

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291882** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.28

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
A01N 63/22 (2020.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(54) ШТАММ *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 RKM 0528, ПЕРСПЕКТИВНЫЙ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ БИОПРЕПАРАТА, ПОВЫШАЮЩИЙ РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

(31) **2021/0830.2**

(32) **2021.08.27**

(33) **KZ**

(96) **KZ2022/032 (KZ) 2022.06.01**

(71) Заявитель:
**ТОВАРИЩЕСТВО
С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
КОЛЛЕКЦИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ" (KZ)**

(72) Изобретатель:

**Бисенова Гульмира Нургалиевна,
Текебаева Жанар Борамбаевна,
Садыкова Бахытгуль Жумабаевна,
Сармурзина Зинигуль Сериковна,
Темирханов Аслан Жанаевич (KZ)**

(74) Представитель:

Бисенова Г.Н. (KZ)

(57) Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, к получению штамма бактерий, обладающего ростстимулирующей активностью, предназначенного для стимуляции всхожести и роста семян органических сельскохозяйственных видов растений (пшеница, чечевица, гречиха). Изобретение относится к штамму бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10, обладающего высокой биологической активностью, а именно улучшающий ростовые показатели растений и повышающий процент всхожести семян. Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 депонирован в центральном музее Республиканской коллекции микроорганизмов с целью гарантийного хранения и патентной процедуры под номером В-РКМ 0528. Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 характеризуется высокой ростстимулирующей активностью к семенам сельскохозяйственных видов растений (пшеницы, чечевицы, гречихи) в исследуемых концентрациях (1:10, 1:50, 1:100) по сравнению с контролем. Самые высокие ростовые показатели и процент всхожести получены в концентрации 1:100: пшеница - 11,6±1,21 мм (К.: 8,2±1,52); чечевица - 4,3±0,20 мм (К.: 3,4±0,28); гречиха - 8,2±0,60 мм (5,0±0,22) (мм, М±m%). Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 рекомендуется в качестве основы биопрепарата для повышения ростовых показателей и процента всхожести семян органических сельскохозяйственных видов растений.

A1

202291882

202291882

A1

Штамм *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 RKM 0528, перспективный в качестве основы для биопрепарата повышающий ростовые показатели сельскохозяйственных культур

Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, к получению штамма бактерий, обладающего ростстимулирующей активностью, предназначенного для стимуляции всхожести и роста семян органических сельскохозяйственных видов растений (пшеница, чечевица, гречиха).

Известен штамм *Pseudomonas azotoformans* F30A (Патент РФ №2550268) для улучшения всхожести и роста растений, который проявляет способность фиксировать молекулярный азот, мобилизовать труднорастворимые соединения фосфора, повышать доступность для растений соединений серы.

Используют штамм бактерий *Bacillus megaterium* 501 GR (Патент РФ №2558291) в качестве полифункционального средства для растениеводства, обладающего одновременно ростостимулирующим эффектом, улучшающего фосфорное питание растений, способствующего повышению их продуктивности, защиты растений от корневых грибных болезней, а также способствующего биоремедиации загрязненных пестицидами почв.

Недостатком в двух выше описанных случаях прямая стимуляция роста растений при воздействии бактерий обеспечивается только улучшением минерального питания, что ограничивает возможности применения штаммов.

Известен новый штамм *Azotobacter chroococcum* Az-3 (Инновационный патент РК №27900), повышающий продуктивность пшеницы и обогащающий почву азотом. Штамм *Azotobacter chroococcum* Az-3 обладает фунгицидными свойствами против возбудителей корневой гнили пшеницы и азотфиксирующей активностью в почве с целью получения биопрепаратов для повышения урожайности зерна.

Существует штамм *Trichoderma album* T-340 (Инновационный патент РК №27901) для получения биопрепарата, используемого для стимуляции роста зерновых культур и защиты от альтернариозной инфекции семян. Обработка семян пшеницы метаболитами штамма увеличивает рост корешков и ростков в среднем на 77,7% и массу проростков на 137,1%.

Известен штамм целлюлолитических бактерий *Cellulomonas beazotea* 150 (Инновационный патент РК №24974), для использования в качестве бактериального удобрения под люцерну, отличающийся тем, что обладает способностью эффективно повышать всхожесть семян, стимулировать рост и развитие растений, и защищать растения от фитопатогенных грибов, вызывающих корневые гнили.

Общим недостатком указанных изобретений является малый спектр растений, отзывчивых на обработку описанными микроорганизмами.

Предложено и запатентовано множество различных штаммов микроорганизмов для использования в производстве биопрепаратов в качестве основных действующих агентов. Однако большинство работ посвящено созданию решений для защиты растений от фитопатогенов, и гораздо меньшее внимание уделяется микроорганизмам, для которых более хорошо выраженной является непосредственная ростстимулирующая активность.

