

Корисна модель стосується способів зберігання сільськогосподарської продукції землеробства та садівництва, зокрема - способів обробки плодів і овочів для їх зберігання з використанням в складі засобу пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp., і може бути використана в агропромисловому комплексі і торгових мережах для збільшення термінів зберігання овочів і фруктів.

Ефективність використання окремих штамів бактерій роду *Bacillus* spp. проти збудників захворювань різних видів плодів і овочів науково доведена. Зокрема, переконливо підтверджена ефективність штаму *Bacillus subtilis* щодо наступних збудників захворювань: грибів *Fusarium verticillioides* та *F. Verticillioides*, що викликають фузаріоз (Cavaglieri L., Orlando J. et al., 2005) та *Botrytis cinerea*, збудника сірої гнилі багатьох рослин (Chen X., Li J. et al., 2012), фітопатогенних грибів (Pat. 02140138, 1999), іржавинних грибів *Pucciniarecondita*, збудників борошнистої роси *Erysiphe graminis* і фітофторозу розсади *Fusarium culmorum culmorum* (Pat. 02259397, 2005). Встановлено також, що штам *Bacillus subtilis* ефективен в боротьбі з патогенами на томатах, зокрема *B. cinerea* до 61 % (On A., Wong F. et al., 2015). Також доведено інгібуючий вплив обробки томатів штамом *Bacillus subtilis* на розвиток захворювань, що викликаються *Penicillium* sp. і *Rhizopus stolonifer* (Punja Z. K., Rodriguez G. et al., 2016). Встановлено протигрибкову активність штаму *Bacillus subtilis* в боротьбі проти клітинних захворювань яблук (Fan H., Ru J. et al., 2017), а також ефективність щодо біоконтролю захворювань картоплі, що викликаються *Rhizoctonia solani* (Khedher S.B., Kilani-Feki O. et al., 2015). Вивчено антагоністична активність штаму *Bacillus subtilis* щодо грибка *Alternaria alternata*, що викликає захворювання листя гірчиці (Sharma N., Sharma S., 2008), та по відношенню до таких фітопатогенних мікроорганізмів бобів, як *Fusarium solani* (Estevez de Jensen C., Percich J. A. et al., 2002). Відома також ефективність використання штаму *Bacillus amyloliquefaciens* проти збудників сірчаної форми на свіжих томатах (Mari M., Guizzardi M. et al., 1996).

Відомий спосіб профілактики і лікування мікробіологічних захворювань черешні та її консервування після збору врожаю (міжнародна заявка № WO2022042121A1, МПК A01N 63/22, A01P 3/00, A23B 7/155, дата публікації 03.03.2022), за яким використовують засіб, що містить штам *Bacillus velezensis* TA-3-BV з нуклеотидною послідовністю 16s рДНК *Bacillus velezensis* TA-3-BV, що вказана в SEQ ID № 1. Засіб використовують для консервування черешні після збору врожаю шляхом інгібування грибового захворювання, яке викликається *Rhizopus stolonifer*.

Недоліком відомого способу є обмежений спектр захисної дії, обумовлений виборчої активністю штаму пробіотичних бактерій *Bacillus velezensis* TA-3-BV відносно грибової цвілі, що викликається *Rhizopus stolonifer*.

Відомий спосіб збереження свіжості при зберіганні фруктів та овочів (патент № CN113502240A, МПК A01N 63/22, A01P 3/00, A23B 7/155, дата публікації 15.10.2021), за яким використовують складений біологічний консервант у вигляді бактеріальної рідини або порошку штамів пробіотичних бактерій *Bacillus subtilis* і *Bacillus velezensis*, де *Bacillus subtilis* - це *Bacillus subtilis* з консерваційним номером CCTCC №: M 2021642 (*Bacillus subtilis*) NBL-B12005, а *Bacillus velezensis* - це *Bacillus velezensis* K-2000 і *Bacillus subtilis*, номер збереження cctcc №: m 2021642 (*Bacillus subtilis*) NBL-b12005.19 з номером депозиту cctcc no: m2020672. Співвідношення компонентів штамів *Bacillus subtilis* NBL-B12005 і *Bacillus velezensis* до-19 становить 1:1, виходячи з кількості життєздатних бактерій. Засіб використовують у вигляді бактеріального порошку або ферментаційного бульйону, який змішують з іншими допоміжними матеріалами. Засіб використовують для консервування фруктів, включаючи, персик і полуницю.

