

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ (19) **BG**



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) **67257 B1**

(51) Int.Cl.
C 12 N 1/20
A 01 N 63/02
C 12 R 1/07

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 112709
(22) Заявено на 22.03.2018
(24) Начало на действие
на регистрацията от: 01.09.2016

Приоритетни данни

(31) 2015137387 (32) 02.09.2015 (33) RU

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 201806.1 на 15.06.2018

(45) Отпечатано на 26.02.2021

(46) Публикувано в
бюлетин № 202102.2 на 26.02.2021

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Притежатели (и):

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННАЯ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "БИСОЛБИ ПЛЮС",
УЛ. КОСТЮШКО, 2, КОРП. 1, КВ. 293, 196247
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, (RUSSIAN FEDERATION)**

(72) Изобретател(и):

**Владимир Кузьмич Чеботарь
Сергей Викторович Ерофеев**

(74) Представител по индустриална собственост:

**Петя Светозарова Петрова,
1000 София, ул. „Съборна” 14, ет. 3, офис 6
Димитър Атанасов Батаклиев,
1000 София, ул. „Съборна” 14, ет. 3, офис 6**

(86) № на PCT заявка: RU2016000599

(87) № и дата на PCT публикация: WO2017039491
10.10.2016

**(54) БАКТЕРИАЛЕН ЩАМ *BACILLUS
AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP.
PLANTARUM BS89 КАТО СРЕДСТВО ЗА
ПОВИШАВАНЕ НА ПРОДУКТИВНОСТТА
НА РАСТЕНИЯТА И ТЯХНАТА ЗАЩИТА
СРЕЩУ БОЛЕСТИ**

(57) Изобретението се отнася към биотехнологиите и селското стопанство. Бактериалният шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 е средство за повишаване на продуктивността на растенията и тяхната защита срещу болести. Щамът е депозиран във Вedomствената колекция на Федералното държавно бюджетно научно учреждение "Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология" под номер

RCAM 03458. Щамът притежава високо фунгицидно действие срещу фитопатогенни гъби и бактерицидно действие срещу фитопатогенни бактерии, а също така високо ръстостимулиращо действие по отношение на различни селскостопански култури и по-специално пшеница, ечемик, картофи, зеле, захарно цвекло, лен, слънчоглед.

1 претенция

BG 67257 B1

**(54) БАКТЕРИАЛЕН ШАМ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* BS89
КАТО СРЕДСТВО ЗА ПОВИШАВАНЕ НА ПРОДУКТИВНОСТТА НА РАСТЕНИЯТА И ТЯХНАТА
ЗАЩИТА СРЕЩУ БОЛЕСТИ**

Област на техниката

Настоящото изобретение е от областта на биотехнологиите и селското стопанство и е свързано с новия шам ризосферни бактерии от рода *Bacillus*, като средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им от фитопатогенни микроорганизми.

Предшестващо състояние на техниката

Модерното високоефективно селскостопанско производство е немислимо без използването на торове и препарати за растителна защита. Например широко разпространеното прилагане на минерални торове, и по-специално на азотни, през последните 50 години повиши с повече от 5 пъти добива на основните селскостопански култури в развитите страни. Процесът на получаване и използване на минерални азотни торове обаче е изключително енергийно интензивен - разходва от 30 до 50% от общата енергия, потребявана в селскостопанското производство.

Понастоящем има много микробиологични препарати за селското стопанство с различно предназначение: стимулиращи растежа, потискащи развитието на фитопатогенни бактерии и гъби.

Микроорганизмите могат да стимулират растежа им (*Azospirillum*), да се свързват с азотните атоми (*Rhizobium*), да предотвратяват болестите при растенията (*Pseudomonas* или *Bacillus*) или да унищожават вредните насекоми (*Streptomyces*).

Известният „Метод за третиране на семената“, описан в заявка от Великобритания с декларация за приоритет № GB 2170987 от 14.02.1985 г. МКИ 4 А 01 С 1/06, публикуван в ИСУ № 10 за 1987 г., предвижда третиране на семената с препарат, съдържащ микроорганизми, носител, като трици например и лепило от типа на гума гати. Най-добри резултати се получават при третиране на семена от пшеница.

Известен е патентът RU № 2140138 за група изобретения „Метод за предпосевно третиране на зеленчукови семена и метод за получаване на препарат за предпосевно третиране на зеленчуковите семена“ по заявка с декларация за приоритет № 98120341 от 13.11.1998 г. от фирма ЗАО ССПР „СОПТСЕМОВОЦ“, МГЖ А01С1/06, публикувано на 27.10.1999 г.

