

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **23625**

(13) **С1**

(46) **2022.02.28**

(51) МПК

A 01N 63/20 (2020.01)

C 12N 1/20 (2006.01)

(54) **ШТАММ RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS, ОБЛАДАЮЩИЙ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ И ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

(21) Номер заявки: а 20200259

(22) 2020.09.16

(71) Заявители: Жук Ольга Николаевна (ВУ); Камельчук Янина Степановна (ВУ); Мутаев Александр Александрович (RU); Цибульский Дмитрий Владимирович (RU)

(72) Авторы: Жук Ольга Николаевна (ВУ); Камельчук Янина Степановна (ВУ); Мутаев Александр Александрович (RU); Цибульский Дмитрий Владимирович (RU)

(73) Патентообладатели: Жук Ольга Николаевна (ВУ); Камельчук Янина Степановна (ВУ); Мутаев Александр Александрович (RU); Цибульский Дмитрий Владимирович (RU)

(56) RU 2570624 C2, 2015.

RU 2495119 C1, 2013.

ВУ 5073 C1, 2003.

ДЕМАКОВ В.А. и др. Почвенные актинобактерии рода *Rhodococcus*, обладающие высокой амидазной активностью. Вестник Пермского университета. Биология, 2009, вып. 10 (36), с. 79-83.

(57)

Штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д, обладающий ростостимулирующей и фунгицидной активностью.

Изобретение относится к биотехнологии, сельскохозяйственной микробиологии и касается нового штамма бактерий, который стимулирует рост растений и защищает их фитопатогенных грибов. Изобретение может быть использовано для производства биологических препаратов, обладающих ростостимулирующей и фунгицидной активностью.

Защита сельскохозяйственных растений от болезней является серьезной экономической проблемой. Сельскохозяйственные культуры подвержены болезням грибной и бактериальной этиологии, которые не только снижают выход продукции, но и ухудшают ее качество.

Один из широко используемых методов защиты растений - обработка биостатическими и биоцидными химикатами. Их в большинстве случаев наносят опрыскиванием на посевы, обрабатывают ими семена или корни растений, дезинфицируют почву. Часто использование химических соединений эффективно, но это приводит к нежелательным последствиям для окружающей среды, требует осторожности в обращении из-за риска для здоровья человека, и, кроме того, их использование может стать неэффективным при появлении устойчивых патогенных штаммов.

BY 23625 C1 2022.02.28

Одним из путей снижения заболеваний и увеличения урожайности сельскохозяйственных культур является использование биологических средств - штаммов микроорганизмов или микробных препаратов, способных подавлять развитие патогенов, способствовать росту и развитию растений.

Известен штамм *Pseudomonas chlororaphis* NCIMB 40616 для борьбы с заболеваниями растений, вызываемыми патогенными грибами [BY 5073 C1, 2003]. Указанный штамм бактерий обладает неплохим спектром активности в отношении патогенных грибов, однако не обладает ростостимулирующей активностью. Аналогичный недостаток свойственен штамму *Bacillus subtilis* КМБУ 30043, обладающему антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов и бактерий [BY 3962 C1, 2001].

Известен штамм бактерий *Rahnella aquatilis* БИМ В-704 Д, обладающий антифунгальной активностью, для стимуляции роста посадочного материала деревьев хвойных пород [BY 19895 C1, 2016]. Известен штамм бактерий *Azotobacter vinelandii*, на основе которого получен биопрепарат, подавляющий развитие заболеваний растений пшеницы, вызываемых корневыми гнилями, и стимулирующий рост растений [RU 2224791 C1, 2004]. К недостаткам указанных штаммов можно отнести их узкую направленность - деревья хвойных пород, пшеница.

Близким к заявляемому штамму является штамм *Bacillus subtilis* 8А, который обладает фунгицидной активностью против фитопатогенных грибов, а также ростостимулирующей активностью по отношению к различным сельскохозяйственным культурам [RU 2495119 C1, 2013].

Задачей изобретения является выделение штамма бактерий с целью использования в сельском хозяйстве, в частности в виде микробного препарата, для повышения продуктивности растений и защиты их от заболеваний, вызываемых фитопатогенными грибами. Предлагаемое изобретение позволит расширить ассортимент экологически безопасных штаммов бактерий и препаратов на их основе, применяемых в сельском хозяйстве.

Поставленная задача решается за счет нового штамма бактерий рода *Rhodococcus*, обладающего высокой фунгицидной и ростостимулирующей активностью. Штамм *Rhodococcus erythropolis* S18 был выделен из диких почв о. Сахалина путем многократных пассажей с отбором колоний и последующей его идентификацией.

Генетический анализ с использованием полимеразной цепной реакции проводили на базе Института микробиологии НАН Беларуси.

Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Осуществляли расщепление культуры штамма *Rhodococcus erythropolis* S18 до изолированной колонии, затем получали биомассу для выделения ДНК изолят S 18.

Выделение геномной ДНК осуществляли, используя коммерческий набор "Jena Bioscience" (Германия) согласно прилагаемой инструкции.

Аmplификацию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили с использованием универсальных эубактериальных праймеров: 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttacctgttacgactt-3').