Недоліками відомого способу є:

- обмежений спектр захисної дії, обумовлений виборчої активністю штамів пробіотичних бактерій *Bacillus subtilis* і *Bacillus velezensis*;

- досить великі витрати на використання способу, що обумовлені необхідністю обробки листя і фруктів на рослинах перед збором врожаю, а також великою витратою засобу в зв'язку з необхідністю їх обробки не менше двох разів.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу обробки плодів і овочів для їх зберігання за рахунок використання як засобу іншої композиції штамів бактерій роду *Bacillus* spp.

Технічний результат від реалізації поставленого завдання полягає у розширенні спектру протигрибкової і антибактеріальної дії способу, що дозволяє використовувати його для обробки широкого кола плодів і овочів при їх зберіганні при одночасному забезпеченні тривалого пролонгованого періоду дії за рахунок використання в засобі більш широкої композиції штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp.

Поставлена задача вирішується тим, що за способом обробки плодів і овочів для їх зберігання, що включає обробку плодів і овочів засобом, що містить діючу речовину у вигляді композиції штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp, що містить штам *Bacillus subtilis*, згідно з корисною моделлю композиція штамів бактерій роду *Bacillus* spp. додатково містить штами *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* і *Bacillus megaterium*, а засіб використовують у вигляді суспензії зазначених штамів у споровій формі при концентрації від $1,5 \times 10^7$ до 5×10^9 КУО/мл суспензії і масовому співвідношенні кожного з них 20,0+5,0 мас. %.

При цьому доцільно, щоб обробку плодів і овочів здійснювали шляхом розпилення засобу.

Сукупність істотних ознак заявленого способу обробки плодів і овочів для їх зберігання дозволяє вирішити поставлену задачу. При проведенні тестування заявленої композиції пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. несподівано було встановлено, що при об'єднанні штамів *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* і *Bacillus megaterium* їх загальний антибактеріальний потенціал значно вище, ніж потенціал кожного з штамів, що утворюють композицію. Синергічний ефект при використанні зазначеної композиції полягає в тому, що штами доповнюють один одного по спектру антагоністичної активності, виробленню ферментів і амінокислот. Це дозволяє суттєво розширити протигрибкову і антибактеріальну дію способу за рахунок запобігання утворенню патогенної біоплівки або руйнування змішаної біоплівки та індукування процесу деградації широкого кола мікроорганізмів, присутніх на поверхні плодів і овочів, а також на поверхні тари і обладнання в приміщеннях для їх зберігання. Заявлена в способі концентрація композиції штамів бактерій роду *Bacillus* spp. спрямована на забезпечення оптимального ефекту при його використанні.

Спосіб пояснюється на прикладі використання засобу для обробки плодів і овочів при їх зберіганні, розробленого Заявниками.

Штами пробіотичної композиції *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* і *Bacillus megaterium* отримують шляхом культивування відповідно до способів, добре відомих в даній області, в тому числі з використанням середовища та інших методів, наприклад шляхом ферментації в зануреному стані, ферментації в твердому стані або культивування на рідкій поверхні. Ферментація призначена для отримання високих концентрацій колонієутворюючих одиниць клітин і для стимулювання споруляції. Приготування засобу здійснюють змішуванням відомим способом з використанням загальноприйнятих технологічних прийомів штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. у співвідношенні кожного з них 20,0+5,0 мас. % з очищеною водою до отримання їх концентрації від $1,5 \times 10^7$ до 5×10^9 КУО/мл суспензії.

