

(19)



(10)

LT 4560 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4560**

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 1/00**
B09C 1/10

(21) Paraiškos numeris: **98-208**

(22) Paraiškos padavimo data: **1998 12 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 07 26**

(45) Patento paskelbimo data: **1999 10 25**

(72) Išradėjas:

Albinas Lugauskas, LT
Olga Salina, LT

(73) Patento savininkas:

Botanikos institutas, Žaliųjų ežerų g. 49, 2021 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Virgina Adolfina Draugelienė, 8, UAB "TARPINĖ"
A.P.Kavoliuko g. 24-152, 2050 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

IBL: C82-93, Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos
kolekcija, LT

(54) Pavadinimas:

***Trichoderma harzianum* C82-93 kamienas, slopinantis fitopatogeninių**
mikroorganizmų vystymąsi, jo gavimo būdas ir panaudojimas

(57) Referatas:

Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos sritims, būtent mikroorganizmų kamienams, slopinantiems fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi, jų gavimo būdai ir gali būti panaudotas organinių medžiagų utilizacijai, augalų apsaugai nuo ligų sukėlėjų ir kt. *Trichoderma harzianum* C82-93 kamienas, slopinantis fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi gamtiniuose substratuose (deponuotas Botanikos Instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, LT, kolekcijos Nr. C82-93) gautas iš Kauno botanikos sode esančių durpių, naudojamas pagreitinti komposto ruošimą, tam *Trichoderma harzianum* C82 kamieno biomasę auginama laboratorinėmis sąlygomis, po to ruošia užaugintos grybo biomasės vandeningą suspensiją, iš anksto paruoštą apie 2-3 m³ substratą užkrečia grybu, po to substratą permaišo, esant natūralioms sąlygoms, palaiko jo drėgmę ir temperatūrą, tinkamą daugintis grybui, kol grybas kolonizuoja visą substratą, paruoštą užkratą (substratą) santykiu apie 1:3 sumaišo su paruošta kompostavimui mase ir natūraliomis sąlygomis, tinkamomis grybui daugintis, paruošia naudojimui tinkamą kompostą. Paruoštas kompostas naudojamas augalų apsaugai nuo ligų sukėlėjų, sliekų auginimui, dirvos tęsimui.

Išradimas priklauso mikrobiologijos, biotechnologijos sritims, būtent mikroorganizmų kamienams, slopinantiems fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi, jų gavimo būdui ir gali būti panaudotas organinių medžiagų utilizacijai bei utilizacijos proceso pagreitinimui.

Žinomas *Trichoderma viride* BKM F-2636Д kamienas, aprašytas TSRS a.l. Nr.260370 išradimo aprašyme (deponuotas mikroorganizmų kolekcijoje Пушино, Московская обл). Šis kamienas yra sintetinių polimerinių medžiagų biodestruktorius ekstremaliomis sąlygomis, skirtas, pavyzdžiui, patikrinti naudojamų medžiagų atsparumą mikroorganizmų poveikiui kosmoso sąlygomis, tačiau yra neefektyvus gamtinių substratų destruktorius.

Žinomas *Trichoderma viride* BKM F-2904Д kamienas, aprašytas TSRS a.l. Nr.291054 išradimo aprašyme (deponuotas mikroorganizmų kolekcijoje Пушино, Московская обл). Šis kamienas yra sintetinių polimerinių medžiagų biodestruktorius ekstremaliomis sąlygomis, skirtas, pavyzdžiui, patikrinti naudojamų medžiagų atsparumą mikroorganizmų poveikiui kosmoso sąlygomis, tačiau yra neefektyvus gamtinių substratų destruktorius.

Žinomi *Trichoderma polysporum* ATCC 20852 ir *Trichoderma viride* ATCC 20853 kamienai, aprašyti JAV patento Nr. 5 192 686 išradimo aprašyme (deponuotas American Type Culture Collection), naudojami augalų rizosferos apsaugai nuo šaknų ligų sukelėjų.

Šių kamienų esminis trūkumas - siauras antibiotinio veikimo spektras ir gana ribota panaudojimo sritis.

Artimiausias savo veikimu siūlomam kamienui yra *Trichoderma viride* M10 ("Moldova") kamienas, pasižymintis antibiotiniu aktyvumu. Šio kamieno pagrindu Kėdainių biochemijos gamykla gamino biopreparatą "Trichoderminas", kurį naudojo augalų apsaugai nuo ligų.

Šio kamieno pagrindinis trūkumas - nedidelis jo fermentinis ir antibiotinis aktyvumas, dėl šių savybių kamieno panaudojimo sfera yra siaura. Kamienas silpnai utilizuoja organines atliekas.