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкл ДНК-матрицы (10-20 нг), 2 мкл 10X "АМ" буфера для Taq-полимеразы, 2 мкл смеси дНТФ (по 2 мМ), по 1 пМ каждого праймера, 0,25 мкл Taq-полимеразы (1,25 ед.).

Температурно-временной профиль амплификации:

1 цикл - 5 мин при 95 °С;

30 циклов - 95 °С - 20 с, 55 °С - 20 с, 72 °С - 90 с;

1 цикл - 5 мин при 72 °С;

охлаждение до 4 °С.

Продукты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза: в 1 % агарозном геле с использованием 1X ТАЕ-буфера, напряженность электрического поля - 5 В/см. Визуализация ДНК - окрашивание раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). Стандарт для оп-

BY 23625 C1 2022.02.28

ределения размера продуктов ПЦР - маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder 1Kb Plus (Thermo Scientific).

Для очистки целевого продукта ПЦР использовали коммерческий набор DNA Extraction kit (Thermo Scientific, Литва) согласно прилагаемой инструкции.

Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции.

Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (США).

Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plain text выполняли с помощью программы e-Seq™ Software.

Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей проводили онлайн с использованием баз данных GenBank и Ribosomal Database Project (RDP). При проведении ПЦР на матрице геномной ДНК изолята S 18 с универсальными праймерами 8f и 1492g для амплификации нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК получен ампликон размером ~1500 п. н., что соответствует ожидаемому размеру целевого продукта (полная последовательность гена 16S рРНК).

При секвенировании амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК с использованием эубактериального универсального праймера 926 г (5'-ccgysaattymtttagttt-3') получена следующая нуклеотидная последовательность (762 п. н.):

```
TGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTACGTACGGCACGGATTCCGTGGAAGGA  
ACCCACACSTAGCGCCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATСТААТCCTGTTTCGСТАСС  
CACGCTTTCGTTCCSTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAGACCCGCSTTCGCCACCGGTGTTCCSTCC  
TGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCTGCAGTACTCAAGTCTGC  
CCGTATCGCCTGCAAGCCAGCAGTTGAGCTGCTGGTTTTACAAACGACGCGACAAACCGCСТА  
CGAАСТСТTACGCCAGTAATTCGGGACAACGCTTGCACCSTACGTATTACCGCGGCTGCTGG  
CACGТАGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTTCCCTGCTGAAAGAG  
GTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCSTCACGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTG  
СААТАТТССССАСТGCTGCSTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGT  
CACCTCTCAGGTTCGGCTACCGTTCGCTGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATA  
GGCGCGGGCCCA TCCTGCACCGATAAATCTTTCACCCCAAGTCATGCAACCTGAGGT CATAT  
CCGGtATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCCGAAGTGcAGGGCAGATCAcCCACGT
```

Первичный скрининг по базе данных Ribosomal Database Project (RDP) показал, что изолят S 18 относится к царству Bacteria; отделу Actinobacteria; классу Actinobacteria; порядку Actinomycetales; семейству Nocardiaceae; роду Rhodococcus.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изолята S 18 с референтными нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S представителей рода Rhodococcus, видов Rhodococcus sp. (99,61 %), Rhodococcus erythropolis (99,61 %):

Вид	Max score	Total score	Query cover	E-value	Идентичность	Номер доступа
Rhodococcus sp. strain BGI-11	1393	1393	100 %	0.0	99.61 %	MK522045.1
Rhodococcus erythropolis strain EvN-9	1393	1393	100 %	0.0	99.61 %	MK371078.1

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изолята S 18 с референтными нуклеотидными последовательностями типовых штаммов из базы данных Ribosomal Database Project (RDP) выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S представителей рода Rhodococcus, вида Rhodococcus erythropolis (99,7 %).

BY 23625 C1 2022.02.28

*similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name

<u>S000001649</u>	0.967	0.857	1369	Rhodococcus wratislaviensis (T); NCIMB 13082(type strain); Z37138
<u>S000009694</u>	0.997	0.981	1391	Rhodococcus erythropolis (T); X79289
<u>S000015177</u>	0.969	0.862	1390	Rhodococcus jostii (T); IFO16295; AB046357
<u>S000334611</u>	0.981	0.936	1289	Rhodococcus baikonurensis (T); GTC1041; AB071951
<u>S000364372</u>	0.974	0.884	1384	Rhodococcus marinonascens (T); type strain: DSM43752; X80617
<u>S000364374</u>	0.972	0.912	1380	Rhodococcus globerulus (T); type strain: DSM4954; X80619
<u>S000364385</u>	0.967	0.849	1370	Rhodococcus opacus (T); type strain: DSM43205; X80630
<u>S000384429</u>	0.969	0.854	1262	Rhodococcus tukisamuensis (T); Mb8; AB067734
<u>S000387216</u>	0.963	0.858	1379	Rhodococcus koreensis (T); DNP505; AF124342
<u>S000438867</u>	0.969	0.846	1398	Rhodococcus coprophilus (T); JCM 3200; U93340
<u>S000499733</u>	0.965	0.868	1338	Rhodococcus maanshanensis (T); M712; AF416566
<u>S000544287</u>	0.972	0.869	1394	Rhodococcus triatomaе (T); type strain: IMMIB RIV-085; AJ854055
<u>S000548352</u>	0.959	0.851	1390	Rhodococcus yunnanensis (T); YIM 70056; AY602219
<u>S000558869</u>	0.985	0.959	1406	Rhodococcus qingshengii (T); djl-6; DQ090961
<u>S000891048</u>	0.958	0.850	1361	Rhodococcus kyotonensis (T); DS472; AB269261
<u>S000980546</u>	0.961	0.841	1409	Rhodococcus cercidiphylli (T); YIM 65003; EU325542
<u>S001152390</u>	0.985	0.959	1408	Rhodococcus jialingiae (T); djl-6-2; DQ185597
<u>S002304678</u>	0.997	0.991	1427	Nocardia coeliaca (T); type strain: DSM44595; FR733721
<u>S002350778</u>	0.973	0.924	1410	Nocardia globerula (T); type strain: DSM 44596; FR749915
<u>S002916717</u>	0.973	0.861	1432	Rhodococcus canchipurensis (T); MBRL 353; JN164649

