



(51) МПК  
*A01N 63/02* (2006.01)  
*A01C 1/06* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/07* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: **2011145665/10**, 11.11.2011  
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**11.11.2011**  
 Приоритет(ы):  
 (22) Дата подачи заявки: **11.11.2011**  
 (43) Дата публикации заявки: **20.05.2012** Бюл. № 14  
 (45) Опубликовано: **10.04.2013** Бюл. № 10  
 (56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: **RU 2216173 C2, 20.11.2003. RU 2302114 C1,**  
**10.07.2007. RU 2201678 C2, 10.04.2003. RU**  
**2128914 C1, 20.04.1999. US 20060116289 A1,**  
**01.06.2006.**  
 Адрес для переписки:  
**420061, г.Казань, ул. Космонавтов, 47, к.102,**  
**З.Ю.Сираевой**

(72) Автор(ы):  
**Сираева Зульфира Юнысовна (RU),**  
**Захарова Наталия Георгиевна (RU)**  
 (73) Патентообладатель(и):  
**Общество с ограниченной**  
**ответственностью "Бациз" (RU)**

**(54) БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ,  
 ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЙНОСТИ И ПОЧВЕННОГО ПЛОДОРОДИЯ**

(57) Реферат:  
 Биопрепарат для стимуляции роста и  
 защиты растений от болезней, повышения  
 урожайности и почвенного плодородия  
 содержит биомассу *Bacillus amyloliquefaciens*  
 ВКПМ В-11008 и гуматы при следующем  
 соотношении компонентов, в об.%:  
 биомасса *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ  
 В-11008 - вегетативных клеток и спор

$1,24 \div 1,30 \times 10^{10}$  КОЕ/мл культуральной  
 жидкости и содержанием спор 94% от общего  
 количества КОЕ - 99,0, гуматы - 1,0.  
 Биопрепарат позволяет защитить растения от  
 грибных и бактериальных болезней, улучшить  
 фитосанитарное состояние почвы и повысить  
 ее плодородие, увеличить урожайность культур  
 и улучшить качество сельскохозяйственной  
 продукции. 5 табл., 8 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A01N 63/02* (2006.01)  
*A01C 1/06* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/07* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011145665/10, 11.11.2011**

(24) Effective date for property rights:  
**11.11.2011**

Priority:

(22) Date of filing: **11.11.2011**

(43) Application published: **20.05.2012 Bull. 14**

(45) Date of publication: **10.04.2013 Bull. 10**

Mail address:

**420061, g.Kazan', ul. Kosmonavtov, 47, k.102,  
Z.Ju.Siraevoj**

(72) Inventor(s):

**Siraeva Zul'fira Junysovna (RU),  
Zakharova Natalija Georgievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju  
"Batsiz" (RU)**

(54) **BIOLOGICAL PREPARATION FOR STIMULATION OF GROWTH AND PROTECTION OF PLANTS FROM DISEASES, INCREASE IN PRODUCTIVITY AND SOIL FERTILITY**

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: biological preparation for stimulation of growth and protection of plants from diseases, increase in productivity and soil fertility contains biomass *Bacillus amyloliquefaciens* RNCIM B-11008 and humates at the following ratio of components in vol. %: biomass *Bacillus amyloliquefaciens* RNCIM B-11008 - vegetative cells

and spores of  $1.24-1.30 \times 10^{10}$  CFU/ml of culture fluid and the spore content 94% of the total amount of CFU - 99.0, humates - 1.0.

EFFECT: biological preparation enables to protect plants from fungal and bacterial diseases, to improve the phytosanitary condition of soil and improve its fertility, to increase crop yields and improve the quality of agricultural products.

5 tbl, 8 ex

RU 2 478 290 C2

RU 2 478 290 C2

Изобретение относится к биотехнологии и сельскохозяйственной микробиологии, в частности к биопрепарату комплексного действия для растениеводства, и может быть использовано для предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур, опрыскивания растений по вегетации, при подготовке сельскохозяйственной

5 продукции к хранению, для обработки почвы перед посевом и в период вегетации растений как в условиях здорового почвенного агроценоза, так и в условиях загрязнения почвы остаточными количествами фунгицидов, гербицидов, инсектицидов, фитопатогенными микромицетами и продуктами их метаболизма.

10 В настоящее время для сельского хозяйства известны бактериальные препараты на основе одной культуры микроорганизмов, которые либо ингибируют развитие фитопатогенных грибов и бактерий, либо стимулируют рост и развитие растений, либо способствуют фиксации атмосферного азота или переводу нерастворимых почвенных фосфатов в растворимые формы.

