



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022121280, 03.08.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.08.2022

Дата регистрации:
07.06.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.08.2022

(45) Опубликовано: 07.06.2023 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 2701500 C1,26.09.2019.
POGACEAN M.O., et al, Plant protection
products and their sustainable and
environmentally friendly use, Environmental
(см. прод.)

(54) Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05517 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 фунгицидной активностью по отношению к *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., депонирован в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических

технологий для сельского хозяйства (RCAM) под регистрационным номером RCAM05517. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* RCAM05517 может быть использован в составе бактериальных биопрепаратов для защиты растений от болезней и стимулирования их роста. 1 ил., 1 табл.

(56) (продолжение):

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



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/20 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022121280, 03.08.2022**

(24) Effective date for property rights:
03.08.2022

Registration date:
07.06.2023

Priority:

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

(45) Date of publication: **07.06.2023** Bull. № 16

Mail address:
**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(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 byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **BACILLUS PUMILUS RCAM05517 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* with fungicidal activity against *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

RCAM05517.

EFFECT: bacterial strain *Bacillus pumilus* RCAM05517 can be used as part of bacterial biological products to protect plants from diseases and stimulate their growth.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl

RU 2 797 699 C1

RU 2 797 699 C1

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, в частности касается нового штамма ризосферных бактерий рода *Bacillus* в качестве действующего компонента для разработки микробного биопрепарата для стимуляции роста и защиты растений от фитопатогенных грибов.

5 В настоящее время в сельском хозяйстве широко известны бактериальные препараты для растениеводства. Их роль и разнообразие на мировом рынке средств защиты и повышения продуктивности растений продолжают расти. Это обусловлено безопасностью микробных биопрепаратов для окружающей среды по сравнению с химическими средствами [1-5]. Однако штаммы, давно выделенные из природных
10 условий, могут снижать свою эффективность при борьбе с фитопатогенами растений, поэтому важно постоянно пополнять коллекцию новыми эффективными штаммами для своевременной замены действующих компонентов и разработки новых биопрепаратов.

Известны штаммы *Pseudomonas chlororaphis* ВКМ В-2956D и *Pseudomonas fluorescens*
15 ВКМ В-2955D, применяемые для защиты растений от фитопатогенных грибов и бактерий, а также стимуляции роста растений [6,7].

Недостатком штаммов является то, что они не способны образовывать споры, а, следовательно, менее устойчивы при хранении и к воздействию неблагоприятных факторов, чем спорообразующие бактерии.

20 Известен штамм *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11443, обладающий широким спектром фунгицидного действия против фитопатогенных грибов [8]. Данная бактерия является спорообразующей, но при этом для нее не установлена способность стимуляции роста растений.

В качестве прототипа был выбран штамм *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР [9], так как он
25 входит в состав известного на отечественном рынке фунгицида «Алирин-Б», а также относится к группе *Bacillus subtilis*, как и заявленный штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517. Задачей изобретения является получение нового штамма *Bacillus pumilus*, обладающего фунгицидной активностью по отношению к *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и способностью стимулировать рост растений.

30 Задача решается выделением нового штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517 из ризосферы рода *Rumex* и установлением заявленных свойств.

Технический эффект, получаемый от применения нового штамма, заключается в стимуляции роста и устойчивости растений к грибным инфекциям. Описание изобретения

1. Выделение нового штамма

35 Новый штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 был выделен из ризосферы р.*Rumex* в Алтайском крае, Алтайском районе, в окрестностях села Ая, осенью 2018 года. В 2022 году 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.
40 Регистрационный номер -RCAM05517.

2. Видовая идентификация заявленного штамма

Видовая идентификация заявленного штамма осуществлялась с помощью метода мультисубстратного тестирования MicroPlate GENIII (BioLog). Согласно полученным
45 результатам анализа, вероятность того, что исследуемый штамм относится к виду *Bacillus pumilus* составила 89,4%, а к *Bacillus safensis* - 10,5%. Следовательно, штамм RCAM05517 принадлежит виду *Bacillus pumilus* (фиг. 1).

3. Микробиологические свойства предлагаемого штамма

Культурально-морфологические особенности штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517:

колонии молочного цвета, с максимальным диаметром 0,3-0,6 см, матовые, ровной округлой формы, с кратерообразным профилем. Цвет колоний на окраине блее по сравнению с центром. При микроскопии клетки располагаются преимущественно одиночно, реже - парами.