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97 %, следовательно, наиболее вероятно принадлежность изолята S 18 к виду *Rhodococcus erythropolis* (99,7 %). Вид относится к микроорганизмам 1-2 группы риска согласно классификации Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ).

Таким образом, родословная заявляемого штамма: царство Bacteria, тип Actinobacteria, отряд Actinomycetales, подотряд Corynebacterineae, семейство Nocardiaceae, род *Rhodococcus*, вид *Rhodococcus erythropolis*.

Штамм депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под регистрационным номером БИМ В-1342 Д (справка о депонировании прилагается).

Характеристика штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д.

Культурально-морфологические признаки.

Штамм в лабораторных условиях хорошо растет на питательных средах следующего состава.

1. Среда МПА (г/л): говяжье мясо 1 кг отделяют от жира и фасций, измельчают, заливают водой в соотношении 1:2 и кипятят в течение 30-60 мин. Затем фильтруют, доливают до первоначального объема и стерилизуют в течение 30 мин. К полученной мясной воде добавляют пептон - 10,0 г/л, поваренную соль - 5,0 г/л, агар-агар - 15,0 г/л, pH среды (до стерилизации) - 7,3-7,5.

При выращивании на среде МПА при 28 °С в течение 96 ч штамм образует выпуклые блестящие слизистые колонии размером 2-4 мм, гладкие, с ровным краем, бежевого цвета, тягучей консистенции.

2. Солевая среда МТ-1 (г/л): K_2HPO_4 - 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7$ - 0,005 г, CaCO_3 - 3,5 г; сахара - 20,0 г, вода - до 1 л; pH среды (до стерилизации) - 7,0.

На 4-е сутки на поверхности жидкой солевой питательной среды МТ-1 проявляется поверхностный рост штамма в виде тонкой, толщиной 2-3 мм, пленки светло-серого цвета.

3. Среда Эшби (г/л): сахара - 20,0 г, K_2HPO_4 - 0,2 г, MgSO_4 - 0,2 г, NaCl - 0,2 г, K_2SO_4 - 0,2 г, CaCO_3 - 5,0 г, агар-агар - 20,0 г, вода - до 1 л.

BY 23625 C1 2022.02.28

Через 36 ч роста на поверхности среды образуются слизистые колонии серовато-белого цвета размером до 3 мм. После 96 ч роста цвет колоний приобретает кремовый оттенок, после 168 ч - буроватый оттенок за счет синтеза пигмента.

4. Среда Берка (г/л): KH_2PO_4 - 0,8 г, K_2HPO_4 - 0,2 г, MgSO_4 - 0,2 г, NaCl - 0,2 г, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ - 0,01 г, CaSO_4 - 0,1 г, глюкоза - 10,0 г, агар-агар - 15,0 г, вода - до 1 л, pH среды - 6,8-7,0.

После 96 ч культивирования при $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ штамм образует выпуклые, с ровным краем колонии круглой формы, слегка беловатые, с гладкой блестящей поверхностью.

Морфологические признаки.

В молодой культуре клетки имеют форму крупных, коротких палочек с закругленными концами. С возрастом клетки принимают округлую форму, становятся крупными коками. Кокки соединены по две или четыре клетки и покрыты общей толстой слизистой капсулой. Окраска клеток по Граму - положительная.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм является аэробом; оптимальная температура роста $24\text{-}30^\circ\text{C}$, оптимальное значение pH - $6,9\text{-}7,5$.

Ассимилирует мальтозу, маннозу, фруктозу, сахарозу, глюкозу, углеводороды, этиловый спирт, глицерин, потребляет уксусную, пропионовую, масляную, лимонную, салициловую кислоты. Ассимилирует аммонийный и нитратный азот. При выращивании не требует добавки факторов роста и витаминов в питательную среду.

Кислотообразование при росте на сахарах и углеводородах слабое. Не разжижает желатин. Индол и сероводород не образует. Штамм каталазоположителен.

Ферментативная активность.

У штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д было выявлено наличие протеолитической активности: через 20 ч инкубирования площадь лизиса составила $28,6 \pm 2,8 \text{ мм}^2$. Способности лизировать карбоксиметицеллюлозу не выявлено.