Išradimo tikslas - išskirti kamieną, kuriam būdingas didesnis fermentinis ir antibiotinis aktyvumas, įgalinantis praplėsti jo panaudojimo sferą, būtent slopinti fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi ir pagreitinti organinių medžiagų utilizaciją.

Siūlomas mikroorganizmo kamienas buvo išskirtas iš Kauno Botanikos sode esančių durpių. Išskyrimo būdas apima durpių vandeninės suspensijos paruošimą, paruoštos durpių suspensijos užsėjimą ant agarizuotų alaus misos ir Čapeko terpių, naudojamų grybo populiacijos išgryninimui ir monosporinės kultūros išskyrimui, grybo kultūros auginimą termostate $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūroje apie šešias paras ir kamieno identifikavimą pagal kultūrinius ir morfologinius požymius, naudojant M.A. Rifai klasifikaciją.

Kamienas deponuotas Botanikos instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijos mikroorganizmų kolekcijoje, kolekcinis numeris C82-93.

Siūlomas mikroorganizmo *Trichoderma harzianum* C82-93 kamienas auginant ant skirtingų terpių pasižymi žemiau išvardintomis savybėmis.

Agarizuota alaus misos terpė. Kamieno kolonijos auga labai greitai, po trijų parų augimo įgyja 9 cm diametrą. Sporuliuojančio grybo kolonijos paviršius tampa panašus į tamsiai žalios spalvos tankią velėną, kurią sudaro susijungę purūs gumulėliai. Orinis micelis yra neaukštas. Apatinė kolonijos pusė - bespalvė. Kultūros kvapas specifinis, primena kokoso kvapą.

Agarizuota Čapeko mineralinė terpė. Kamieno kolonijos auga lėčiau ir 9 cm diametrą įgyja po 4-5 parų augimo. Sporuliuojančios zonos sudaro koncentriškus ratus. Laikui bėgant, sporuliuojančių zonų spalva nuo šviesiai žalios pasikeičia į ryškiai žalią, o vėliau į tamsiai žalią. Kolonijos centrinė dalis išlieka šviesiai žalios spalvos. Apatinė kolonijos pusė - bespalvė.

Agarizuota bulviu - sacharozės terpė. Kamieno kolonijos auga greitai, gausus orinis micelis. Konidijos susidaro 3-ojoje augimo paroje. Persėjant padidėja kultūrinių-morfologinių savybių kintamumas.

Grifai septuoti, išsišakoję, lygiasieniai, bespalviai, 1,5-12 μ skersmens. Šoninės šakelės dažniausiai išsidėsčiusios grupėmis po 2-3.

Fialidės trumpos, kėglių pavidalo, jų pagrindas siauresnis nei vidurinioji dalis, kuri staigiai pereina į konuso formos smailėjantį kaklelį, 5-7 x 3-3,5 μ dydžio, dažniausiai išsidėsto grupėmis po 5, taip pat gali būti pavienės ir nereguliariai išsidėsčiusios išilgai mažesnių šoninių šakelių. Konidijakočių šakelių gale fialidės yra paprastai ilgesnės ir plonesnės, iki 18 x 2,5 μ .

Kolonijos smulkios, rutulio arba kiaušinio formos, dažnai su nusklembtu pagrindu, lygiasienės, šviesiai žalios, sankaupoje - žalios spalvos, išsidėsčiusios fialidžių viršūnėse ir sudaro rutulio pavidalo netikras galvutes. Vidutiniškas kolonijų dydis - 3,2 x 2,5 μ .

Chlamidosporos dažniausiai interkaliarinės, apvalios. lygiasienės iki 12 μ skersmens.

Fiziologinės savybės.

Anglies šaltiniai: kamienas gerai įsisavina gliukozę, ksilozę, manitą. Silpnai įsisavina organinių rūgščių druskas, maltozę ir gliceriną.

Azoto šaltiniai: kamienas gerai įsisavina peptoną, asparaginą, gliutomino rūgštį, gliceriną, NaNO_3 . Silpnai įsisavina amonio druskas: $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ ir $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Kamienas gerai auga ant kietų gamtinių substratų, pavyzdžiui, ant rugių grūdų ir panašiai. Kamieno augimo maksimali temperatūra yra 32 - 35°C, minimali yra 5-7°C. Kamienas auga labai skirtingo rūgštingumo terpėse, kurių pH nuo 3,0 iki 9,2. Optimalus rūgštingumas - pH = 5 - 6,5.