Після виготовлення засіб розфасовують в ємності або аерозольні балончики для використання в місцях перебирання плодів і овочів або місцях зберігання в торгових мережах. При використанні в промислових обсягах, наприклад, на підприємствах агропромислового комплексу, засіб розфасовують в ємності для подальшого використання в пристроях для аерозольного розпилення у приміщеннях для зберігання або для нанесення іншим способом. В обмежених обсягах засіб використовують звичайним способом шляхом його розпилення в рідкому вигляді на поверхню плодів і овочів з подальшою упаковкою в плівковий матеріал або зберіганням без упаковки.

При використанні засобу на поверхні плодів або овочів утворюється вологе середовище, яке сприяє досить швидкій трансформації спор штамів бактерій роду *Bacillus* spp. у вегетативні форми. Дія пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. складається з взаємозв'язаних етапів: на першому, оскільки згадані бактерії є аеробами, то в процесі вегетації вони утворюють на обробленій поверхні захисну біоплівку, яка запобігає інфікуванню поверхні мікроорганізмами, на другому - в результаті ферментативної активності відбувається руйнування змішаної біоплівки і індукування процесу деградації мікроорганізмів, присутніх на обробленій поверхні, а на третьому етапі - забезпечується пролонгована антибактеріальна дія засобу.

Випуск засобу у вигляді розчину, у тому рахунку в аерозольній упаковці, дозволяє наносити його безпосередньо на поверхню плодів і овочів при зберіганні, а також на поверхню пристроїв і обладнання, яке знаходиться в контакт з цими продуктами. При цьому досягається наступне:

- фізична і мікробіологічна ізоляція оброблюваної поверхні;
- хороша адгезія до оброблюваної поверхні;
- можливість пролонгованої дії;
- простота використання.

Ефективність способу, який заявляється, підтверджена результатами представницьких досліджень безпеки використання зазначених штамів бактерій роду *Bacillus* spp. для харчових продуктів та протигрибкової і антибактеріальної активності пробіотичної композиції. Для дослідження використовували штами бактерій роду *Bacillus* spp. із колекції мікобактерій BCCM Bacteria Collec50n (Бельгія). Дослідження проведено кафедрою землеробства та агрохімії Полтавської Державної аграрної Академії.

Дослідження безпеки використання штамів бактерій роду *Bacillus* spp. передбачало ідентифікацію бактеріального середовища зазначених штамів способом секвенування 16s рДНК та оцінку їх токсигенного потенціалу шляхом аналізу вивільнення ЛДГ у клітинах Vero відповідно до рекомендацій Європейського управління з безпеки харчових продуктів (EFSA, журнал EFSA, 2014; 12(5):3665). За результатами секвенування всі штами кваліфіковані як імовірно безпечні. За результатами оцінки токсигенного потенціалу вони визнані як не цитотоксичні по відношенню до клітин Vero in vitro.

Мета дослідження протигрибкової і антибактеріальної активності пробіотичної композиції зазначених штамів бактерій роду *Bacillus* spp. полягала в оцінці її ефективності відносно шкідливих мікроорганізмів, які є збудниками широко поширених захворювань. Результати випробувань наведені в таблиці.

Таблиця

Складний тест на	Оцінка активності
<i>Fusarium cubense</i>	+
<i>Phytophthora</i>	+
<i>Salmonella</i>	++
<i>Pseudomonas</i>	+
<i>Pythium</i>	+
<i>Trichoderma aggressivum</i>	+/-
<i>Trichoderma hazarium</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	++
<i>Escherichia coli</i>	+/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	++
<i>Candida albicans</i>	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	++

Примітки:

- ++ сильна позитивна активність, + позитивна активність,
- +/- слабка позитивна активність.