Для характеристики штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д использовали дифференциально-диагностические питательные среды - Берка, Федорова, Эшби, солевую питательную среду МТ-1 - и элективные среды - картофельно-глюкозный агар (КГА), картофельно-сахарозную среду (КСС), мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ). Протеолитическую активность штамма определяли по способности культуры лизировать желатин в тонком слое агарового геля, а целлюлолитическую - по способности лизировать карбоксиметилцеллюлозу.

Особые свойства.

Штамм подавляет развитие фитопатогенных грибов родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Phoma*, *Colletotrichum*, проявляя ярко выраженную антагонистическую активность. Стимулирует рост и развитие растений.

Поддержание штамма.

Штамм хранится в холодильнике при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в пробирках на картофельно-сахарозном агаре с перевивкой 1 раз в 3 месяца.

Получение картофельно-сахарозного агара: 200 г очищенного картофеля варят в 1000 мл водопроводной воды в течение 40 мин, полученный отвар фильтруют через марлю, добавляют 20 г агара и доводят объем до 1000 мл. Среду стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 20 мин.

При хранении штамма в лиофилизированном состоянии в ампулах частота перезакладки - 1 раз в 5 лет.

Для размножения штамма используют выращивание на среде Эшби следующего состава, г/л: сахароза - 20,0; K_2HPO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,2; NaCl - 0,2; K_2SO_4 - 0,2; CaCO_3 - 5,0; агар - 20, вода - до 1 л. Среду стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 20 мин.

Сущность предлагаемого изобретения иллюстрируют, но не ограничивают следующие примеры.

ВУ 23625 С1 2022.02.28

Пример 1.

Исследовали влияние суспензии микроорганизмов штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д на рост рапса. Опыты проводили в 3 повторах на чашках Петри, количество семян в одной чашке Петри - 25 шт. Использовали суспензию микроорганизмов с титром $1,3 \times 10^8$ КОЕ/см³. Для опытов на чашках № 0-5 использовали серию разведений при следующем объемном соотношении суспензии микроорганизмов к воде:

№ 0 - 0:20 (вода - контроль);

№ 1 - 2:18;

№ 2 - 5:15;

№ 3 - 10:10;

№ 4 - 15:5;

№ 5 - 20:0 (исходная суспензия с титром $1,3 \times 10^8$ КОЕ/см³).

Все данные по ростостимулирующей активности штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д, показанные на семенах рапса, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на проращение семян рапса

Серия разведения	1-е сут.		2-е сут.		3-и сут.		4-е сут.		5-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	45	-	60	4,4	66	6,9	66	15,3	66	22,3
№ 1	45	-	66	4,6	69	6,7	69	17,9	69	25,3
№ 2	42	-	65	6,9	72	7,5	72	21,8	72	32,6
№ 3	51	-	66	9,0	70	11,4	70	28,1	72	35,4
№ 4	40	-	69	4,5	72	10,5	72	22,0	73	38,1
№ 5	39	-	59	4,4	64	14,1	64	21,5	64	31,3

Через сутки проросшие семена во всех чашках составили более 50 % от общего количества семян (с учетом повторности). Наибольшее количество проросших семян через сутки оказалось в чашке № 3 (соотношение 10:10) - 51 шт. семян, на 13 % больше, чем в контроле.

На 2-е сутки процент проросших семян составил уже 85,6 от общего количества семян. Количество проросших семян в чашках № 1-4 на 8-15 % превышало контроль (чашки № 0). В среднем длина проростков в обработанных суспензией микроорганизмов чашках составила 5,9 мм, что превышает контроль на 33,6 %. Наибольший рост наблюдается в чашках № 3 (соотношение 10:10) - длина проростков составила 9,0 мм (на 104,6 % больше контроля).

На 3-е сутки проросло более 91,0 % от всех семян, включая контрольные. Лучшие показатели в чашках № 2-4. Наибольший рост отмечается в чашках № 5 - длина проростков составила 14,1 мм (в 2 раза лучше контроля).

На 4-е и 5-е сутки эксперимента количество проросших семян осталось неизменным. Следует отметить, что рост на 4-е сутки особенно усилился в чашках № 3 - длина проростков составила 28,1 мм (в 1,8 раза лучше контроля).

На 5-е сутки лучшие результаты роста показали семена рапса в чашках № 4 - длина проростков составила 38,1 мм (в 1,7 раза лучше контроля).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что заявляемый штамм обладает ростостимулирующей активностью. Обработка суспензией микроорганизмов штамма

BY 23625 C1 2022.02.28

Rhodococcus erythropolis БИМ В-1342 Д оказывает позитивный эффект на всхожесть семян рапса и длину проростков. Лучшие результаты по проросткам были получены на чашках № 2-5 - на 40,4-70,9 % больше по отношению к контролю на 5-е сутки роста.

Пример 2.

Исследовали влияние суспензии микроорганизмов штамма Rhodococcus erythropolis БИМ В-1342 Д на рост кукурузы. Опыты проводили в 3 повторностях на чашках Петри, количество семян в одной чашке Петри - 10 шт. Использовали суспензию микроорганизмов заявляемого штамма с титром $1,3 \times 10^8$ КОЕ/см³. Для опытов делали серию разведений при следующем объемном соотношении суспензии микроорганизмов к воде:

№ 0 - 0:20 (вода - контроль);

№ 1 - 2:18;

№ 2 - 5:15;

№ 3 - 15:5;

№ 4 - 20:0 (исходная суспензия с титром $1,3 \times 10^8$ КОЕ/см³).