15 Известен препарат бактофит на основе штамма *Bacillus subtilis* ИПМ-215 [Патент РФ №2019966, МПК А01N 63/00, опубл. 1994]. Недостатками бактофита являются ограниченная область применения, отсутствие в доступных источниках информации данных об оздоравливающем эффекте на растения при бактериальном поражении, эффективном защитном действии против болезней в условиях открытого грунта и способности к азотфиксации и фосфатмобилизации. Кроме того, состав препарата

20 многокомпонентен, технология получения препарата многостадийна и сложна.

25 Известен препарат на основе *Azotobacter chroococcum* ВН-1811 [Патент РФ №2289620, МПК С12N 1/20, А01N 63/00, С12R 1/065, опубл. 2006], предназначенный для увеличения урожайности сельскохозяйственных культур и повышения их устойчивости к различным заболеваниям. Недостатком препарата является низкая эффективность действия против грибных и бактериальных возбудителей болезней сельскохозяйственных культур и отсутствие способности к фосфатмобилизации.

30 Предлагаются также биопрепараты на основе ассоциации микроорганизмов разной систематической принадлежности.

35 Известен препарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней - Экстрагран [Патент РФ №2302114, МПК А01N 63/00, С12N 1/20, С12R 1/065, С12R 1/07, опубл. 2007], содержащий штаммы *Bacillus mycoides* var. В.А. ВНИИСХМ №Д138 и *Azotobacter vinelandii* var. НП ВНИИСХМ №Д24. Известен биопрепарат для осенней, весенней и летней обработок почвы, корневой и прикорневой подкормок в период вегетации растений, а также предпосевной обработки семян, представляющий собой смесь суспензий тринадцати различных штаммов [Патент РФ №2322061, МПК А01N

40 63/00, С12N 1/20, опубл. 2008]: *Agrobacterium tumefaciens* В-4116, *Agrobacterium radiobacter* В-956, *Azotobacter chroococcum* В-2375, *Bacillus thuringiensis* В-2918, *Bacillus subtilis* В-6554, *Bacillus subtilis* В-4419, *Bacillus megaterium* В-4440, *Bacillus megaterium* В-200, *Bradyrhizobium japonicum* В-1978, *Erwinia ananas* В-5292, *Lactobacillus casei* В-3961, *Pseudomonas fluorescens* В-1138, *Rhodopseudomonas palustris* В-1620. Известен

45 биопрепарат для повышения плодородия почвы, ее оздоровления и стимуляции роста растений на основе ассоциации штаммов *Bacillus subtilis* К-4, *Bacillus subtilis* Ве-12, *Bacillus amyloliquefaciens* 30-40 с добавлением гидролизата смеси хвойного экстракта и каротиновой пасты [Патент РФ №2314693, МПК А01N 63/02, С12N 1/20, опубл. 2008].

50 Существенным недостатком препаратов на основе нескольких штаммов бактерий различной таксономической принадлежности является многокомпонентность видового и родового состава микроорганизмов с различными питательными потребностями, требующих как отдельных условий культивирования, так и различных

условий среды для максимального проявления свойств. Кроме того, указанные биопрепараты недостаточно эффективны в защите растений против широкого спектра возбудителей заболеваний растений.

5 Наиболее близким по достигаемому результату, взятым за прототип, является препарат Интеграл [Патент РФ №2216173, МПК А01N 63/00, А01С 1/06, С12N 1/20, С12N 1/20, С12R 1:065, опубл. 2003]. В состав препарата входит смесь из культуральной жидкости, содержащей штамм бактерий *Bacillus subtilis* 24Д (ВНИИСХМ 129) в концентрации  $5 \times 10^9$  кл/мл, гуматы и микроэлементы при  
10 следующем соотношении компонентов, мас. %: культуральная жидкость - 70-75, гуматы - 20, микроэлементы - 5-10. Существенными недостатками прототипа являются длительный технологический процесс культивирования штамма-продуцента *Bacillus subtilis* 24Д (ВНИИСХМ 129) (48 ч); низкая концентрация  
15 микробных клеток в препарате ( $5 \times 10^9$  кл/мл); необходимость дополнительного внесения в состав препарата микроэлементов (5-10% от итогового веса препарата) и большого количества гуматов (20% от итогового веса), что уменьшает титр клеток штамма-продуцента в составе биопрепарата и увеличивает его себестоимость; низкий уровень и недостаточный спектр фунгицидной активности; отсутствие данных об  
20 интенсивности спорообразования культуры, от которого зависит способность бактерий выживать в окружающей среде; отсутствие антибактериальной активности и комплексного действия на почвенный агроценоз (препарат предназначен только для предпосевной обработки семян и вегетирующих растений сельскохозяйственных культур, плодовых деревьев и ягодных кустарников).  
25

30 Препараты на основе одной живой культуры бактерий из рода *Bacillus*, которые обладали бы одновременно высоким уровнем целого ряда активностей (фунгицидной, бактерицидной, стимулирующей рост и развитие растений, повышающей их урожайность и уровень почвенного плодородия), в доступных заявителю источниках информации не выявлены.

