1997**	Контроль	0	0	29,7	11,10	90,7	-
	Гаупсин	3	4	106,7	0,64	9,1	90,4
	Еталон	****	4	181,9	0,52	4,2	95,4

* одне повне покоління яблуневої плодожерки
** два покоління яблуневої плодожерки
*** обробки інсектофунгіцидами в рекомендованих нормах витрат: золон, шерпа, полікарбацин, поліхом
**** обробка інсектофунгіцидами в рекомендованих нормах витрат: золон, карате, шерпа, полікарбацин, скор

У А 7 3 6 8 2 С 2

Таблиця 6

5

10

15

20

Захисна та стимулююча ріст дія гаупсину на сільськогосподарчі культури							
Культура	Спосіб застосування	Норма витрати	Рік	Схожість насіння, % до контролю	Зниження ураженості рослин, % до контролю		Прибавка урожаю %до контролю
					кореневими гнилями	іншими хворобами	
Озима пшениця	обробка насіння	0,5л/т	2001,	+ 25,0	52,0	56,5*	14,3
			2002	+ 31,0	89,5	70,0*	33,7
Ярий ячмінь	обробка насіння	0,5л/т	2002	+ 6,6	33,3	-	70,6
Огірки	обробка насіння	4-5 мл/кг	2001	+16,0	85,7	-	64,0
			2002	+28,0	50,0	-	57,0
Томати	внесення в лунки при висадці розсади	0,01% -на суспензія, 50мл на рослину	2002,	-	-	64,0**	60,6
			2003	-	-	47,0***	37,8
Картопля	обробка бульб	0,35л/т	2002	-	-	25,0**	15,7

* - борошниста роса

** - фітофтороз

*** - макроспоріоз

.

Формула винаходу

25

Інсектофунгіцидний біопрепарат для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур, який відрізняється тим, що містить у своєму складі штами *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7096 та *Pseudomonas aureofaciens* IMB B-7097.

30

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

35

40

45

50

55

60

65