



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022121279, 03.08.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.08.2022

Дата регистрации:
08.06.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.08.2022

(45) Опубликовано: 08.06.2023 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Малкова Ангелина Владимировна (RU),
Ирkitова Алена Николаевна (RU),
Евдокимов Иван Юрьевич (RU),
Ширманов Максим Вячеславович (RU),
Дудник Дина Евгеньевна (RU),
Каргашилова Екатерина Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: КОРНЕВА О.Г., и др.,
Эффективность применения биопрепаратов
для защиты картофеля от болезней в условиях
дельты волги, Вестник Мичуринского
государственного аграрного университета,
2019, N 2., с. 69-72. RU 2764695 C1, 19.01.2022.
POGACEAN M.O., et al., Plant protection
products and their sustainable and
environmentally friendly use, Environmental
(см. прод.)

(54) Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05516 для защиты растений от фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и стимуляции роста растений

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой штамм бактерий *Bacillus pumilus*, обладающий антагонистическим действием против фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., задепонирован в Сетевой биоресурсной коллекции

в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM) под регистрационным номером RCAM05516. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05516 может быть использован для разработки микробных биопрепаратов с целью защиты растений от грибных инфекций и фитостимулирования. 1 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):

Engineering and Management Journal, 2009., vol. 8. - Is. 3. - P. 607-627. doi: 10.30638/eemj.2009.084.

RU 2 797 825 C1

RU 2 797 825 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/20 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022121279, 03.08.2022**

(24) Effective date for property rights:
03.08.2022

Registration date:
08.06.2023

Priority:

(22) Date of filing: **03.08.2022**

(45) Date of publication: **08.06.2023** Bull. № 16

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPPTUIS**

(72) Inventor(s):

**Malkova Angelina Vladimirovna (RU),
Irkitoва Alena Nikolaevna (RU),
Evdokimov Ivan Yurevich (RU),
Shirmanov Maksim Vyacheslavovich (RU),
Dudnik Dina Evgenevna (RU),
Kargashilova Ekaterina Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **BACILLUS PUMILUS RCAM05516 BACTERIAL STRAIN FOR PLANT PROTECTION AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI PHYTOPHTHORA INFESTANS, ALTERNARIA SP., ASPERGILLUS SP., PENICILLIUM SP. AND STIMULATION OF PLANT GROWTH**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a bacterial strain of *Bacillus pumilus*, which has an antagonistic effect against phytopathogenic fungi *Phytophthora infestans*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, deposited in the Network Bioresource Collection in the field of genetic technologies for agriculture (RCAM)

under registration number RCAM05516.

EFFECT: bacterial strain *Bacillus pumilus* RCAM05516 can be used to develop microbial biopreparations to protect plants from fungal infections and phytostimulation.

1 cl, 1 dwg, 2 tbl

Изобретение относится к микробиологии и сельскохозяйственной биотехнологии, в частности касается нового природного штамма бактерий вида *Bacillus pumilus* в качестве действующего компонента для разработки биопрепарата, направленного на стимуляцию роста и защиту растений от грибных инфекций.

5 Актуальным трендом в современном сельском хозяйстве является применение микробных биопрепаратов для стимуляции роста и защиты растений от инфекций. Их нарастающая популярность обусловлена большей экологичностью и безопасностью для окружающей среды по сравнению с химическими пестицидами и удобрениями [1, 2, 3]. В качестве активных компонентов микробных биопрепаратов выступают бактерии 10 рода *Pseudomonas*, грибы рода *Trichoderma* и пр [4, 5]. Однако наибольшую популярность получили бактерии р. *Bacillus* за счет своей неприхотливости при культивировании, способности к спорообразованию и высокой биологической активности. На отечественном рынке известны биопрепараты, содержащие в своем составе бацилл («Фитоспорин-М», «Бактофит», «Гамаир» и др.) [6], но пул биологических препаратов 15 и используемых штаммов необходимо постоянно расширять для своевременной реакции на возникающую резистентность фитопатогенов и утрату полезных свойств у используемых микробных культур.

Известен штамм *Bacillus licheniformis* Б-5, обладающий антагонистическим эффектом по отношению к грибным фитопатогенам подсолнечника и увеличивающий всхожесть 20 семян [7].

Однако для данного штамма не установлена способность к стимуляции роста корней растений и фунгицидная активность по отношению к плесеням хранения (*Aspergillus*, *Penicillium* и пр.).