35 Задачей заявляемого изобретения является создание биопрепарата комплексного действия (фунгицидного, бактерицидного, стимулирующего рост и развитие растений, повышающего урожайность растений и уровень почвенного плодородия) с высокими количественными характеристиками на основе биомассы одного штамма бактерий.

40 Технический результат сводится к разработке биопрепарата комплексного действия, обладающего фунгицидным, бактерицидным, ростстимулирующим действием, повышающего урожайность растений и уровень почвенного плодородия, с высокими количественными характеристиками на основе биомассы одного штамма бактерий из рода *Bacillus*.

45 Технический результат в заявляемом биопрепарате достигается тем, что в качестве биомассы из вегетативных клеток и спор штамма бактерий из рода *Bacillus* он содержит биомассу *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-1 1008 с титром вегетативных клеток и спор  $1,24 \div 1,30 \times 10^{10}$  КОЕ/мл и содержанием спор 94% от общего количества КОЕ и гуматы при следующем соотношении компонентов, в об. %:

50 биомасса *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-1 1008 - вегетативных клеток и спор  $1,24 \div 1,30 \times 10^{10}$  КОЕ/мл культуральной жидкости и содержание спор 94% от общего количества КОЕ - 99,0;  
гуматы - 1,0.

Штамм *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-1 1008 выделен с семян пшеницы и отселектирован путем многоступенчатого отбора по признакам: широкий спектр высокой антагонистической активности к различным фитопатогенным микромицетам

и бактериям; отсутствие токсического действия на биологические (растительные и животные) объекты на генетическом и организменном уровнях; высокая продуктивность культуры и технологичность в производственных условиях; высокий уровень активности синтезируемых ферментов (амилазы, протеазы, целлюлазы, фосфатазы), способствующих повышению уровня плодородия почвы; способность фиксировать атмосферный азот в количестве, сопоставимом с азотфиксирующей активностью эффективных симбиотических штаммов-продуцентов азотфиксирующих препаратов; возможность использования в виде баковой смеси с химическими фунгицидами, гербицидами, инсектицидами, агрохимикатами и биологическими препаратами и способность к детоксикации пестицидов.

Таксономическая принадлежность штамма определена при помощи анализа сигнеторных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrA* в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов при ФГУП ГосНИИгенетика и имеет коллекционный номер ВКПМ В-11008.

Культура *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 имеет следующие фенотипические характеристики. Прямые палочковидные клетки с закругленными концами размером 1,8×0,5 мкм, расположенные одиночно, попарно, реже в цепочках; подвижны с помощью жгутиков. При росте на МПА при температуре 28°C на 17-18 ч инкубации образуют эллипсоидной формы эндоспоры, расположенные в клетке субтерминально. Имеют грамположительный морфотип. Хемоорганогетеротрофы с дыхательным типом метаболизма, оптимумом рН 7,2 и температурой 28°C. Утилизируют глюкозу, арабинозу, мальтозу, галактозу, лактозу, маннит, сахарозу, крахмал, целлюлозу, желатину, казеин; используют мочевины, цитрат, но не используют пропионат; не образуют индол и сероводород; не обладают лецитиназной, коагулазной, гиалуронидазной активностями. Каталазоположительны, реакция Фогес-Проскауэра положительная. На МПА при температуре 28°C на 17-18 ч культура растет с формированием сильно складчатых колоний с куполообразным центром и изрезанным краем, вязкой консистенции телесного цвета. Способна к росту в среде с содержанием 7,0% NaCl и в интервале рН 4,5...9,5.

В качестве питательной среды для получения заявляемого биопрепарата используют дешевую среду на основе отходов зернового производства следующего состава, г/л: отруби пшеничные - 40,0; кукурузный экстракт - 0,5; MgSO<sub>4</sub> - 0,9; КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub> - 0,5; СаСО<sub>3</sub> - 1,0; рН 7,0±0,2. Для получения посевного материала культуру *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 засевают в пробирки со скошенной средой МПА, инкубируют в условиях термостата при температуре 28°C в течение 24 ч, затем вносят в пробирки по 6-7 мл 0,85% раствора NaCl, бактериологической петлей снимают с поверхности агара бактериальную массу, встряхивают в течение 3-4 мин, полученный посевной материал с содержанием клеток и спор 1,0÷2,0×10<sup>8</sup> КОЕ/мл вносят в жидкую питательную среду в объеме не менее 5%, дающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии 0,1 ед. (λ=590 нм, l=10 мм) и выращивают при температуре 28°C в течение 24 ч. Указанный состав среды обеспечивает высокий уровень накопления биомассы *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 (5,6÷5,9 г/л), высокий титр жизнеспособных клеток и спор (1,24÷1,28×10<sup>10</sup> КОЕ/мл) и интенсивность спорообразования (содержание спор - 94,0% от общего количества КОЕ). Питательные компоненты максимально утилизируются культурой (содержание остаточного сахара и аминного азота в среде к концу выращивания составляет