Описаните методи предвиждат използването на биофунгициден продукт, съдържащ бактериален шам *Bacillus subtilis* Ч-13 (депозирани с рег. № ВНИИСХМ Д-606 в групата на микроорганизмите епифити).

Методът за получаване на биофунгицидния продукт се състои в смесването на културална течност, съдържаща щама *B.s.* Ч-13, предварително култивиран в течна стерилна хранителна среда, с поливинилацетатна емулсия, воден разредител и стерилна креда или доломит в определени пропорции. Изобретенията спомагат за повишаване ефективността на защитата на зеленчуковите култури срещу фитопатогенни гъби чрез предпосевно третиране на семената.

Известен е патентът RU № 2099947 за изобретението „Биопрепарат „Фитоспорин“ за защита на растенията срещу болести“ по заявка с декларация за приоритет № 96121980 от 15.11.1996 г. от Института по микробиология и вирусология към Националната академия на науките на Украйна (UA) и НПО „Башкирское“ (RU), МПК А01N63/00; С12N1/20; С12R1:125, публикувано на 27.12.1997 г.

Биопрепаратът „Фитоспорин“ е създаден на базата на бактериален щам *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128 с клетъчна концентрация $10^9 - 10^{10}$ на 1 ml физиологичен разтвор с обем 92-98 об. % и пълнител с обем 2-8 об. %.

Щамът *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128 се отличава с висока антагонистична активност по отношение на фитопатогенните бактерии и гъби, което позволява използването му за защита на различни видове селскостопански (зърнени и бобови) и декоративни дървесни растения чрез предпосевно третиране на семената.

Известен е патентът RU № 2478290 за изобретението „Биопрепарат за стимулиране на растежа и защита на растенията срещу болести, за увеличаване на добива и почвеното плодородие“ към патент RU № 2478290 (заявка № 2011145665) с декларация за приоритет от 11.11.2011 г. от фирма ООО „Бациз“, МПК А01N63/02, А01С1/06, С12N1/20, С12R1/07, с дата на публикация на заявката 20.05.2012 г., а на патента - 10.04.2013 г. Биопрепаратът съдържа биомаса *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 и хумати в следното съотношение на съставките, в об. %: биомаса от вегетативни клетки и спори на бактерията *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 - $1,24 \div 4,30 \times 10^{10}$ КОЕ/ml културална течност и 94 % съдържание на спори от общото количество КОЕ - 99,0, хумати - 1,0. Биопрепаратът осигурява защита на растенията срещу гъбни и бактериални болести, подобрява фитосанитарното състояние на почвата, като повишава нейното плодородие, спомага за увеличаването на добива.

Недостатък е ограничената област на приложение (само при зърнените култури: пшеница и ечемик), както и необходимостта от завишен титър на клетки и спори на продуциращия щам в състава на препарата с цел ефикасното му прилагане.

Известен е патентът RU № 2528058 за изобретението „Бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* с фунгицидно и бактерицидно действие и базиран на него биологичен препарат за защита на зърнените култури срещу болести, причинени от фитопатогенни гъби“ по заявка с декларация за приоритет № 2013125726 от 04.06.2013 г., подадена от предприятието ФГУП „ГосНИИгенетика“, МПК А01N63/02, А01С1/06, С12N1/20, С12R1/07, с дата на публикацията 10.09.2014 г.

Описаният бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-11475 има фунгицидно и бактерицидно действие. Също така се предлага биологичен препарат за защита на зърнените култури срещу болести, причинени от фитопатогенни гъби. Биологичният препарат се получава чрез смесване на активна съставка, която представлява културална течност на посочения щам при титър $2-3 \times 10^9$ КОЕ/ml и носител под формата на фини гранули диатомична пръст в обемно съотношение 1:3, последвано от сушене.

Изобретенията дават възможност за увеличаване на зърнодобива и намаляване процента на инфектиране с фитопатогенни гъби.

Недостатък е ограничената област на приложение (само при зърнени култури) и липсата на бактерицидна активност при шама.