5 Физиолого-биохимические свойства штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517: спорообразующие грамположительные палочки с положительной реакцией на каталазу, ферментируют сахарозу, арабинозу, маннит и ксилозу. Не восстанавливают нитрат, не усваивают цитрат, реакция Фогеса-Проскауэра - отрицательная.

4. Среды и условия культивирования штамма

10 Предлагаемый штамм бактерий инкубируется на качалочных колбах в течение 18-24 ч при 30-37°C в шейкер-инкубаторе на L-жидкой питательной среде (%): дрожжевой экстракт - 0,5, пептон - 1,5, NaCl - 0,5, вода дистиллированная - 1,0 л. Для приготовления агаризованной питательной среды необходимо добавить к перечисленным выше ингредиентам 1,5% агара.

15 В ферментационных установках штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 культивируется на меласно-кукурузной среде, составом (г/л): меласса - 25, кукурузный экстракт - 12,5, дрожжевой экстракт - 1, триптон - 0,5, MgSO₄ - 0,25, MnSO₄ - 0,03, CoCl₂ - 0,046, CaCl₂ - 1, солевой сток - 10 мл (FeSO₄ - 0,1 г/100 мл, CuSCm - 0,1 г/100 мл). В качестве пеногасителя используется лапрол (мл/л) - 2.

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

25 Во всех случаях культивирования фаза экспоненциального роста начинается, примерно, через 2 ч культивирования в биореакторе, соответственно, длительность лаг-фазы составляет около 1,5-2 часов.

5. Фунгицидная активность нового штамма

30 Фунгицидное действие заявленного штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517 было зафиксировано по отношению к следующим фитопатогенным грибам: *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

6. Ростостимулирующее действие предлагаемого штамма Заявленный штамм стимулирует рост корней Кресс-салата. Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

35 Пример 1. Определение антагонистической активности штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517 по отношению к фитопатогенным грибам

40 Фунгицидное действие штаммов *Bacillus pumilus* RCAM05517 и *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР по отношению к фитопатогенным грибам устанавливали методом агаровых блоков. В качестве тест-культур использовали штаммы *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.

45 Штаммы-антагонисты газонном засеивали в опытные чашки Петри с питательным агаром (для фитофторы) или средой YEP (для других грибов). В центр чашки устанавливали блок с плесенью диаметром 5-7 мм. Контрольные варианты содержали только блоки фитопатогенов. Культуры культивировали при 20-25°C в течение 2-х недель, периодически оценивая взаимодействие микроорганизмов. О наличии фунгицидной активности свидетельствует более слабое развитие мицелия грибов в опытных чашках по сравнению с контролем.

В соответствии с данными, представленными в таблице 1, как штамм прототип, так

и предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 ингибируют рост всех исследуемых тест-культур. В ходе эксперимента отмечается динамика по увеличению диаметра фитопатогенов в контрольных чашках.

Таблица 1. Динамика диаметра микромицетов, в контрольных и опытных чашках

Тест-штаммы	Контроль, мм (M±m)		<i>Bacillus subtilis</i> В-10 ВИЗР (прототип), мм (M±m)		<i>Bacillus pumilus</i> RCAM05517 (заявленный), мм (M±m)	
	3–5 сутки	10 сутки	3–5 сутки	10 сутки	3–5 сутки	10 сутки
<i>Phytophthora infestans</i>	33,33±5,65	79,00±6,51	12,17±0,58	0	7,00±0,00	0
<i>Alternaria</i> sp.	27,33±2,50	73,00±3,58	10,67±0,58	12,00±1,00	10,00±2,65	7,00±0,00
<i>Aspergillus</i> sp.	33,50±2,43	73,33±1,53	10,67±2,08	9,50±1,97	7,83±0,75	7,00±0,00
<i>Penicillium</i> sp.	38,00±0,63	67,00±4,76	16,17±3,19	12,33±1,75	8,87±1,86	7,00±0,00

К окончанию исследования был установлен абсолютный антагонистический эффект как для штамма прототипа, так и для заявленного по отношению к *Phytophthora infestans*. Микромицет погиб даже на установленном блоке. Предлагаемый штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 эффективнее прототипа подавляет рост фитопатогенных грибов, на протяжении всего эксперимента сокращая занимаемый ими диаметр в чашках Петри. Штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 по сравнению со штаммом *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР к 10 суткам опыта сильнее угнетает рост *Alternaria* sp. на 5,00 мм, *Aspergillus* sp. на 2,50 мм и *Penicillium* sp. на 5,33 мм.