порядка 14,0 и 2,0% соответственно от исходного уровня). При этом максимальные антагонистическая и ростстимулирующая активности, выход биомассы и интенсивность спорообразования культуры *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 достигаются при температуре выращивания культуры 28°C. Культуральная жидкость *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 содержит метаболиты, обуславливающие высокий уровень пролонгированной антагонистической активности к широкому спектру возбудителей заболеваний различных сельскохозяйственных культур: *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Helminthosporium solani*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria brassicae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Gliocladium roseum*, *Phytophthora infestans*, *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum coccodes*, *Cladosporium herbarum*, *Oospora pustulans*. Преимуществом биопрепарата в отличие от прототипа является бактерицидное действие на фитопатогенные бактерии и фунгицидное действие на микромицеты, вызывающие плесневение семян. В отличие от прототипа, после окончания процесса выращивания к культуре *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 добавляют только натриевые и калиевые соли гуминовых кислот и в более низкой конечной концентрации (1,0 об.%), чем в биопрепарате-прототипе (20,0 об.%). В этом случае гуматы служат для сохранения жизнеспособности и стабилизации микробной биомассы, а также увеличения адсорбционной способности клеток и спор при обработке семян и вегетирующих растений, в отличие от прототипа, в котором гуматы выполняют функцию стимуляции роста и развития растений. В заявляемом изобретении стимулирующие свойства обусловлены собственной способностью культуры *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 синтезировать вещества с регуляторной активностью и выделять их в культуральную жидкость при выращивании культуры и в окружающую среду при интродукции. Данный биопрепарат хранят не менее 12 мес с момента изготовления при интервале температур от +4 до +28°C с сохранением всего комплекса свойств.

Высокий уровень рентабельности технологического процесса получения заявляемого биопрепарата согласно формуле изобретения обеспечивается невысокой продолжительностью процесса, низкой стоимостью исходного сырья, высокой продуктивностью и интенсивностью спорообразования культуры *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, от которой зависит дальнейшая способность штамма выживать при неблагоприятных условиях среды (засуха, низкие температуры, закисление почв и т.д.).

Преимуществом штамма *V.amyloliquefaciens* В-ВКПМ 11008 является ростовая активность в диапазоне рН от 4,5 до 9,5 с максимумом фунгистатической/фунгицидной активности при активной кислотности среды в интервале 4,5...8,5. В отличие от прототипа, это является преимущественной характеристикой заявляемого препарата в условиях практически повсеместного закисления почв и при совместном использовании в сельском хозяйстве смесей с фунгицидами, гербицидами, инсектицидами, имеющих кислую реакцию среды (до рН 5,0).

Изобретение поясняется нижеприведенными примерами.

Пример 1, демонстрирующий спектр подавляемых фитопатогенных микромицетов и уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата по сравнению с прототипом. Биопрепарат получают согласно формуле изобретения.

Антагонистическую активность в отношении тест-культур фитопатогенных микромицетов определяют методом лунок. Для получения суспензии тест-культуры микромицета грибную культуру выращивают газоном на поверхности чашки Петри с агаризованной средой Чапека [см. Семенов С.М. Лабораторные среды для

актиномицетов и грибов: Справочник / С.М.Семенов. - М.: Агропромиздат, 1990. - С.172] в течение 14 сут, добавляют 10 мл стерильной водопроводной воды, соскребают выросшую спорово-мицелиальную массу с поверхности среды петлей, переносят в пробирку. Полученную суспензию из пробирки вносят в колбу со 100 мл расплавленной и охлажденной до 60°C картофельно-глюкозной среды [см. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник / С.М.Семенов. - М.: Агропромиздат, 1990. - С.192] таким образом, чтобы получить конечную концентрацию  $10^9$  КОЕ/мл. В чашки Петри разливают по 15 мл картофельно-глюкозной среды, получая нижний слой агара. Среду с внесенной суспензией тест-культуры разливают по 8 мл в чашки Петри на застывший нижний слой, получая таким образом верхний слой агара. После застывания среды в центре чашек в верхнем слое агара делают по 1 круглой лунке буром. В лунки вносят по 0,1 мл препарата и инкубируют в термостате при температуре 28°C в течение 7 сут. В варианте «интеграл» в лунки вносят по 0,1 мл препарата с титром  $10^9$  КОЕ/мл. В контрольные чашки Петри в лунки вносят по 0,1 мл стерильной воды. Оценку уровня антагонистической активности осуществляют по диаметру стерильных зон (в мм) в грибном газоне, образующихся вокруг лунок. Спектр подавляемых фитопатогенных микромицетов и уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата по сравнению с прототипом показаны в таблице 1.