Результаты влияния суспензии заявляемого штамма на прорастание и дальнейшее развитие семян кукурузы представлены в табл. 2.

На первые сутки проросло 36,7 % семян кукурузы от их общего количества. Наибольшее количество проросших семян оказалось в чашках № 2 и 4 (соотношение 5:15 и 20:0 соответственно) - 13 и 18 шт.

На вторые сутки все семена кукурузы в чашках проросли. Средняя длина проростков в чашках № 1-4 составила 7,95 мм, в контроле (чашки № 0) - 3,8 мм, то есть в 2 раза лучше контроля. Наибольшая длина проростков отмечалась в чашках № 4 - 8,8 мм, также в этих чашках образовалось наибольшее количество корней - 78 шт.

Таблица 2

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на прорастание семян кукурузы

Серия разведен	1-е сут.		2-е сут.			3-и сут.			4-е сут.			5-е сут.			Длина проростков на 5-е сутки по отношению к контролю, %
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во корней, шт.	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во корней, шт.	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во корней, шт.	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во корней, шт.	
№ 0	9	-	26	3,8	58	29	19,0	87	29	37,3	87	29	58,3	87	100,0
№ 1	8	-	27	7,2	57	29	20,5	88	29	41,3	88	29	66,6	88	114,2
№ 2	13	-	27	7,8	66	30	23,5	89	30	42,2	89	30	69,2	86	118,7
№ 3	9	-	30	8,0	66	30	24,4	86	30	49,2	86	30	64,5	86	110,6
№ 4	18	-	30	8,8	78	30	26,3	86	30	42,6	86	30	59,6	86	102,2

В последующие 3-4-е сутки тенденции сохраняются.

На 5-е сутки эксперимента лучшие результаты по длине проростков были получены на чашках № 1-3 - 110,6-118,7 % по отношению к контролю.

Полученные данные свидетельствуют о том, что обработка семян кукурузы суспензией заявляемого штамма ускоряет прорастание семян, способствует увеличению длины проростков и стимулирует рост корневой системы.

Пример 3.

Штамм Rhodococcus erythropolis БИМ В-1342 Д представляет интерес и в качестве агента биологической защиты, так как обладает выраженным фунгицидным действием.

ВУ 23625 С1 2022.02.28

Антагонистическую активность штамма определяли методом агаровых блочков [Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: "Высшая школа", 1965, С. 131] через 3-6 суток роста тест-культур на диагностической среде. В качестве тест-культур использовали различные виды фитопатогенных грибов.

Штамм подавляет рост грибов *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*, *Colletotrichum lupini*. По отношению к грибам *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma sp.* фунгицидное действие заявляемого штамма носит ярко выраженный характер.

Данные по антагонистической активности заявляемого штамма приведены в табл. 3.

Таблица 3

Антагонистическая активность штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д

Тест-культура фитопатогенных микроорганизмов	Ингибирование роста фитопатогенов
<i>Alternaria alternata</i>	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+++
<i>Penicillium sp.</i>	++
<i>Phoma sp.</i>	+++
<i>Colletotrichum lupini</i>	+

Примечание. " + " - зона подавления роста более 6 мм, " ++ " - зона подавления роста более 9 мм, " +++ " - зона подавления роста более 12 мм.

Пример 4.

Исследовали, как обработка суспензией микроорганизмов заявляемого штамма оказывает влияние на рост кукурузы в грунте.

Для этого перед посадкой семена замачивали на 24 ч в суспензии микроорганизмов с титром $2,06 \times 10^6$ КОЕ/см³ (эксперимент), контроль - замачивание в воде. Посадка кукурузы в грунт производилась в ящики размером 100×50×25 см, расстояние в рядке между семенами - 6 см. Высадка семян производилась в 2 ящика, один из которых - контроль. Было высажено по 60 семян кукурузы в каждый ящик. Результаты наблюдений за ростом кукурузы представлены в табл. 4-6.

Таблица 4

Всхожесть кукурузы в открытом грунте

День наблюдения	Количество взошедших семян, замоченных в воде, шт. (контроль)	Количество взошедших семян, обработанных бактериальной суспензией, шт.	% всхожести семян по отношению к контролю
1 (посадка)	-	-	-
2-4	-	-	-
5	9	15	166,7
6	40	48	120,0
7	49	57	116,3
8	49	57	116,3
9	49	57	116,3
10	49	57	116,3
11	49	57	116,3
12	49	57	116,3

ВУ 23625 С1 2022.02.28

Первые всходы кукурузы в 2 ящиках появились на пятый день, причем количество ростков обработанных семян оказалось в 1,5 раза больше, чем в контроле. При этом энергия прорастания семян кукурузы составила: для контрольных - 15 %, для обработанных суспензией - 25 %.

На 10-12-й день всхожесть семян кукурузы составила: для контрольных - 81,7 %, для обработанных суспензией - 95,0 %. По отношению к контрольным всхожесть обработанных семян составила 116,3 %.