Fermentinis aktyvumas. Kamieno celiuliazinis aktyvumas buvo vertinamas pagal augimą ant filtrinio popieriaus, o taip pat pagal indikatoriumi *Congo red* nudažomų zonų dydį, kultivuojant grybą ant terpės su 1,0 % NaKMC (karboksilmetilceliuliozė). Kiekybiniam celiuliazinio aktyvumo (endo-1,4-β-gliukonazės) nustatymui panaudotas viskozimetrinis metodas Na-KMC klampumo mažėjimas fermento įtakoje. Kamieno endogliukonazinis aktyvumas prie 28°C temperatūros yra 55 % ir prie 40°C temperatūros - 72,5 %.

Proteolitinio aktyvumo nustatymui panaudotas modifikuotas Ansono metodas.

Amilazinis, lipazinis, tirazinazinis, laktazinis fermentinis aktyvumas ir organinių rūgščių biosintezė įvertinta kokybinės analizės metodais.

Siūlomas kamienas pasižymi aukštu amilaziniu aktyvumu, aktyviai produkuoja proteazę ir organines rūgštis. Tirazinazės ir laktazės biosintezė šiam kamienui yra mažiau būdinga.

Rūšis	Kamieno Nr.	Proteolitinis aktyvumas vnt./ml	endo-1,4-β-gliukonazinis aktyvumas %	
			28°C	40°C
<i>Trichoderma harzianum</i>	C82-93	35,6	55,0	72,5
<i>Trichoderma viride</i>	M-10	19,2	22,7	36,3

Antagonistinės savybės. Kamienui yra būdingas aukštas antibiotinis aktyvumas tokiems fitopatogeniniams grybams kaip: *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani*,

Fusarium sp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Sclerotinia sp.*, *Alternaria alternata*. Fitopatogeniniai grybai buvo išskirti iš sergančių augalų rizosferos bei nuo jų šaknų arba kitų augalų dalių.

Siūlomo *Trichoderma harzianum* C82-93 ir *Trichoderma viride* M10 kamienų antibiotinio aktyvumo palyginimas pateiktas lentelėje. Lentelėje pateikti rezultatai buvo gauti panaudojus "difuzijos į agarą" metodą.

Test - kultūra	Slopinimo zona, mm	
	<i>Trichoderma harzianum</i> C82	<i>Trichoderma viride</i> M10
<i>Fusarium culmorum</i> 36	56	40
<i>F. oxysporum</i> 11	29	15
<i>Fusarium sp.</i> 20	48	20
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 4A	34	27
<i>Botrytis cinerea</i> 7B	56	42

Aukščiau pateiktų duomenų apibendrinimas rodo, kad siūlomas kamienas *Trichoderma harzianum* C82-93 turi žymiai didesnę fermentinę ir antibiotinę aktyvumą nei *Trichoderma viride* M10 kamienas ir gali būti naudojamas organinių medžiagų atliekų utilizacijai.

Antibiotinės kamieno savybės leidžia kamienui geriau adaptuotis ir išgyventi naujomis sąlygomis, pavyzdžiui, užkrečiant kamieniu utilizuojamą substratą.

Fermentinės kamieno savybės pagreitina utilizuojamo substrato destrukciją.

1 pavyzdys.

Siūlomo *Trichoderma harzianum* C82-93 kamieno panaudojimo organinių medžiagų utilizacijai būdas.

Substrato užkratui grybo biomasę augina laboratorijoje steriliomis sąlygomis. Tam naudoja agarizuotas mitybos terpes (alaus misa, Čapeko terpė ir kt.). Po 5-6 parų grybo kultivavimo 26 - 28°C temperatūroje ruošia suspensiją. Grybo micelį ir konidijas nuo agarizuotos terpės paviršiaus nuplauna steriliu vandeniu, po to suspensiją gerai išmaišo. Didelio substrato kiekio užkratui suspensiją praskiedžia išlaikant 1 ml grybo pradų titrą nemažesnę negu $15-10 \times 10^7$. Pavyzdžiui, 1 l talpos inde gautą užauginto grybo suspensiją galima praskiesti 10-12 kartų.

Paruošia substratą, tam ,pavyzdžiui, kiaulių mėšlą sumaišo su pjuvenomis ir suformuoja substrato 2-3 m³ krūvą.

Vykdo pirminį substrato užkretimą grybu, tam substratą laisto arba apipurškia grybo suspensija (20 l / 3,0 m³) ir gerai permaišo. Užkrėstą grybu substratą natūraliomis sąlygomis (esant 15-30°C temperatūrai, palaikant atitinkamą substrato drėgmę, vengiant substrato išdžiuvimo ir per didelio drėgmės kiekio jame), laiko 2 savaites ir ilgiau, kol mikrobiologiniai tyrimai parodo, kad grybas kolonizavo substratą ir prislopino kitų mikroorganizmų vystymąsi. Tuomet substratą naudoja kaip užkratą didesniems substrato kiekiams užkrėsti.