Таблица 1		
Антагонистическая активность заявляемого биопрепарата и прототипа против фитопатогенных микромицетов		
Тест-культура	Зоны ингибирования роста, мм	
	Заявляемый биопрепарат	Прототип
<i>Fusarium graminearum</i>	41,3±1,3	13,4±1,0
<i>Fusarium solani</i>	36,7±1,9	12,6±0,9
<i>Fusarium oxysporum</i>	35,2±1,4	11,1±0,8
<i>Fusarium sambucinum</i>	38,3±0,8	12,3±1,1
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	40,6±1,5	17,5±1,1
<i>Helminthosporium solani</i>	39,1±1,0	16,4±1,3
<i>Alternaria alternata</i>	39,4±2,0	20,7±1,3
<i>Alternaria solani</i>	*	18,5±1,5
<i>Alternaria brassicae</i>	41,5±2,1	19,7±1,2
<i>Rhizoctonia solani</i>	39,1±1,3	15,7±1,4
<i>Botrytis cinerea</i>	39,0±1,1	18,0±1,2
<i>Gliocladium roseum</i>	36,4±0,8	10,5±0,7
<i>Phytophthora infestans</i>	28,6±0,9	8,0±0,6
<i>Verticillium dahliae</i>	36,1±1,5	11,5±1,0
<i>Colletotrichum coccodes</i>	*	11,1±1,0
<i>Botrytis cinerea</i>	39,2±1,7	18,5±0,8
<i>Cladosporium herbarum</i>	36,7±1,1	16,3±0,3
<i>Oospora pustulans</i>	26,2±0,5	8,4±1,8
<i>Mucor racemosus</i>	*	нд
<i>Mucor racemosus</i>		
<i>Penicillium spp</i>		
<i>Aspergillus spp.</i>		
<i>Trichotecium roseum</i>		
<i>Nigrospora spp</i>		
Примечание: * - фунгицидная активность (отсутствие роста тест-культуры); нд - нет данных		

Пример 2, демонстрирующий уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата против фитопатогенных бактерий по сравнению с прототипом. Антагонистическую активность в отношении тест-культур фитопатогенных бактерий

оценивают методом отсроченного антагонизма. Для этого получают биопрепарат согласно формуле изобретения и петлей высевают в центре чашки Петри со средой Гаузе [см. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов: Справочник / С.М.Семенов. - М.: Агропромиздат, 1990. - С.148]. Посевы инкубируют при 28°C в течение 3 сут. К выросшей культуре *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 подсевают штрихом суточные суспензии тест-культур фитопатогенных бактерий (титр суспензий 10<sup>8</sup> КОЕ/мл). Затем чашки инкубируют при температуре 28°C в течение 24 ч. Оценку уровня антагонистической активности заявляемого препарата против фитопатогенных бактерий осуществляют по величине зон подавления (в мм) роста тест-культур фитопатогенных бактерий, образующихся вокруг колоний культуры *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008. Спектр подавляемых фитопатогенных бактерий и уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата по сравнению с прототипом показаны в таблице 2.

Антагонистическая активность заявляемого биопрепарата и прототипа против фитопатогенных бактерий		
Тест-культура	Зоны ингибирования роста, мм	
	Заявляемый препарат	Прототип
<i>Pseudomonas atrofaciens</i>	*	нд
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	*	10,2±0,4
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	*	14,1±1,1
<i>Xanthomonas campestris</i>	*	15,6±1,0
<i>Xanthomonas translucens</i>	*	10,3±0,9

Примечание: \* - бактерицидная активность (полное подавление роста тест-культуры); нд - нет данных

Пример 3, демонстрирующий уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата против тест-культур фитопатогенных микромицетов при различной активной кислотности среды. Препарат получают согласно формуле изобретения, при этом рН среды для культивирования доводят до значений 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5, 9,5 путем добавления 1М раствора HCl. Тест-культуры фитопатогенных микромицетов выращивают отдельно на чашках Петри со средой Чапека. Антагонистическую активность в отношении тест-культур фитопатогенных микромицетов определяют методом лунок (аналогично примеру 1). Штамм *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 способен к росту при активной кислотности среды в интервале рН от 4,5 до 9,5, при этом максимальная фунгистатическая/фунгицидная активность лежат в интервале рН 4,5-8,5. Это иллюстрируется данными, приведенными в таблице 3.