Известна е заявка за патент от Китай CN102703354 (A) от 03.10.2012 г. за бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B203 с проявен фунгициден ефект срещу антракноза по ягодите и някои други болести, причинени от гъби, МПК А01N63/00, -/02, А01P3/00, С12N1/20, С12R1/07 и заявка за патент от Китай CN 104195072 (A) от 10.12.2014 г. въз основа на национална заявка CN 20141385641 с декларация

за приоритет от 06.08.2014 г. за бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B232 с проявен фунгициден ефект срещу некроза по кората на тополата и някои други гъбни болести, МПК А01N63/00, А01P3/00, С12N1/20, С12R1/07.

Недостатък на описаните шамове е ограничената област на приложение (ягоди, топола) и липсата на бактерицидна активност. Освен това в патентите не се уточняват стойностите на титрите на препаратите, при които се отчита ефективен контрол върху гъбните болести по ягодите и тополата съответно.

Известна е заявка за патент от Румъния R 0127468 (A2) от 29.06.2012 г. въз основа на национална заявка RO 20100001379 с декларация за приоритет от 21.12.2010 г. за изобретението „Щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B100 за растеж на селскостопанските култури“, МПК А01N63/00; С12N1/20. Щамът показва фунгициден (продуциране на липопептидни и поликетидни антибиотици) и бактерициден ефект срещу широк спектър фитопатогенни гъби в почвата и бактериални заболявания по плодните дървета, както и стимулиращ ефект, дължащ се на произвежданите от ендифитите растежни фактори. Може да продуцира редица ензими: протеаза, лактоназа, амилаза, фитаза и целулаза. Способен е да разтваря неорганични съединения на фосфора и селена. Може да се използва за заздравяване на зърнените култури (пшеница и царевича) в райони с недостиг на селен.

В тази публикация не се посочва титъра на *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B100, необходим за приготвянето на препаратите при използването на този бактериален шам, за да се контролират болестите по растенията. Друг недостатък е ограничената област на приложение (зърнени култури и плодни дървета).

Известна е още международна заявка WO 2012130221 (A2) от 24.03.2012 г., основаваща се на националната заявка от Германия DE 20111015803 с декларация за приоритет от 01.04.2011 г. за изобретението „Препарат срещу фитопатогенни микроорганизми“, МПК А01N63/00, С07K14/32, С12N1/20, С12R1/07.

Описание в нея нов шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*_AB101 е много ефективен срещу черното кореново гниене („струпяване“) по картофите, предизвикано от *Rhizoctonia solani*.

Разработен е противогъбичен препарат „Бактериоцин“ за лекуване на гъбни и други микробни и вирусни инфекции, получен на базата на бактериалните спори *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AB101, които имат силен ефект срещу грам-положителните бактерии.

Щамът *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* продуцира 10 различни вещества: фунгицидни (антибиотични вещества от различни групи: дипептиди, липопептиди и сидерофори), бактерицидни (поликетиди и бактериоцини) и антивирусни срещу широк спектър болести по растенията и по-специално срещу черното кореново гниене по картофите, предизвикано от фитопатогенната гъба *Rhizoctonia solani*. Има приложение в селското стопанство за растителна защита и в биотехнологиите.

В публикацията не се посочва титъра на шата, необходим за приготвянето на препаратите при използването на тези бактерии, за да се контролират болестите по растенията.

Друг недостатък е ограничената област на приложение - описва се предимно ефектът срещу черното кореново гниене по картофите, предизвикано от фитопатогенната гъба *Rhizoctonia solani*.

Известен е патент № RU 2495119 за изобретението „Бактериален шам *Bacillus subtilis* 8А като средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им срещу фитопатогенни микроорганизми“ по

заявка № 2012151104 с декларация за приоритет от 29.11.2012 г. от Държавното научно учреждение „Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология“ (ГНУ ВНИИСХМ) към Селскостопанската академия на Русия, който е избран за прототип.

Щамът е депозиран в колекцията на Държавното научно заведение „Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология“ към Селскостопанската академия на Русия на 14.11.2011 г. под номер RCAM 00876, като средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им срещу фитопатогенни микроорганизми.

Въпросният щам се отличава с висока фунгицидна и бактерицидна активност. Отчетена е също така висока стимулираща растежа активност на щама *Bacillus subtilis* 8A и базирания на него биопрепарат, което води до повишаване на добива. Експериментално е доказано, че ефективността на щама се дължи на способността на бактериите да образуват с растенията микробно-растителна система чрез колонизиране на ризосферата и кореновата система на растенията.