С 1-го по 5-й день особого различия между ящиками не наблюдалось. В последующие дни наблюдалось преимущество в росте растений кукурузы (высота растений, количество листьев), выросших из обработанных семян.

Таблица 5

Формирование растения кукурузы по дням

День наблюдения	Высота растения, мм*		Высота растений по отношению к контролю, %	Количество листьев, шт.**	
	Контроль	Эксперимент		Контроль	Эксперимент
1 (посадка)	-	-		-	-
2-4	-	-		-	-
5	13,5	14,5	107,4	-	-
6	31,5	35,5	112,7	-	-
7	45,5	54,0	118,7	1,5	1,5
8	79,0	93,5	118,4	2,0	2,5
9	114,0	135,0	118,4	2,5	3,0
10	158,5	187,5	118,3	3,0	3,5
11	187,5	226,0	120,5	3,0	4,5
12	202,5	257,0	126,9	3,5	4,5

* Среднее значение высоты растений.

** Среднее значение количества листьев.

В табл. 6 представлены результаты (усредненные значения) влияния суспензии микроорганизмов заявляемого штамма на развитие корневой системы растений кукурузы.

Таблица 6

Формирование корневой системы растений кукурузы по дням (контроль - К, эксперимент - Э)

День наблюдения	Количество главных корней		Длина главных корней, мм		Длина главных корней по отношению к контролю, %	Опушенность главных корней		Наличие придаточных корней	
	К	Э	К	Э		К	Э	К	Э
1(посадка)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	3,3	3,4	38,5	40,0	104,0	+	+	-	-
6	3,4	3,4	45,0	49,5	110,0	+	++	-	-
7	4,4	4,4	53,5	63,0	117,8	++	++	-	-
8	4,4	4,4	101,5	121,0	119,2	++	+++	-	-
9	4,4	4,4	115,0	140,0	121,7	++	+++	-	-
10	5,4	5,5	120,0	149,5	124,6	++	+++	-	-
11	-	-	125,5	155,5	123,9	++	+++	3,3	4,4
12	-	-	145,5	179,0	123,0	++	+++	3,4	5,4

Примечание. " + " опушенность малая, " ++ " - средняя, " +++ " - обильная.

ВУ 23625 С1 2022.02.28

Для исследования корневой системы после всходов в день брали 2 растения среднего роста в популяции. Исследования проводилось в течение первых 12 дней. В дальнейшем изымание растений из почвы не проводилось, так как корни сильно разрослись, ушли вглубь почвы и в стороны, начали переплетаться с соседними растениями, и достать растение, не повредив близрастущие, стало невозможно. То есть не удалось бы получить достоверные результаты.

Формирование корневой системы кукурузы стало заметным на 5-й день наблюдения. С 11-го дня прекратилось образование новых главных корней как в контроле, так и в эксперименте. Длина главных корней в период наблюдений в эксперименте устойчиво превышала длину главных корней контроля на 104,0-124,6 %. Опушенность корней на 5-й день наблюдений была незначительной, к 7-му дню - средняя как в контроле, так и в эксперименте. С 8-го по 12-й день наблюдений опушенность главных корней в контроле осталась средней, а в эксперименте стала обильной. По образованию на 11-12-й день наблюдений придаточных корней получены следующие результаты: в эксперименте их среднее число составило 4,4-4,9, тогда как в контроле - 3,3-3,4 соответственно.

Результаты, представленные в табл. 4-6, свидетельствуют о ростостимулирующей активности бактериальной суспензии заявляемого штамма, выражающейся в высокой всхожести семян за более короткий срок, в положительном влиянии на рост побегов и формирование развитой корневой системы.

Пример 5.

Проводили исследования влияния суспензии *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д на рост рапса в грунте.

Перед посадкой семена рапса замочили на 24 ч в бактериальной суспензии с титром $2,06 \times 10^6$ КОЕ/см³ (эксперимент) и в воде - контроль. На следующие сутки семена высадили в ящики с грунтом, размер ящиков 50×40×25 см; расстояние в рядке между семенами - 4 см. Высадка семян производилась в 2 ящика, по 55 семян в каждый.

Таблица 7

Всхожесть рапса по дням

День наблюдения	Количество взошедших семян (контроль), шт.	Количество взошедших семян (эксперимент), шт.	Всхожесть семян по отношению к контролю, %
1 (посадка)	-	-	-
2	-	-	-
3	-	3	-
4	6	16	266,7
5	28	32	114,3
6	34	44	129,4
7	46	48	104,3
8	48	52	108,3
9	49	54	110,2
10-14	49	54	110,2

Первые всходы рапса появились на 3-й день в ящике, где были высажены семена, обработанные бактериальной суспензией заявляемого штамма. На следующий день появились первые "контрольные" всходы. Однако ростков из обработанных семян оказалось в 2,66 раза больше, чем в контроле. При этом энергия прорастания семян рапса составила: для контрольных - 10,9 %, для обработанных суспензией - 29,1 %.

ВУ 23625 С1 2022.02.28

На 10-14-й день всхожесть семян рапса составила: для контрольных семян - 89,1 %, для обработанных суспензией - 98,2 %. По отношению к контрольным всхожесть обработанных семян составила 110,2 %.

Далее в табл. 8 приведены результаты формирования растения рапса с течением времени.