Влияние активной кислотности среды на уровень антагонистической активности заявляемого биопрепарата против тест-культур фитопатогенных микромицетов			
Значение рН среды	Диаметр зон ингибирования роста тест-культур, мм		
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
4,5	20,0±0,8	29,3±0,7	34,2±0,9
5,5	25,2±0,7	35,8±1,0	42,9±1,0
6,5	26,1±1,0	36,5±1,1	43,7±1,2
7,5	24,9±0,9	35,6±0,8	42,3±0,9
8,5	22,8±0,7	33,4±1,3	40,7±1,3
9,5	19,9±0,8	28,2±1,2	33,2±1,3

Пример 4, демонстрирующий эффективность заявляемого препарата при обработке семян против фитопатогенных микромицетов и бактерий. Заявляемый биопрепарат получают согласно формуле изобретения. Полученным биопрепаратом обрабатывают семена яровой пшеницы сорта Омская 32 и ярового ячменя сорта



Раушан полусухим способом с нормой расхода препарата 1,5 л/т зерна (расход рабочей жидкости - 10 л/т). Семена контрольного варианта обрабатывают стерильной водой из расчета 10 л/т. Оценивают эффективность обработки семян заявляемым биопрепаратом по сравнению с прототипом (в дозе 1,5 л/т семян) и химическим фунгицидом колфуго супер (в дозе 2,0 л/т семян) [см. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2010 год: Справочное издание, приложение к журналу "Защита и карантин растений" №6, 2010. - М., 2010. - С.150].

Оценку эффективности проводят путем анализа семян во влажной камере и учета развития болезней проростков.

Результаты представлены в таблицах 4 и 5. Обработка зерен заявляемым биопрепаратом приводит к более значительному снижению пораженности семян возбудителями заболеваний (на 95,7-100,0%), чем прототип (на 49,1-68,8%) и химический фунгицид (на 49,5-78,5%) относительно контроля в зависимости от культуры зерновых и возбудителя заболевания. При этом фунгицидный эффект заявляемого биопрепарата сохраняется более длительно (в течение 30 сут) по сравнению с действием прототипа и химического фунгицида (до 7 сут после обработки). Кроме того, заявляемый биопрепарат, в отличие от прототипа и химического фунгицида, полностью устраняет возбудителей плесневения семян и бактериозов. Заявляемый биопрепарат снижает уровень развития болезней проростков в зависимости от сорта и сельскохозяйственной культуры в случае обработки на 94,6-100,0%, интеграл - на 56,0-62,3%, колфуго супер - на 64,5-78,7%.

Таблица 4

Пораженность семян яровой пшеницы сорта Омская 32 фитопатогенными микромицетами при обработке зерен заявляемым биопрепаратом, прототипом и химическим фунгицидом

Фитопатогенные микромицеты	Пораженность семян, %			
	Контроль (без обработки)	Заявляемый биопрепарат	Прототип	Химический фунгицид
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	82,5	2,5	28,5	26,0
<i>Fusarium spp</i>	46,5	2,0	14,5	13,5
<i>Alternaria alternata</i>	93,0	3,0	30,5	27,0
<i>Penicillium spp</i>	28,5	0	14,5	10,5
<i>Aspergillus spp.</i>	8,0	0	3,5	3,0
<i>Mucor spp.</i>	13,5	0	6,0	5,0
<i>Cladosporium spp.</i>	7,0	0	3,0	2,5

Таблица 5

Пораженность семян ярового ячменя сорта Раушан фитопатогенными микромицетами при обработке зерен заявляемым биопрепаратом, прототипом и химическим фунгицидом

Фитопатогенные микромицеты	Пораженность семян, %			
	Контроль (без обработки)	Заявляемый биопрепарат	Прототип	Химический фунгицид
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	84,0	3,0	33,5	24,5
<i>Fusarium spp.</i>	39,5	1,5	19,5	13,0
<i>Alternaria alternata</i>	81,5	2,0	32,0	17,5
<i>Penicillium spp.</i>	29,5	0	14,0	11,0
<i>Aspergillus spp.</i>	25,0	0	11,5	9,0
<i>Mucor spp.</i>	10,5	0	5,0	3,5
<i>Cladosporium spp.</i>	3,0	0	1,5	1,0

Таким образом, заявляемый биопрепарат значительно улучшает фитосанитарное состояние семенного фонда и существенно превосходит по эффективности действия прототип.

5 Пример 5, демонстрирующий наличие стимулирующего действия заявляемого биопрепарата на процессы прорастания семян, рост и развитие растений.

10 Стимулирующий эффект заявляемого биопрепарата демонстрируют на семенах яровой пшеницы, сорт Лада. Биопрепарат получают согласно формуле изобретения. Семена пшеницы в количестве 100 штук замачивают в течение 24 ч в 15 мл биопрепарата, контрольные семена замачивают в воде. После набухания семена раскладывают на влажную фильтровальную бумагу, сворачивают в рулоны и проращивают при температуре 25°C. Всхожесть определяют на 4 сут по числу проросших семян (выражают в процентах от общего числа обработанных семян),  
15 энергию прорастания - на 3 сут, биомассу наземной и корневой частей проростков - на 14 сут.

Разница во всхожести между опытными (обработка заявляемым биопрепаратом) и контрольными (обработка водой) семенами составляет 19%, в энергии прорастания - 10%, в биомассе наземной и корневой частей проростков - 29 и 47% соответственно.  
20 Таким образом, заявляемый биопрепарат оказывает значительное стимулирующее действие на процессы прорастания семян, рост и развитие растений.