Поради факта, бактериалните щамове от таксономичната група *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* са депозираны в колекции, намиращи на далечно териториално разстояние от заявителя (дори в други държави), както и че в някои публикации не се посочва титъра на бактериалния щам, необходим за приготвянето на биопрепарата, за прототип е избран достъпният на заявителя бактериален щам *Bacillus subtilis* 8A, депозиран в колекцията на Държавното научно заведение „Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология“.

Техническа същност на изобретението

Целта на изобретението да се изолира щам на ризосферни бактерии, подходящ за използване в селското стопанство, като продукт за защита на растенията от фитопатогенни микроорганизми, за подобряване на храненето на селскостопанските култури и повишаване на продуктивността на растенията, а също така позволяващ да се разшири арсеналът от подобни средства.

Целта се постига благодарение на факта, че като средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им срещу фитопатогенни микроорганизми в селското стопанство се използва щам на ризосферните бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, който позволява да се разшири арсеналът от подобни средства.

Щамът на ризосферните бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 е изолиран от корен на зимна пшеница от сорта „Лира“, отглеждан на черноземни почви в Краснодарския край на Руската федерация.

Щамът е депозиран във Вedomствената колекция от полезни микроорганизми за селскостопански цели (RCAM) на Федералното държавно бюджетно научно учреждение „Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология“ на 09.07.2015 г. под номер RCAM 03458, като средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им срещу фитопатогенни микроорганизми (прилага се копие от сертификата за депозиране).

Щамът се характеризира със следните морфологично, културални и физиологично-биохимични свойства.

Клетките имат правилна пръчковидна форма със заоблени краища и монополярно перитрихиално разположени ресни. Размерът им е (0,9-1,8) мкм. Щамът образува спори, разположени в средата на клетката, дава положително оцветяване по Грам. След 24-часов период на растеж на течна хранителна среда се наблюдава натрупване на поли-β-оксибутират. Растежът на течна и полутечна хранителна среда е микроаерофилен, метаболизмът - дихателен и ферментационен. Върху месопептонен агар образува сухи колонии с кремав цвят и пастообразна консистенция с грапави назъбени краища.

Колониите са с диаметър (5-12) mm. Оптималната температура за растеж е 33°C. При температура над 45°C и под 15°C растежът е бавен. Оптималната стойност на рН на средата е 6,8, растеж се наблюдава и при рН от 4,5 до 9,0. Щамът хидролизира казеин, желатин, нишесте и лакмусово мляко, като лакмусът се обезцветява. Щамът се отличава с висока каталазна активност, с амилазна, протеазна, липазна и фосфолипазна активност. Наблюдава се растеж при 50°C, 10% NaCl и 0,001% лизоцим.

Като единствен източник на въглерод, щамът използва арабиноза, ксилоза, маннит, глюкоза, галактоза, фруктоза, малтоза, сорбит, глицерин, декстрин, нишесте с образуване на киселина и рамноза и дулцит с образуване на основи. Използва предимно минералните форми на азот - амониеви соли и нитрати, както и аминокиселини и протеини.

По емпиричен път е установено, че бактериалният щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 повишава добива от растенията и проявява антагонистични свойства срещу причинителите на болести по селскостопанските култури и по-специално по:

- зимна и пролетна пшеница - срещу брашнеста мана (*Erysiphe graminis*), кафява ръжда (*Puccinia recondita*), базично гниене (*Fusarium culmorum*), базална бактериоза (*Pseudomonas syringae*);
- пролетен ечемик - срещу плесени по семената (*Penicillium*, *Alternaria*), кореново гниене (*Bipolaris sorokiniana*), тъмно кафяви петна (*Drechlera sorokiana*);
- главесто зеле и карфиол - срещу съдова бактериоза (*Xanthomonas campestris*), струпяване (*Rhizoctonia solani*), кореново гниене (*Pythium irregulare*);
- картофи - срещу мана (*Phytophthora infestans*), струпяване (*Rhizoctonia solani*), фузариено увяхване (*Fusarium oxysporum*);
- захарно цвекло - срещу сечене (*Pythium debarianum*, *Phoma betae*), церкоспороза (кръгли истни петна) (*Cercospora beticola*);
- слънчоглед - срещу склеротийно (бяло) гниене (*Sclerotinia sclerotiorum*), фомопсис (сиви петна) (*Phomopsis helianthi*);
- лен - срещу фузариоза (*Fusarium avenaceum* Sacc, *Fusarium oxysporum* v. *orthoceros* f. *lini* (Boll) Bilai), бактериоза (*Clostridium macerans* Schard).