З наведених даних видно, що заявлена композиція штамів бактерій роду *Bacillus* spp. проявляє сильну позитивну активність щодо більшості поширених і шкідливих захворювань, а також умовно-патогенних і патогенних, грампозитивних і грамнегативних бактерій, що становлять небезпеку для людини. До них належать:

- *Salmonella* - кишкові бактерії, що викликають гостре інфекційне захворювання шлунково-кишкового тракту;
- *Staphylococcus aureus* - золотистий стафілокок, здатний виробляти стійкість до антибіотиків різних груп і антисептиків;
- *Enterococcus faecalis* - вид ентерококів, який може бути збудником різних інфекцій, у тому числі сечовивідних шляхів, інтраабдомінальних, органів малого тазу, ранових, ендокартиту;
- *Pseudomonas aeruginosa* - синьогнійна паличка, яка входить до групи найнебезпечніших мікробів для населення розвинених країн, що викликають широке коло захворювань - від загальних інтоксикацій до великих гнійно-запальних процесів;
- *Streptococcus pyogenes* - піогенний стрептокок-бактерія, збудник гнійно-запальних захворювань;
- *Candida albicans* - диплоїдний грибок, збудник опортуністичних інфекцій людини, які передаються через рот і геніталії;
- *Enterobacter cloacae* - умовно-патогенний мікроб, який може викликати інфекційні захворювання сечостатевої та респіраторної систем людини, включаючи аспіраційну пневмонію.

Позитивна активність композиції штамів бактерій роду *Bacillus* spp. проявляє щодо наступних бактерій:

- *Fusarium cubense* - грибовий рослинний збудник, який викликає панамську хворобу бананів;
- *Phytophthora* - рід пошкоджуючих рослини ооміцетів (водних мохів), які викликають захворювання картоплі, сої, перцю, декоративних і лісових дерев;
- *Pseudomonas* - великий рід грамнегативних, хемоорганотрофних паличкоподібних бактерій, найбільш клінічно значущим видом яких є *Pseudomonas aeruginosa* - синьогнійна паличка;
- *Pythium* - рід мікроскопічних грибів з відділу ооміцети, які негативно впливають на рослини, викликаючи різні захворювання, включаючи пітіозну кореневу гниль;
- *Trichoderma hazarium* - ґрунтовий гриб, здатний швидко колонізувати навколишнє середовище, запобігаючи розмноженню інших мікроорганізмів в тому ж середовищі існування.

Слабка позитивна активність композиції штамів бактерій роду *Bacillus* spp. виявлена відносно двох наступних видів бактерій:

- *Trichoderma aggressivum* - вид мікроскопічних грибів, який викликає зелену цвіль і небезпечний для вирощування грибів;
- *Escherichia coli* - кишкова паличка, деякі штами якої можуть викликати інфекцію в травному тракті, сечовивідних шляхах та багатьох інших частинах тіла.

Таким чином, отримані експериментальні результати переконливо показали, що використання в способі зазначених п'яти зазначених штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. демонструє значну протигрибкову і антибактеріальну дію, що дозволяє знищувати або попереджати розвиток

великого спектру грибів і патогенних мікроорганізмів, які можуть утворюватися при зберіганні овочів і фруктів.

Заявлений спосіб розширює коло відомих способів обробки плодів і овочів при зберіганні з використанням діючої речовини у вигляді заявленої композиції штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. Об'єднання в складі діючої речовини більш широкої композиції штамів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* spp. в споровій формі значно розширює спектр дії засобу і підвищує ефективність його протигрибкової і антибактеріальної дії за рахунок синергічного доповнення один до одного штамів по спектру антагоністичної активності, виробленню ферментів і амінокислот при одночасному забезпеченні тривалого пролонгованого періоду дії засобу. Це дозволяє також збільшити область застосування способу для обробки широкого кола плодів і овочів при їх зберіганні.