Запатентован штамм *Bacillus cereus* ВКПМ В-12401, обладающий способностью 25 стимулировать рост меристемной культуры *Solarium tuberosum* [8].

Недостатком штамма является то, что для него не установлен спектр антагонистического действия по отношению к фитопатогенным грибам.

Известен штамм *Bacillus subtilis* - И5-12/23 (93 ВИЗР), предназначенный для защиты картофеля от болезней при хранении [9].

30 Однако для данного штамма не установлена антагонистическая активность по отношению к грибам р. *Penicillium*, также поражающим картофель при хранении.

Известен штамм *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 12501 НК, характеризующийся фунгицидным действием против фитопатогенных микромицетов, а также ростостимулирующими свойствами [10].

35 Однако для данного штамма бацилл не установлен фунгицидный эффект по отношению к плесеням хранения.

В качестве прототипа был выбран штамм *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР [11]. Данная бактерия входит в состав фунгицида «Алирин-Б», а также относится к группе *Bacillus subtilis*, как и заявленный штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516.

40 Задачей изобретения является получение нового штамма *Bacillus pumilus*, характеризующегося антагонистическим эффектом против фитопатогенных грибов *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и фитостимулирующими свойствами.

45 Задача решается путем выделения нового штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516 из ризосферы рода *Verteoa* и определением фунгицидных и фитостимулирующих свойств штамма.

Технический эффект, получаемый от применения нового штамма, заключается в повышении продуктивности культурных растений за счет стимуляции их роста и

повышения их устойчивости к болезням, вызываемым фитопатогенными грибами.

Описание изобретения

1. Выделение нового штамма

Предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516 был выделен из ризосферы р. *Berteroa* в Алтайском крае, Алтайском районе, в окрестностях села Ая, осенью 2018 года. Весной 2022 года штамм был депонирован в «Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM)» ФГБНУ «ВНИИСХМ», находящейся по адресу: 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3. Регистрационный номер - RCAM05516.

2. Видовая идентификация предлагаемого штамма

Идентификацию предлагаемого штамма до вида проводили с использованием метода мультисубстратного тестирования MicroPlate GENIII (BioLog). В соответствии с полученными результатами анализа, вероятность того, что данный штамм принадлежит виду *Bacillus pumilus* составила 77,5%, а к *Bacillus safensis* - 17,5%. Следовательно, штамм RCAM05516 относится к виду *Bacillus pumilus* (фиг. 1).

3. Культуральные, морфологические, физиологические и биохимические свойства нового штамма

Культуральные и морфологические признаки штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516: колонии бело-кремового цвета, диаметром до 0,3-0,6 см, матовые, приподнятые, ровной округлой формы, со складчатой каймой. Цвет колоний на окраине блее по сравнению с центром. В колбе в условиях аэрации растет с образованием мути по всему объему, в термостате - с образованием пленки на поверхности бульона. При микроскопии палочки располагаются преимущественно одиночно или парами.

Физиологические и биохимические свойства штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516: спорообразующие палочки, положительно окрашивающиеся по Граму. Утилизируют сахарозу, арабинозу, маннит и ксилозу. Реакция на каталазу - положительная, на лецитиназу - отрицательная. Не восстанавливают нитрат, не ферментируют цитрат, реакция Фогеса-Проскауэра - отрицательная.

4. Условия культивирования заявленного штамма и питательные среды

На жидких питательных средах штамм растет в шейкер-инкубаторе при 200-250 об/мин, а на твердых - в термостате. Время и температура культивирования - до 24 ч при 37°C. Оптимальная питательная среда - L. Состав (г/л): дрожжевой экстракт и хлорид натрия - по 5, пептон и агар - по 15.

В биологических реакторах штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516 культивируется на меласно-кукурузной среде, следующего состава (г/л): меласса - 25, кукурузный экстракт - 12,5, дрожжевой экстракт - 1, пептон - 0,5, $MgSO_4$ - 0,25, $MnSO_4$ - 0,03, $CoCl_2$ - 0,046, $CaCl_2$ - 1, $FeSO_4$ - 0,05, $CuSO_4$ - 0,05. В качестве пеногасителя используется лапрол (мл/л) - 2.