Също така по емпиричен път е установено, че бактериалният щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, се характеризира с фунгицидна активност срещу фитопатогенните гъби *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium irregulare*, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea* и с бактерицидна активност срещу фитопатогенните бактерии *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganense*.

В таблици 1 и 2 са представени резултатите от скрининга за антагонистична активност срещу фитопатогенни микроорганизми на 3 щама ризосферни бактерии: *Pseudomonas fluorescens* AP-33 (микробен препарат „Планриз“), *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128 (микробен препарат „Фитоспорин“), *Bacillus subtilis* 8А (прототип), *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 (заявеният шам).

Изследвана е бактерицидната активност на 5 щама фитопатогенни бактерии: *Pseudomonas syringae* 8300, *Pseudomonas syringae* 2314, *Erwinia carotovora* А-1, *Erwinia carotovora* 3391, *Clavibacter michiganense* 17-1.

Първоначално с помощта на бактериологично йозе е извършена посявка на бактерии, като се разстила равномерно върху хранителен агар и се култивира за 48 h при температура 28°C. В деня на скрининга на бактерицидната активност е извършена посявка с шамовете на посочените фитопатогенни бактерии, като се разстила равномерно върху гладен картофен агар. След което върху новопосятата среда са пренесени агарови блокчета от чиста култура на тест-бактериите, изрязани със стерилен корков свредел. Пренасянето е извършено с помощта на стерилен скалпел и нагорешена пинсета. Петриевите блюда с блокчетата се култивират в продължение на 24 h при температура 28°C, след което е измерен диаметърът на формираните зони на инхибиране около блокчетата. Резултатите от скрининга са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Антагонистична активност на ризосферни бактериални шамове срещу фитопатогенни бактерии

Бактериален шам	Зона на инхибиране на растежа, мм				
	<i>Erwinia carotovora</i> А-1	<i>Pseudomonas syringae</i> 8300	<i>Pseudomonas syringae</i> 2314	<i>Erwinia carotovora</i> 3391	<i>Clavibacter michiganense</i> 17-1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AP-33 („Планриз“)	11,0±0,8	7,5±0,3	11,3±1,0	12,5±1,1	15,6±1,1
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорин“)	9,8±0,7	11,0±0,8	12,5±1,0	17,5±1,2	17,7±1,3
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	17,5±1,3	25,5±1,9	27,7±2,0	24,1±1,7	22,1±1,7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	20,5±1,7	35,1±2,5	49,7±3,7	55,3±3,9	42,3±2,9

Данните в Таблица 1 сочат, че заявеният бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, притежава по-висока антагонистична активност срещу фитопатогенни бактерии в сравнение с щама прототип *Bacillus subtilis* 8А.

Фунгицидната активност се определя срещу 5 фитопатогенни гъби: *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Pythium ultimum* по метода на ямките в агар.

В нагрят и охладен до температура 37°C картофено-декстрозен агар е добавена спорова суспензия от гъби (10⁵ КОЕ/ml) в съотношение 1 mkl суспензии към 1 ml среда. Получената смес се излива в петриеве блюда, като след втвърдяване с нагорешен корков свредел се оформят 4 еднакви проходни отвора,

разположени в квадрат. В отворите се налива по 100 ml бактериална суспензия с клетъчен титър 10^8 КОЕ/ml. Едното блюдо е оставено с празни ямки като контрола. Блюдата с ямките се култивират за 72 h при температура 28°C. Фунгицидната активност се определя по зоните, инхибиращи растеж на фитопатогенни гъби около ямките. Резултатите от скрининга са представени в Таблица 2.

Таблица 2. Антагонистична активност на ризосферни бактериални щамове срещу фитопатогенни бактерии

Бактериален щам	Зона на инхибиране на растежа, мм				
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AP-33 („Плауриг“)	3,5±0,2	11,1±0,7	7,5±0,5	12,8±0,9	12,5±1,1
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорив“)	11,1±0,8	13,5±1,0	19,5±1,6	21,4±1,5	25,3±2,0
<i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	21,3±1,9	19,5±1,1	23,5±1,5	25,3±2,0	27,7±2,1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	28,7±1,9	35,8±2,9	37,3±2,9	30,7±1,8	45,3±3,1

От данните, посочени в Таблица 2, се вижда, че заявеният бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 притежава по-голяма антагонистична активност срещу фитопатогенни гъби в сравнение с щама прототип *Bacillus subtilis* 8A.