Vykdo antrinį substrato užkretimą grybu, tam paruoštą užkratą gerai sumaišo (perkasa) su paruošta kompostavimui mase santykiu apie 1:3. Natūraliomis palankiomis sąlygomis substratas kolonizuojamas grybu per 10-20 dienų.

Aukščiau aprašytu būdu paruoštame substrate, lyginant su kontroliniu pavyzdžiu, kuriame nebuvo *Trichoderma harzianum* C82-93 grybo užkrato, vidutiniškai sumažėjo lignino kiekis 22,4%, celiuliozės -19,7%. Po 20-30 dienų grybu užkrėsta mėšlo masės konsistencija pastebimai pasikeitė, suminkštėjo ir tapo tinkama sliekų veisimui, laukų

tręsimui, kaip biopreparatas augalų apsaugai nuo ligų sukėlėjų, arba kompostų gamybai (augalinių atliekų kompostavimui).

2 pavyzdys.

Aukščiau aprašyto komposto, praturtinto *Trichoderma harzianum* C82-93 grybu panaudojimas augalų apsaugai.

Šiltnamiuose ir atvirame grunte kompostas dedamas po augalo šaknimis (apie 0,5 kg/m²) prieš sodinant daržovių daigus. Daigynuose kompostas sumaišomas su dirvožemiu santykiu apie 1:3 ir dedamas prieš sėjant sėklas arba sodinant daigus. Sodinant vaiskrūmius bei vaismedžius į duobę dedama apie 2 kg komposto (dedamo komposto kiekis dar priklauso nuo organinių medžiagų kiekio esančio dirvožemyje). Naudojant nurodytus komposto kiekius, žymiai sumažėjo augalų ir vaiskrūmių pažeidimai fitopatogenais *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani*, *Fusarium sp.*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Sclerotinia sp.*, *Alternaria alternata*.

3 pavyzdys.

Sliekų auginimui paruoštas kompostas dedamas į sliekams auginti skirtas lysves 15 cm aukščio sluoksniu, kai sliekai įveisiami nuo pavasario iki rudens ir 25-30 cm aukščio sluoksniu, kai sliekai įveisiami žiemą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. *Trichoderma harzianum* C82-93 kamienas, slopinantis fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi gamtiniuose (organiniuose) substratuose (deponuotas Botanikos Instituto Biodestruktorių tyrimo laboratorijoje, LT, kolekcijos Nr. C82-93).

2. *Trichoderma harzianum* C82-93 kamieno gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad apima durpių (Kauno Botanikos sodas) mėginio vandeninės suspensijos paruošimą, paruoštos suspensijos užsėjimą ant agarizuotų alaus misos ir Čapeko terpių, naudojamų grybo populiacijos išgryninimui ir monosporinės kultūros išskyrimui, grybo kultūros auginimą termostate $26 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje apie šešias paras ir aktyviausiai slopinančio fitopatogeninių mikroorganizmų vystymąsi, mikroorganizmo kamieno atrinkimą pagal kultūrinius ir morfologinius požymius naudojant M.A. Rifai klasifikaciją.

3. *Trichoderma harzianum* C82-93 kamieno panaudojimo komposto ruošimui būdas, besiskiriantis tuo, kad *Trichoderma harzianum* C82-93 kamieno biomasę augina laboratorinėmis sąlygomis, naudojant mitybines terpes ir tam tikrą laiką sudarant tinkamą augimui temperatūrą, po to ruošia užaugintos grybo biomasės vandeninę suspensiją, kurioje grybo pradų titras 1ml būtų ne mažesnis kaip $15-10 \times 10^7$, iš anksto paruoštą apie $2-3 \text{ m}^3$ substratą užkrečia grybu jį laistant arba purškiant gauta suspensija, po to substratą permaišo ir esant natūralioms sąlygoms palaiko jo drėgmę ir temperatūrą tinkamą daugintis grybui, kol grybas kolonizuoja visą substratą, paruoštą užkratą-substratą santykiu apie 1:3 sumaišo su paruošta kompostavimui mase ir natūraliomis sąlygomis, tinkamomis grybui daugintis, per laiką, pakankamą grybui kolonizuoti, paruošia naudojimui tinkamą kompostą.

4. Paruošto komposto pagal 3 punktą panaudojimas augalų apsaugai nuo ligų sukėlėjų.

5. Paruošto komposto pagal 3 ir 4 punktus panaudojimas augalų apsaugai nuo pilkojo puvinio, fuzariozės, alternariozės, sklerotinio puvinio ligų.

6. Paruošto komposto pagal 3 punktą panaudojimas sliukų auginimui.

7. Paruošto komposto pagal 3 punktą panaudojimas dirvų tręšimui.