Условия культивирования: водородный показатель (pH) - 6,8-7,4, количество оборотов двухуровневой мешалки в минуту - 250-500, время ведения ферментации - 24 ч, оптимальная температура роста культуры - 37°C, расход воздуха - до 500 л/ч, начало спорообразования - через 5-7 часов, с момента внесения культуры в аппарат, к 24 часам инкубирования культура полностью переходит в споры.

Для роста штамма характерно отсутствие лаг-фазы, потребление кислорода из среды, а также смещение водородного показателя сразу после внесения инокулята в ферментационную среду.

5. Фунгицидное действие предлагаемого штамма

Антагонистический эффект нового штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516 был

установлен по отношению к следующим фитопатогенным грибам: *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

6. Стимуляция роста растений заявленным штаммом

Новый штамм стимулирует рост корней Клоповника посевного.

5 Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Определение фунгицидного действия штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516 по отношению к фитопатогенам

Антагонистическую активность штаммов *Bacillus pumilus* RCAM05516 и *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР против фитопатогенных грибов определяли методом агаровых
10 блоков. Используемые тест-культуры: *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

Бацилл поверхностным газоном засеивали в опытные чашки с питательным агаром (эксперимент с *Phytophthora infestans*) или средой YEP (для остальных микромицетов). В центр чашки Петри помещали блок с заранее выращенными грибами диаметром 7
15 мм, полученный с помощью стерильного сверла. В качестве контроля выступали чашки с блоками фитопатогенов без бацилл. Микроорганизмы инкубировали при 20-25°C в течение 10 дней, периодически оценивая взаимодействие микроорганизмов. О присутствии фунгицидного действия свидетельствует более слабое развитие мицелия микромицетов в опытных чашках по сравнению с контрольными. Степень
20 ингибирования (СИ) выражали через формулу:

$$СИ = \frac{D_k - D_o}{D_k} \times 100 \%,$$

где Dк - диаметр колонии гриба в контроле,

25 Dо - диаметр колонии гриба в опыте.

Согласно результатам, представленным в таблице 1, оба исследуемых штамма ингибируют рост исследуемых фитопатогенов. На протяжении всего эксперимента микромицеты в контрольных пробах разрастались по периметру всей чашки Петри, а в опытных иногда даже погибали на внесенном блоке (как в случае с *Phytophthora infestans*).
30

Таблица 1. Степень ингибирования роста фитопатогенов в присутствии бактерий рода *Bacillus* через 10 дней совместного культивирования, %

Штаммы	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i> В-10 ВИЗР (прототип)	100,00	83,56	87,05	81,59
<i>Bacillus pumilus</i> RCAM05516 (заявленный)	100,00	90,41	90,45	89,55

Если в контрольных вариантах через 10 дней инкубирования диаметр фитопатогенов составлял 79,00±6,51 мм для *Phytophthora infestans*, 73,00±3,58 мм для *Alternaria* sp., 73,33±1,53 мм для *Aspergillus* sp. и 67,00±4,76 мм для *Penicillium* sp., то в опытных чашках с предлагаемым штаммом грибы занимали 0 мм в случае с *Phytophthora infestans* и по 7
45 мм для остальных микромицетов. В чашках со штаммом-прототипом диаметр фитопатогенов составлял 0 мм для *Phytophthora infestans*, 12,00±1,00 мм для *Alternaria* sp., 9,50±1,97 мм для *Aspergillus* sp. и 12,33±1,75 мм для *Penicillium* sp. Заявленный штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516 эффективнее ингибирует рост *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp.,

Penicillium sp., чем *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР, на 6,85%, 3,4% и 7,96% соответственно. Пример 2. Установление стимуляции роста растений у штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516

Ростостимулирующий эффект штаммов *Bacillus pumilus* RCAM05516 и *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР на семена Клоповника посевного устанавливали методом влажных камер. Для этого семена из опытных проб протравливали культуральными жидкостями суточных культур бактерий рода *Bacillus*. Расход - 100 мкл культуральной жидкости на 10 г семян. Контрольные семена не протравливались ничем. Опыт закладывали в 4-х кратной повторности, в одну чашку Петри выкладывали по 20 семян. Результаты эксперимента учитывали на 5-е сутки.

В соответствии с данными в таблице 2, оба исследуемых штамма стимулируют рост корней у семян Клоповника посевного. Однако предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* RCAM05516 дает прибавку в длине корня к контролю на 2,5% больше, чем прототип *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР.