Пълното секвениране на генома сочи, че тази активност на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, се дължи на наличието на гени, които кодират продуцирането фунгицидни и бактерицидни вещества: сърфактин, фенгицин, бациломицин Д, циклични липопептиди, бацилобактин, бацилолизин, бацилаен, макролактин, плантазолин, амилоциклизин (Таблица 3).

Нерибозомните синтезирани пептиди (НСП), включват широк спектър от структурно нееднородни антибиотични съединения. Най-известните и добре изучени НСП включват сърфактин, фенгицин и итурин. Итуринът и фенгицинът са известни като основни фактори, определящи антифунгалната активност на различните бацили. [1]. Фенгицините са особено активни срещу мицелиалните гъби [2].

Сърфактините са необходими за образуването на биофилм и разпространението на бактерии в околната среда, като по този начин улесняват тяхното колонизиране в корените и тъканите на растенията и проява на биоконтролираща активност [3]. Също така сърфактините, а в по-малка степен и фенгицините, имат свойството да задействат защитните механизми на растенията [1].

Таблица 3. Клъстери на гените, участващи в синтеза на антибиотични метаболити на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89

Клас съединения	Продуциран метаболит	Клъстер гени	биологична функция
Нерибозомни синтезирани пептиди	Сърфактин	<i>srfABCD</i>	Образуване на биофилм, антифунгална активност
	Фенгизин	<i>fenABCDE</i>	Антифунгална активност
	Бациломицин	<i>bmyCBAD</i>	Антифунгална активност
	Цикличен липопептид	<i>msABCDEF</i>	Не е известна
	Бацилибактин	<i>dhbABCDEF</i>	Синтез на сидерофори
	Бацилизин	<i>bacABCDE</i>	Антибактериална активност
Поликетиди	Дифицидин	<i>dfrA UVBCDEFG</i>	Антибактериална активност
	Бацилен	<i>bacBCDEGHIJL</i>	Антибактериална активност
	Макролактин	<i>mlnABCDEFGHIKl</i>	Антибактериална активност
Рибозомно продуцирани кратки пептиди	Плантазолицин	<i>pznFKGHIAJCD</i>	Нематоцидна и антибактериална активност
	Амилоциклизин	<i>asnBACDEF</i>	Антибактериална активност срещу грам-положителни бактерии

Освен липопептидите, генният клъстер *dhb* участва в синтеза на сидерофора бацилибактин. Бактериалните сидерофори имат висок афинитет към тривалентното желязо и ефективно го свързват в желязодефицитна среда като почвите, в резултат на което желязните йони стават по-трудно достъпни за фитопатогените и по този начин допринасят биоконтролиращата дейност на сидерофор-продуцираните бактерии [4]. Оперонът *dhb*, който управлява синтеза на бацилибактин, е сходен със същия оперон в грам-отрицателни бактерии, продуциращи ентеробактин.

Щамът *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 има три големи генни клъстера, кодиращи поликетидите: дифицидин, бацилаен и макролактин (Таблица 3). Изброените три метаболита имат широка антибактериална активност срещу растителни и човешки патогени и имат потенциално приложение в медицината [5,6].

Геномът на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, съдържа генен клъстер за производството на два рибозомно продуцирани кратки пептиди: плантазолицин и амилоциклизин (Таблица 3). Плантазолицинът представлява нов тип рибозомно продуцирани кратки пептиди с малък спектър на антимикробна активност срещу други бацили и по-специално *B. anthracis* (причинител на антракс) [7]. Този метаболит има способността да потиска нематоди, образуващи гали (новообразувания) по корените на растенията. Няколко други грам-положителни бактерии, включително *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Corynebacterium urealyticum* DSM7109 and *Brevibacterium linens* BL2 имат подобен биосинтетичен клъстер в своите геноми [8]. Амилоциклизинът представлява цикличен пептид от групата на бактериоцините. Той притежава висока антибактериална активност срещу тясно свързаните грам-положителни бактерии – това предимство може да се използва за потискане на бактериалните конкуренти в ризосферата [7]. Генният клъстер *asn*, който контролира синтеза на този бактериоцин е широко разпространен сред видовете от рода *Bacillus*/*Paenibacillus* таксономични групи. В няколко вида *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* [9] е

открит още един кратък пептид - мерасцидин, но шамът BS89 съдържа само фрагментарни части от целия генен клъстер и вероятно няма да може да синтезира мерасцидин.