Пример 6, демонстрирующий эффективность заявляемого биопрепарата при  
25 предпосевной обработке семян против болезней и влияние на урожайность в вегетационном опыте. Биопрепарат получают согласно формуле изобретения. Вегетационный опыт проводят на делянках площадью 0,5 га на яровом ячмене *Hordeum vulgare* L. сорта Раушан по общепринятой методике полевых и вегетационных опытов [см. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. - М.: Агропромиздат, 1985. - 351 с.]. Обработку семян проводят методом полусухого протравливания при коэффициенте высева всхожих семян 5,5 млн/га и норме расхода заявляемого биопрепарата 1,5 л/т зерна (расход рабочей жидкости - 10 л/т), интеграла и колфуго супер (химический эталон) - 1,5 и 2,0 л/т соответственно; в контрольном варианте семена обрабатывают водой. Предшественник - яровой ячмень. Почва -  
30 выщелоченный чернозем. Урожайность приводят к стандартной 14%-ной влажности и 100%-ной чистоте.

Заявляемый биопрепарат способствует более значительному снижению развития корневой гнили по сравнению с прототипом. Биологическая эффективность  
40 (определяется как разность между долей пораженных растений в контроле и опыте, в процентах к контролю) биопрепарата в конце вегетации составляет 67%, превышает эффективность прототипа на 6,9% и химического фунгицида на 19,7%.

Опыт проводят на высоком инфекционном фоне: количество конидий *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium* составляет до посева 270 и 490 в 1 г воздушно-сухой почвы соответственно. К концу вегетации растений заявляемый биопрепарат снижает численность конидий *B. sorokiniana* до 26 и *Fusarium* - до 42 в 1 г воздушно-сухой почвы;  
45 в варианте с интегралом и химическим фунгицидом достоверных отличий от контроля не обнаружено. Таким образом, заявляемый биопрепарат не только защищает растения от возбудителей корневой гнили, передающихся через семена, но и улучшает фитосанитарное состояние почвы путем снижения запаса почвенной инфекции.  
50

Биологическая эффективность заявляемого препарата против фузариоза колоса, черни колоса и гельминтоспориозной пятнистости составляет 85,9, 90,3, 87,2% соответственно и превышает эффективность интеграла на 13,9, 12,4 и 11,9%

соответственно, эффективность колфуго супер - на 19,5, 13,2 и 23,5% соответственно. Таким образом, заявляемый биопрепарат служит эффективным средством защиты не только от корневой гнили, но и от листостеблевых болезней и болезней колоса.

5 Позитивное влияние заявляемого препарата на урожайность культуры и качество получаемого зерна регистрируют по показателям структуры урожая зерна и содержанию белка. Заявляемый биопрепарат увеличивает массу 1000 зерен на 14,2%, число продуктивных стеблей на 11,3% и озерненность колосьев на 6,6% по сравнению с контролем, при этом увеличивает содержание белка в зерне на 11,4% по сравнению с  
10 контролем. Урожайность зерна при использовании заявляемого биопрепарата превышает уровень контроля на 29,8%. Достоверных различий между контролем, вариантом «интеграл» и «колфуго супер» по элементам структуры урожая и урожайности не выявлено.

15 Пример 7, демонстрирующий нитрогеназную активность заявляемого биопрепарата без внесения и при внесении в почву.

Биопрепарат получают согласно формуле изобретения. Нитрогеназную активность заявляемого биопрепарата определяют ацетиленовым методом с использованием газового хроматографа [см. Калининская Т.А. Применение ацетиленового метода для  
20 количественного учета разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений / Т.А.Калининская, Т.В.Редькина, Ю.М.Белов, Л.Т.Ипполитов, А.В.Кокунов // Микробиология. - 1981. - Т.50, Вып.5. - С.924-927]. Нитрогеназная активность заявляемого биопрепарата без внесения в почву составляет 0,18 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч.

25 Активность азотфиксации в почве при внесении заявляемого биопрепарата определяют ацетиленовым методом согласно [см. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной биохимии и микробиологии: Учебное пособие / Д.Г.Звягинцев. - М.: МГУ, 1991. - 303 с.]. Для этого 0,5 кг почвы распределяют в пластмассовой кювете размером 60×40 см,  
30 равномерно орошают заявляемым препаратом с помощью пульверизатора, почву тщательно перемешивают, переносят в стерильные стаканы емкостью 750 мл, закрывают тонкой полиэтиленовой пленкой и инкубируют при 28°С, поддерживая постоянную влажность в почвенных образцах в пределах 60% от полной влагоемкости. Контрольные образцы обрабатывают водой.