Таблица 8

Формирование растения рапса по дням

День наблюдения	Высота стебля растения, мм*		Высота стебля растения по отношению к контролю, %	Количество листьев, шт.**	
	Контроль	Эксперимент		Контроль	Эксперимент
1 (посадка)	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	5,5	-	-	2
4	3,5	10,0	285,7	2	2
5	9,0	21,0	233,3	2	2
6	20,5	28,5	139,0	2	2
7	32,5	40,5	124,6	2	2
8	39,0	47,5	121,8	2	2,5
9	45,5	56,5	124,2	2	2,5
10	56,0	68,5	122,3	2,5	3,5

* Средняя высота растений.

** Среднее количество листьев у растений.

В экспериментальном ящике на 3-5-й день происходило активное формирование растений рапса (высота стебля, появление листьев). К 7-10-му дню по отношению к контрольным растениям сохранялось преимущество по высоте стебля и количеству листьев экспериментальных растений рапса в среднем на 21,8-24,6 %.

Для исследования корневой системы после всходов в день брали два растения среднего роста в популяции. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9

Формирование корневой системы рапса по дням

День наблюдения	Длина корней, мм*		Длина корней по отношению к контролю, %
	Контроль	Эксперимент	
1 (посадка)	-	-	-
2	-	-	-
3	-	<5	-
4	<5	<5	-
5	<5	<5	-
6	<5	5,0	-
7	5,0	10,0	200,0
8	10,0	20,5	205,0
9	19,5	28,5	146,2
10	23,5	33,5	142,6
11	25,0	37,5	150,0
12	30,0	43,5	145,0

*Средняя длина корней.

ВУ 23625 С1 2022.02.28

Исследование корневой системы проводили по 12-й день включительно, начиная с 13-го изымание растений из почвы не проводилось, так как корни разрослись (корневая система у рапса мочковатого типа), и достать растение, не повредив близрастущие, стало невозможным.

В первые 6 дней наблюдения корневая система рапса была слаборазвитой, длина корней не превышала 5,0 мм. На 7-й день наблюдений у контрольных растений длина корней составила 5 мм, а у экспериментальных - 10 мм, то есть в 2,0 раза больше. В дальнейшем корневая система экспериментальных растений оставалась на 42,6-50,0 % больше, чем корневая система контрольных.

Результаты демонстрируют высокую ростостимулирующую активность бактериальной суспензии заявляемого штамма и на рапсе.

Пример 6.

Проводили исследования влияния суспензии штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д на проращивание семян огурца, кресс-салата, свеклы, капусты и петрушки. Результаты представлены в табл. 10-14.

Исследования проводили в чашках Петри в 3 повторностях (контроль и эксперимент), количество семян в одной чашке Петри - 10 шт. Для контроля семена замачивали в воде, в эксперименте в качестве исходной использовали бактериальную суспензию с титром $2,5 \times 10^9$ КОЕ/см³ и одно из разведений, показавшее высокую ростостимулирующую активность.

№ 0 - 0:20 (вода - контроль);

№ 1 - 15:5;

№ 2 - 20:0 (исходная суспензия с титром $2,5 \times 10^9$ КОЕ/см³).

Таблица 10

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на проращивание семян огурца

Серия разведений	3-и сут.		5-е сут.		7-е сут.		10-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	8,3	1,1	9,0	7,4	10,0	10,8	10,0	12,3
№ 1	10,0	1,3	10,0	12,3	10,0	15,6	10,0	24,9
№ 2	9,0	1,2	9,8	10,6	10,0	14,8	10,0	19,6

Примечание. Данные представлены в виде средних значений.

На 3-5-е сутки во всех чашках наблюдалось проращивание семян огурца. Однако количество проросших семян в эксперименте было выше, а длина проростков по сравнению с контролем составила 10,6 и 12,3 мм против 7,4 мм, превышает контрольные показатели на 43,2 и 66,2 % соответственно. На 7-е сутки проросли все семена. Наибольшую среднюю длину проростков в конце наблюдений на 10-е сутки имели семена огурца в чашках № 1, где превышение составило 102,4 % по отношению к контролю. На 5-е сутки наблюдений во всех чашках произошло проращивание семян кресс-салата: наибольшее количество проросших семян оказалось в чашках № 1 и 2 - 9 шт. и 10 шт., тогда как в чашках № 0 (контроль) - 7,6 шт., то есть больше на 14 и 24 % соответственно.

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на прорастание семян кресс-салата

Серия разведений	5-е сут.		7-е сут.		10-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	7,6	2,0	10,0	5,6	10,0	50,3
№ 1	9,0	2,2	10,0	6,9	10,0	59,4
№ 2	10,0	2,4	10,0	10,3	10,0	71,5

Примечание. Данные представлены в виде средних значений.

На 7-е сутки все семена во всех чашках проросли. Однако длина проростков в экспериментальных чашках № 1 и 2 превышала контроль на 23,2 и 83,9 % соответственно. К 10-м суткам длина проростков также лидировала в чашках № 1 и 2, что составило на 18,1 и 42,1 % больше контрольных.