Експериментално е установено, че бактериалният шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 освен фунгицидна активност срещу фитопатогенни бактерии и фитопатогенни гъби, притежава и фитостимулиращо действие по отношение на различни селскостопански култури (като репичка, пшеница).

Скринингът на стимулиращата растежа активност на бактериалните щамове е извършен по оригинална методика с използването на репички от сорта „Дуро“ и пшеница от сорта „Веда“. За целта първоначално семената се стерилизират 2 min в 70% етанол и измиват със стерилна чешмяна вода. След това семената се накисват за 30 min в бактериална суспензия с клетъчен титър 10^7 КОЕ/ml и поставят в стерилни влажни камери от по 20 бр. в три повтаряния. Контролните семена се накисват в стерилна чешмяна вода. След това растенията се инкубират във фитотрон за 72 h при $t = 28^{\circ}\text{C}$. След инкубирането се измерва дължината на коренчетата и поничите, а стимулиращата растежа активност на тестваните бактериални щамове е определена спрямо контролните кълнове. Резултатите са представени в таблици 4 и 5.

Таблица 4. Стимулираща растежа активност на ризосферни бактериални щамове в кълнове на репичка

Вариант на опита	Средна дължина на корена, мм	Средна дължина на зелената част на кълна, мм
Контрола (без третиране)	12,1±0,7	19,5±1,3
Третиран <i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	15,3±1,0	25,0±2,1
Третиран <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	23,5±1,5	29,7±2,3

Според данните, представени в Таблица 4 се вижда, че заявеният шам бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 притежава по-висока стимулираща растежа активност на кълновете от репичка в сравнение с щама прототип *Bacillus subtilis* 8A.

Таблица 5. Стимулираща ръста активност на ризосферни бактериални щамове в кълнове на пшеница

Вариант на опита	Средна дължина на корена, мм	Средна дължина на зелената част на кълна, мм
Контрола (без третиране)	9,3±0,5	13,7±1,0
Третиран <i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	13,5±1,1	16,9±1,3
Третиран <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	19,9±1,2	22,1±1,7

Данните, представени в Таблица 5 сочат, че заявеният бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 притежава по-висока стимулираща растежа активност на пшеничените кълнове в сравнение с щама прототип *Bacillus subtilis* 8A.

Високата стимулираща растежа активност на бактериалния шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 вероятно се дължи на способността му да продуцира цяла редица витамини: тиамин (B1), рибофлавин (B2), никотинат (B3), пантотенат (B5), биотин (B7), фолат (B9), кобаламин (B12), менакинон (K2)

(Таблица 6). Витамините са незаменими хранителни елементи, произведени е помощта на различни растения и бактерии [10]. Основната физиологична функция на витамините е да служат като кофактор в многобройните метаболитни процеси и като антиоксиданти. Шест от осемте известни витамини от група В са открити в генома *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 според базата данни на KEGG (от сървърта KAAS) и интелектуалния анализ на генома (Таблица 6). Това са тиамин (В1), рибофлавин (В2), пантотенат (В5), витамин В6 (пиридоксин), биотин (В7) и фолат (В9). Също така е открит протеин, който синтезира кобаламин CobW (Prokka_00310), участващ в синтеза на витамин В12 и два ензима, участващи в метаболизма на никотината (витамин В3), а именно никотинат фосфорибозилтрансфераза (Prokka_02867) и никотинат нуклеотид-пирофосфорилаза (Prokka_02473). Освен това в генома на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 е открит диметил-метакинон-метилтрансфераза (Prokka_02063), ензим, който катализира последната стъпка в биосинтеза на витамин К2. Тези резултати позволяват да се предположи, че *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 може да продуцира и витамини В3, В12 и К2.

Таблица 6. Витамини в генома на шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 и тяхната

Вид на витамин	Функции в бактерията*	Възможна функция в микробно-растителните отношения**
Тиамин (В1)	Декарбоксилиране на кетокиселини и трансаминни реакции	Кофактор на декарбоксилирането на индол-3-пирувата (биосинтеза на индолил оцетна киселина), индуциране на системната резистентност на растенията, стимулиращ ефект върху грудкови бактерии
Рибофлавин (В2)	Окислително-възстановителни реакции	Индукция на системната резистентност на растенията, стимулиране растежа на растенията, активиране на гените на комуникацията между бактериите, наречено „quorum-sensing“ (кворумно/колективно/усещане)
Никотинат (В3)	Никотинамид-аденин динуклеотид (NAD)	Намаляване на солевия стрес, защитните механизми
Пантотенат (В5)	Окисляване на кетокиселини и носители на анидови групи	Не е известна
Пиридоксин (В6)	Трансаминиране, дезаминиране, декарбоксилиране и рацемизиране на аминокиселини	Защита срещу осмотичен и оксидативен стрес
Биотин (В7)	Биосинтетични реакции, вискозни фиксиране на CO ₂	Стимулиране растежа на бактерии и колонизация
Фолат (В9)	Пренасяне на едновъглеродни единици, необходими за синтеза на пурини, пуринови бази, серин, метионин и пантотенат	Не е известна
Кобаламин (В12)	Пренасяне на метилови групи	Образуване на бобово-ризобиялна симбиоза
Менакинон (К2)	Транспортниране на електрони	Не е известна