Пример 2. Установление фитостимулирующего действия у штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517

Ростостимулирующее действие штаммов *Bacillus pumilus* RCAM05517 и *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР на семена Кресс-салата устанавливали методом влажных камер. Для этого семена в опытных пробах обрабатывали культуральными жидкостями суточных культур бацилл в количестве 100 мкл на 10 г семян. Контрольные семена не обрабатывали ничем. Повторность опыта - 4-кратная, в каждой чашке Петри было по 20 семян. Результаты по стимуляции роста корней снимали через 5 суток.

Как видно из таблицы 2, оба штамма обладают фитостимулирующим эффектом на семена Кресс-салата. Однако заявленный штамм *Bacillus pumilus* RCAM05517 дает прибавку в длине корня к контролю в 2 раза больше, чем прототип *Bacillus subtilis* В-10 ВИЗР.

Таблица 2. Влияние культуральных жидкостей бацилл на длину корня Кресс-салата

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> RCAM05517 (заявленный)	72,61±2,99	11,33

Всхожесть семян во всех вариантах составила более 95%. Ни в опытных, ни в

контрольных чашках не было отмечено инфицированных семян, поэтому в данном эксперименте не представляется возможным сравнить фунгицидный эффект штаммов на возбудителей грибных болезней Кресс-салата. Литература

1. Azizbekyan R. R. Biological Preparations for the Protection of Agricultural Plants (Review) // Applied Biochemistry and Microbiology, 2019. - Vol.55 (8). - P. 816-823. doi: 10.1134/s0003683819080027.
2. Pylak M., Oszust K., Frac, M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2019. - Vol.18. - P. 597-616. doi: 10.1007/s11157-019-09500-5
3. Зыков С.А. Биопрепараты в современной земледелии // Агрофорум, 2019. - №3. - С. 21-27.
4. Vishwakarma K., Kumar N., Shandilya C, Mohapatra S., Bhayana S., Varma A.. Revisiting Plant-Microbe Interactions and Microbial Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review // Frontiers in Microbiology, 2020. - Vol. 11. - Ar. 560406. doi: 10.3389/fmicb.2020.560406
5. Pylak M., Oszust K., Frac M. Optimization of Growing Medium and Preservation Methods for Plant Beneficial Bacteria, and Formulating a Microbial Biopreparation for Raspberry Naturalization // Agronomy, 2021. - Vol.11. - Ar. 2521. doi: 10.3390/agronomy11122521
6. Анохина Т.О., Сиунова Т. В., Сизова О. И., Кочетков В. В., Воронин А. М. Пат.2588473, МПК51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Pseudomonas chlororaphis* для защиты растений от фитопатогенных грибов и бактерий и стимуляции роста растений, 2016.
7. Анохина Т.О., Сиунова Т.В., Сизова О.И., Кочетков В. В., Воронин А. М. Пат. 2646160, МПК51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* для защиты растений от фитопатогенных грибов и бактерий и стимуляции роста растений, 2018.
8. Кузнецова Н.И., Азизбекян Р.Р., Кузин А. П., Николаенко М. А., Сунь Ч., Лю Ц., Сюн Р., Цзо Ц. Пат. 2701500, МПК 51 С 12 N 1/20. Штамм спорообразующих бактерий *Bacillus amyloliquefaciens*, обладающий фунгицидным действием против фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания овощных растений, биологический препарат на его основе, 2019.
9. 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* RCAM05517, выделенный из ризосферы рода *Rumex*, обладающий фунгицидной активностью по отношению к фитопатогенным грибам *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. и фитостимулирующим эффектом.

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.894	0.674	4.655	GP-Rod-SB	<i>Bacillus pumilus/safensis</i>
2	0.105	0.292	5.134	GP-Rod-SB	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>
3	0.000	0.018	7.569	GP-Rod-SB	<i>Bacillus simplex/butanovorans</i>
4	0.000	0.016	7.626	GP-Rod-SB	<i>Bacillus licheniformis</i>

Result
Comment
Notice

Species ID: *Bacillus pumilus/safensis*

Фиг. 1 Протокол идентификации штамма *Bacillus pumilus* RCAM05517