Задача настоящего изобретения заключается в получении нового штамма бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10, обладающего высокой ростстимулирующей активностью.

Технический результат достигается предлагаемым штаммом бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10, выделенный из планосферы лекарственных растений Карагандинской области.

Изобретение представляет собой штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10, обладающий высокой ростстимулирующей активностью, предназначенного для стимуляции ростовых показателей и процента всхожести семян органических сельскохозяйственных видов растений (пшеница, чечевица, гречиха).

Штамм *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 выделен из планосферы лекарственных растений в АО МНПХ «Фитохимия», Карагандинской области. Штамм *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 был выделен путем посева суспензии почвы на питательную среду следующего состава: мясной экстракт («Hi-Media», Индия) - 5 г/л, сухой питательный агар – 28 г/л, вода дистиллированная – 1000 мл. pH=6,0-7,0.

Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 депонирован в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» под номером B-RKM 0528, хранится методами лиофилизации и криоконсервации. Хранение штамма в лиофильно высушенном состоянии при температуре не выше 0°C. Хранение на коротко скошенном агаре при температуре +4°C в течении года, пересев 1 раз в 3 месяца. Используется среда МПА при температуре инкубации 35-37 °C, 18-24 часов. Хранение штамма в криоконсервированном состоянии при температуре -80°C, в течение 10 лет. Состав криозащитной среды: глицерин 10 мл, дистиллированная вода 90 мл.

Штамм культивируется на среде МПА (г/л): пептон - 10 г/л, глюкоза – 7 г/л, NaCl - 5 г/л, агар-агар - 20 г/л, мясная вода до 14 л. Стерилизация 121°C – 20 минут, pH 6,9-7,1. Инкубация при температуре +35-37°C, 18-24 часа.

Штамм *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 является антагонистом фитопатогенных грибов рода *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Macrosporium* лекарственных растений.

Биологические свойства штамма.

Bacillus pumilis Pol P3(1) 10 – это грамположительные палочки, с закругленными концами, расположены одиночно либо скоплениями в виде коротких цепочек. Спорообразующие. На агаризованной плотной среде МПА образуют колонии округлой формы, диаметром 1,0-2,0 мм, поверхность шероховатая, профиль плоский, структура мелкозернистая, слабоблестящие светло-желтого цвета с ровными краем, однородной структуры, мягкой консистенции. На питательном бульоне штамм образует помутнение среды с образованием пленки. Штамм бактерий имеет типичные для вида *Bacillus pumilis* культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики.

В лабораторных условиях на чашках изучена ростстимулирующая активность штамма бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 на семенах органических сельскохозяйственных видов растений (пшеница, чечевица, гречиха):

Исследуемый штамм *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 выращивали на жидкой питательной среде МПБ (мясной питательный бульон) при температуре 35-37°C в течение 1-2 суток. Для исследований культуральную жидкость (КЖ) клеток штамма разводили со стерильной водопроводной водой в следующей концентрации: 1:10, 1:50 и 1:100, к 1 мл суспензии бактерий добавляли 10 мл воды и т.д. Контрольные семена замачивали в стерильной водопроводной воде. Для каждого варианта брали не менее 30 крупных семян. Семена раскладывали на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Обработку вели методом увлажнения ежедневно по 1 мл, и проращивали семена при температуре 25-26 °C в течение 10 дней. Влияние суспензии микроорганизма на рост растений оценивали по проценту всхожести семян, длине и массе ростков (мг). Исследуемый штамм считается токсичным, если вызывает снижение всхожести семян или угнетение роста проростков не менее чем на 30% по сравнению с контролем. Данные представлены на таблице 1.

КЖ штамма бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 проявила высокую ростстимулирующую активность на семенах пшеницы во всех концентрациях (1:10, 1:50, 1:100) по сравнению с контролем, однако наиболее высокие показатели были получены в концентрации 1:100, где длина ростков растения составила $11,6 \pm 1,21$ мм, всхожесть составила 65% по сравнению с контролем (40%).

КЖ штамма бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 проявила также высокую ростстимулирующую активность на семенах чечевицы во всех концентрациях (1:10, 1:50, 1:100) по сравнению с контролем, однако наиболее высокие показатели получены в концентрации 1:100, где длина ростков чечевицы составила $4,3 \pm 0,20$ мм, всхожесть составила 93% по сравнению с контролем (76%).

КЖ штамма бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 проявила высокую ростстимулирующую активность на семенах гречихи во всех концентрациях (1:10, 1:50, 1:100) по сравнению с контролем, однако наиболее высокие показатели были получены в концентрации 1:100, где длина ростков гречихи составила $8,2 \pm 0,60$ мм, всхожесть составила 95% по сравнению с контролем (60%).