Таблица 2. Влияние бактерий рода *Bacillus* на длину корня Клоповника посевного

Варианты семян	Длина корня, мм (M±m)	Прибавка к контролю, %
Контрольные	65,22±2,36	–
Обработанные <i>Bacillus subtilis</i> В-10 ВИЗР (прототип)	68,38±2,21	4,85
Обработанные <i>Bacillus pumilus</i> RCAM05516 (заявленный)	69,98±4,36	7,30

И в опытных, и в контрольном вариантах всхожесть семян была выше 90%. Ни в одной из экспериментальных чашек Петри не было зафиксировано больных семян, поэтому в данном опыте не было возможности оценить фунгицидное действие изучаемых штаммов на возбудителей грибных инфекций Клоповника посевного. Литература

1. Shternshis M. Biopreparations for plant protection in Siberia: application and enhancement of activity // Journal of Agricultural Biotechnology, 2005. - Vol. 1. - Is. 1. - P. 1-18.

2. Pogacean M.O., Gavrilescu M. Plant protection products and their sustainable and environmentally friendly use // Environmental Engineering and Management Journal, 2009. - Vol. 8. - Is. 3. - P. 607-627. doi: 10.30638/eemj.2009.084

3. Nugmanova T. Biopreparations for the production of environmentally safe food - part I // Ecological Engineering and Environment Protection, 2017. - Vol. 2. - P. 63-69. doi: 10.32006/eeep.2017.2.6369

4. Смирнова И.П., Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Некоторые перспективы использования метаболитов рода *Trichoderma* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство, 2016. - №3. - С. 22-29.

5. Gaete A., Andreani-Gerard C, Maldonado J. E., Munoz-Torres P.A., Sepulveda-Chavera G. F., Gonzalez M. Bioprospecting of Plant Growth-Promoting Traits of *Pseudomonas* sp. Strain C3 Isolated from the Atacama Desert: Molecular and Culture-Based Analysis // Diversity, 2022. - Vol. 14. - Ar. 388. doi: 10.3390/d14050388

6. «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов», разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I Пестициды. - М.; Минсельхоз России, 2022. - 887 с.

7. Маслиенко Л.В., Лавриченко О.А. Пат. 2032345, МПК 51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus licheniformis* для получения препарата против белой гнили подсолнечника, 1995.

8. Ренев Н.О., Субботин А.М., Петров С.А., Мальчевский В.А. Пат. 2724538, МПК 51 С 12 N 1/20. Средство для стимуляции роста меристемной культуры *Solanum tuberosum*, 2020.

9. Новикова И.И., Бойкова И.В., Павлюшин В.А., Зейрук В.Н. Пат. 2538157, МПК 51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* Б 93 ВИЗР для защиты картофеля от болезней при хранении, 2015.

10. Каменева И.А., Мельничук Т.Н., Алексеенко Н.В., Якубовская А.И., Паштецкий В.С., Абдурашитов С.Ф., Гритчин М.В., Смирнова И.И. Пат. 2764695, МПК 51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* - антагонист фитопатогенных микромицетов с ростостимулирующими свойствами и микробный препарат на его основе для повышения продуктивности сельскохозяйственных растений и защиты их от грибных болезней, 2022.

11. Корнева О.Г., Полякова Е.В., Киселева Г.Н., Соколов А.С. Эффективность применения биопрепаратов для защиты картофеля от болезней в условиях дельты волги // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета, 2019. - №2. - С. 69-72.

(57) Формула изобретения

Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RСAM05516, выделенный из ризосферы рода *Verteroa*, характеризующийся фунгицидным действием по отношению к фитопатогенным грибам *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и способностью к стимуляции роста растений.

25

30

35

40

45

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.775	0.569	3.818	GP-Rod-SB	Bacillus pumilus/safensis
2	0.175	0.112	5.247	GP-Rod-SB	Bacillus safensis/pumilus
3	0.026	0.014	7.082	GP-Rod-SB	Bacillus fortis
4	0.024	0.012	7.175	GP-Rod-SB	Bacillus simplex/butanolivorans

Result Species ID: Bacillus pumilus/safensis
Comment
Notice

Фиг. 1 Протокол видовой идентификации штамма *Bacillus pumilus* RCAM05516