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на прорастание семян свеклы

Серия разведений	5-е сут.		7-е сут.		10-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	5,6	2,0	7,6	5,3	8,0	10,1
№ 1	8,7	2,6	10,0	6,4	10,0	13,5
№ 2	9,0	2,7	10,0	7,9	10,0	15,1

Примечание. Данные представлены в виде средних значений.

Аналогичное влияние суспензия микроорганизмов заявленного штамма оказывала и на семена свеклы: большее количество проросших семян и более длинные ростки были в эксперименте по сравнению с контролем. На пятые сутки во всех чашках с исследуемыми концентрациями произошло прорастание семян свеклы: наибольшее количество проросших семян оказалось с использованием концентраций № 1 и 2 - 8,7-9 шт., а в контроле - 5,6 шт. На седьмые сутки количество проросших семян в чашках с концентрациями № 1 и 2 достигло максимального значения - 10 шт. На 10-е сутки количество проросших семян составило на 20 % больше, чем в контроле в чашках № 1 и 2, а длина проростков в этих чашках составила на 33,7 и 49,5 % больше контрольных.

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на прорастание семян капусты

Серия разведений	5-е сут.		7-е сут.		10-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	4,6	1,8	7,3	4,7	8,0	7,9
№ 1	5,6	2,1	7,7	5,3	8,3	8,6
№ 2	7,7	2,4	9,3	6,2	10,0	9,7

Примечание. Данные представлены в виде средних значений.

На пятые сутки эксперимента во всех чашках произошло прорастание семян капусты: наибольшее число проросших семян оказалось при использовании концентрации № 2 - 7,7 шт., при концентрации № 1 - 5,6 шт., а в контроле - по 4,6 шт. соответственно. На седьмые сутки количество проросших семян приблизилось к максимальному значению при использовании концентрации № 2 - 9,3 шт. Наибольшую длину проростков демонстрирует также концентрация № 2 - 6,2 мм. На десятые сутки наибольшую среднюю длину проростков и количество проросших семян показала концентрация № 2 - соответственно на 22,8 и 20 % больше контрольных.

Влияние суспензии микроорганизмов заявленного штамма на прорастание семян петрушки

Серия разведений	5-е сут.		7-е сут.		10-е сут.	
	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм	Кол-во проросших семян, шт.	Длина проростков, мм
№ 0	-	-	3,3	2,2	5,6	5,3
№ 1	-	-	3,7	2,4	7,7	6,6
№ 2	-	-	4,6	4,3	9,0	7,1

Примечание. Данные представлены в виде средних значений.

На пятые сутки эксперимента семена петрушки не проросли во всех чашках при всех исследуемых концентрациях. На седьмые сутки количество проросших семян при концентрациях № 1 составило 3,7 шт., в контроле - 3,3 шт., при концентрации № 2 - 4,6 шт., что составило максимальное значение. Также максимальное среднее значение длины проростков демонстрирует концентрация № 2 - 4,3 мм. На десятые сутки наибольшее количество проросших семян и средний рост показала концентрация № 2 - 7,1 мм и 9,0 шт., тогда как в контроле наблюдалась наименьшая длина проростков 5,3 мм. Концентрация № 1 показала среднее значение - 7,7 шт. и 6,6 мм.

Rhodococcus erythropolis оказывает влияние на прорастание семян петрушки и их рост, лучшее действие показала концентрация № 2, где соотношение *Rhodococcus erythropolis*: вода - 20:0, что составило на 10-е сутки на 34 % больше по сравнению с контролем.

Исследования, проведенные на семенах рапса, кукурузы, огурца, кресс-салата, капусты и петрушки, обработанных бактериальной суспензией штамма *Rhodococcus erythropolis*

ВУ 23625 С1 2022.02.28

БИМ В-1342 Д, демонстрируют высокую ростостимулирующую активность этого штамма.

Показано, что обработка бактериальной суспензией штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д повышает энергию прорастания семян в чашках Петри по сравнению с контролем (на 5-е сутки) на 24 % - кресс-салата, на 34 % - свеклы, на 31 % - капусты, на 9,3 % - рапса, на 13,3 % - кукурузы, на 34 % - петрушки, на 17 % - огурца (на 3-и сутки). При этом длина проростков на 10-е сутки превышала контроль на 42,1 % - кресс-салата, на 49,5 % - свеклы, на 22,8 % - капусты, на 71 % - рапса, на 19 % - кукурузы, на 34 % - петрушки, на 102,4 % - огурца. При исследовании влияния обработки бактериальной суспензией штамма *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д семян рапса и кукурузы в грунте показано, что предлагаемый штамм повышает энергию прорастания семян по сравнению с контролем на 4-е сутки на 18,2 % у рапса, процент всхожести к 10-м суткам превышал контроль на 9,1 %. У кукурузы энергия прорастания на 5-е сутки была выше контроля на 10 %, всхожесть к 10-м суткам - на 13,3 % больше по сравнению с контролем. Длина проростков у семян кукурузы в открытом грунте на 12-е сутки превышала контроль на 27 %, у рапса - на 22,3 %. Длина корня у кукурузы была больше контроля на 23 %, у рапса - на 45 %.

Таким образом, штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* БИМ В-1342 Д является перспективным для использования в сельском хозяйстве в качестве эффективного средства повышения продуктивности растений и их защиты от фитопатогенных грибов.