Таким образом, штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 характеризуется высокой ростстимулирующей активностью к семенам сельскохозяйственных видов растений (пшеницы, чечевицы, гречихи) в исследуемых концентрациях (1:10, 1:50, 1:100) по сравнению с контролем. Самые высокие ростовые показатели и процент всхожести были получены в концентрации 1:100: пшеница - $11,6 \pm 1,21$ мм (К.: $8,2 \pm 1,52$); чечевица - $4,3 \pm 0,20$ мм (К. $3,4 \pm 0,28$); гречиха - $8,2 \pm 0,60$ мм ($5,0 \pm 0,22$) (мм, $M \pm m\%$).

Таблица 1 - Ростстимулирующая активность штамма *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10

Штамм бактерий	Концентрация КЖ штамма								
	1:10 (КЖ+вода)			1:50 (КЖ+вода)			1:100 (КЖ+вода)		
	ростки		всхо- жесть, %	ростки		всхо- жесть, %	ростки		всхож есть, %
	длина, мм	масса, г		длина,мм	масса, г		длина, мм	масса, г	
на семенах пшеницы									
<i>Bacillus pumilis</i> Pol P3(1) 10	9,4±0,95	0,140	55	8,8±0,92	0,086	55	11,6±1,21	0,111	65
Контроль (вода)	8,2±1,52	0,0811	40	8,2±1,52	0,081	40	8,2±1,52	0,081	40
на семенах чечевицы									
<i>Bacillus pumilis</i> Pol P3(1) 10	4,0±0,16	0,1478	83	4,1±0,21	0,1476	80	4,3±0,20	0,1437	93
Контроль (вода)	3,4±0,28	0,1194	76	3,4±0,28	0,1194	76	3,4±0,28	0,1194	76
на семенах гречихи									
<i>Bacillus pumilis</i> Pol P3(1) 10	6,6±0,38	0,1006	65	7,2±0,47	0,1210	80	8,2±0,60	0,1435	95
Контроль (вода)	5,0±0,22	0,0722	60	5,0±0,22	0,0722	60	5,0±0,22	0,0722	60

Таким образом, штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 обладает высокой биологической активностью, отличающийся от известных штаммов бактерий высокой ростстимулирующей активностью, способный улучшать ростовые показатели органических сельскохозяйственных видов растений и повышающий процент всхожести семян, а также перспективный в качестве основы при разработке биопрепаратов.

При разработке биопрепарата на основе сообщества биологически активных штаммов бактерий с целью повышения ростовых показателей и процента всхожести семян органических сельскохозяйственных видов растений в его основе рекомендуется использовать штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10.

Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 отличается от ранее выделенных штаммов высокой ростстимулирующей активностью. Для усиления ростстимулирующей активности штамма оптимальными являются следующие условия: основная питательная среда, pH среды – 6,9-7,1, температура культивирования – 35-37°C, продолжительность культивирования – 18-24 часов.

Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность). При изучении патогенности штамма *Bacillus pumilis* Pol P3(1) 10 на лабораторных животных было установлено, что штамм обладает слабовыраженным местно-раздражающим действием, аллергическим действием не обладает, относится к 4 классу опасности.

Область применения штамма.

Использование в качестве основы для получения биопрепарата с целью повышения ростовых показателей и процента всхожести семян органических сельскохозяйственных видов растений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм бактерий *Bacillus pumilis* Pol P3(1)10, депонированный в РГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» под номером B-RKM 0528, перспективный в качестве основы для биопрепарата с целью повышения ростовых показателей и процента всхожести семян органических сельскохозяйственных видов растений.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202291882

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/20 (2006.01)
A01P21/00 (2006.01)
A01N 63/22 (2020.01)
C12R 1/07 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 1/20, A01P21/00, A01N 63/20, A01N 63/00, A01G7/06

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Patentscope, Espacenet, Embase, Pubmed, PatSearch, EAPATIS, USPTO, J-PlatPat

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2550268 C2 (ЛАНТМЕННЕН БИОАГРИ АБ) 2015-05-10 весь текст	1
A	EA 201790162 A1 (АЗОТИК ТЕКНОЛОДЖИЗ ЛТД.) 2017-06-30 весь текст	1
A	EA 201991653 A1 (НОВОЗИМС БИОАГ А/С) 2019-11-29 описание: с.3-5	1
A	WO 2016021204 A1 (MEIJ SEIKA PHARMA CO LTD) 2016-02-11 весь текст	1
A	CN 108290799 A (УСТОЙЧИВЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ RTY LTD) 2018-07-17 весь текст	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **15/03/2023**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины

 А.В. Чебан