35 Разница в азотфиксирующей активности почвы опытных (обработка заявляемым препаратом) и контрольных (обработка водой) образцов составила 256%. Таким образом, заявляемый биопрепарат повышает естественный уровень плодородия почвы. Высокая азотфиксирующая активность почвы обусловлена как собственной  
40 нитрогеназной активностью заявляемого биопрепарата, так и активизацией почвенной микрофлоры под влиянием стимулирующих метаболитов штамма-продуцента *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008.

Пример 8, демонстрирующий дефосфорилирующую активность заявляемого биопрепарата.

45 Биопрепарат получают согласно формуле изобретения. Дефосфорилирующую активность заявляемого препарата определяют в модельном опыте. Образцы почвы обрабатывают аналогично примеру 7. Через 45 и 90 суток инкубации в контрольных (обработка водой) и опытных (обработка заявляемым биопрепаратом) образцах  
50 определяют содержание подвижного фосфора (мг P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/кг почвы) по методу Кирсанова [см. Соколова А.В. Агрохимические методы исследования почв / А.В.Соколова. - М.: Наука, 1975. - 656 с.].

Разница в содержании подвижного фосфора в почве опытных (обработка

заявляемым биопрепаратом) и контрольных (обработка водой) образцов составляет через 45 суток инкубации 30,3%, через 90 суток - 35,2%. Таким образом, заявляемый биопрепарат повышает естественный уровень плодородия почвы за счет увеличения содержания подвижного фосфора.

Приведенные примеры подтверждают достижение технического результата изобретения.

Таким образом, полный спектр признаков комплексного действия заявляемого изобретения следующий:

1. Широкий спектр высокой антагонистической активности к фитопатогенным микромицетам; фунгицидное действие на микромицеты, вызывающие плесневение, и бактерицидное действие на фитопатогенные бактерии.

2. Стимулирующее действие на рост и развитие растений, которое проявляется в увеличении всхожести и энергии прорастания семян, увеличении накопления биомассы корневой и наземной частей растений, ускорении прохождения фаз развития растений и, как следствие, ускорении процесса созревания сельскохозяйственной продукции (на 15-20 сут). Это преимущественное свойство заявляемого биопрепарата обусловлено как способностью штамма *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 к продуцированию физиологически активных веществ (природных аналогов гиббереллинов, ауксинов, гетероауксинов, цитокининов), так и стимулирующим действием на педоценоз.

3. Способность фиксировать атмосферный азот в количестве, сопоставимом с азотфиксирующей активностью продуцентов азотфиксирующих биопрепаратов.

4. Способность синтезировать литические ферменты, действие которых повышает доступность для растений минеральных и органических соединений почвы за счет их частичного или полного гидролиза до легко усваиваемых соединений и увеличивает общий уровень плодородия почвы.

5. Физическая и химическая совместность биопрепарата с используемыми в сельскохозяйственном производстве химическими фунгицидами, гербицидами, инсектицидами без снижения биологической активности компонентов баковой смеси. Это позволяет уменьшить до минимального уровня нормы расхода химических пестицидов, стоимость обработки семян и вегетирующих растений, обработки зерна при подготовке к хранению, снизить пестицидную нагрузку на агрофитоценозы и получить экологически чистую продукцию, не содержащую остаточные количества пестицидов.

6. Совместимость с биологическими препаратами на основе бактерий из различных систематических групп (на основе *Bacillus* - фитоспорином, интегралом; *Pseudomonas* - псевдобактерином-2, планризом, биопрепаратом Елена; *Azospirillum* - азоризином; *Flavobacterium* - флавобактерином). Это свойство обусловлено устойчивостью штамма *V.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 к антибактериальным метаболитам, синтезируемым бактериями-продуцентами различных биопрепаратов. Указанные препараты при совместном применении с заявляемым биопрепаратом проявляют синергизм антагонистического действия по отношению к фитопатогенным микромицетам.

7. Способность к растворению малорастворимых фосфорсодержащих веществ в почве (в том числе фосфорных удобрений) в растворимые фосфорные соединения, легко вовлекаемые в метаболизм растений.

8. Улучшение фитосанитарного состояния почвы как за счет прямого снижения численности фитопатогенных микроорганизмов в почве, так и косвенным путем за

счет активизации полезной почвенной микрофлоры.

#### Формула изобретения

5 Биопрепарат для стимуляции роста и защиты растений от болезней, повышения урожайности и почвенного плодородия, включающий биомассу из вегетативных клеток и спор бактерий из рода *Bacillus* и гуматы, отличающийся тем, что он содержит биомассу *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 с титром вегетативных клеток и спор  $1,24 \div 1,30 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл и содержанием спор 94% от общего количества КОЕ и гуматы при следующем соотношении компонентов, об.%:

10 биомасса *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 - вегетативных клеток и спор  $1,24 \div 1,30 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл культуральной жидкости и содержание спор 94% от общего количества КОЕ - 99,0;

15 гуматы - 1,0.

20

25

30

35

40

45

50