Биологична функция.

*Онлайн учебник по бактериология (http://textbookofbacteriology.net/nutgro_2.html)

**Преглед на Palacios et al. (2014)

Примери за изпълнение на изобретението

По-долу е представен пример за получаване на течен биопрепарат на базата на бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89.

Първоначална култура

За получаването на жизнеспособна култура от бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, е използвана течна хранителна среда КЗБ (картофено-захарозен бульон), като за целта се приготвя отвара от 200 g обелени и нарязани на шайби картофи, сварени в 800 ml дестилирана вода за 20 min. След това бульонът се филтрира през памучна марля, добавя се захароза и рН-ниво то на сместа се коригира до 7.0.

Получената течна хранителна среда се разпределя по 100 ml в обемни колби „Ерленмайер“ 750 ml и се стерилизира 30 min при 1 atm. След това хранителната среда в колбите се инокулира в съотношение: 1 епруветка с полегат хранителен агар (ХА), съдържащ чиста култура *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 на 1 колба. След това колбите се поставят в клатачка (180 об./min) и се култивират 48 h при температура $2 > 8^{\circ}\text{C}$. По този начин в колбите се получава първоначалната култура *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 в титър бактерии около $4 \cdot 10^9$ КОЕ/ml, която може да се съхранява в хладилник до 1 месец при температура $4-6^{\circ}\text{C}$ за последващо посяване в биореактори.

Работна култура

Работната култура от бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 за производствено култивиране се получава в биореактори на среда с меласа и царевичен екстракт. Стандартната инокулация с първоначална култура е 1-3%, продължителността на култивиране е 72 h при температура 33°C . При отглеждането на работни култури се допуска повишаване на температурата до 37°C . Така се приготвя концентрат от бактериална суспензия на базата на щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 с минимален титър $1 \cdot 10^9$ КОЕ/ml.

Течен микробен препарат на базата на щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89

Полученият концентрат на бактериалната суспензия на базата на щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 се разрежда със стерилна вода в съотношение 1:10 или 1:20 в зависимост от титъра на получения концентрат на бактериалната суспензия. Получената течна форма престоява 3-5 дни при температура $20-25^{\circ}\text{C}$ до получаването на минимален титър на бактериите $1 \cdot 10^8$ КОЕ/ml препарат, след което микробният препарат е готов за използване в селското стопанство. Течният препарат се налива при стерилни условия в пластмасови бутилки или туби, предварително обработени със спирт. Сроктът на съхранение на получения препарат е най-малко 24 месеца.

Експериментално е установено, че за ефективното използване на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, съдържащ се в различни микробни препарати, концентрацията (количеството жизнеспособни клетки и спори) на бактериите трябва да бъде 10^4-10^9 клетки на 1 ml културална течност, тъй като използването на концентрации по-малки от 10^4 kl/ml ще намали антагонистичното действие и ефекта, стимулиращ растежа, а увеличаването на концентрацията над 10^9 kl/ml не усилва действието и ефекта.

Ефективността на микробния препарат, получен по описания по-горе начин на базата на заявения ризосферен бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, е проверена с вегетационни опити със зимна пшеница от сорта „Веда“ и репички от сорта „Дуро Краснодарско“.

Опитите се провеждат като в 3-литрови съдове (за пшеницата и репичките) се насипва почва до достигане на тегло 3,4 kg. Преди засаждането на семената почвата се полива до пределна полска влагоемност с 200 ml чешмяна вода. Семената на репичките и пшеницата са предварително подбрани по размер, стерилизирани и покълнали в стерилни петриеви блюда със стерилна филтърна хартия. Еднаквите по размер кълнове са разделени на три части. Едната част в продължение на 30 min е инокулирана в течния препарат, базиран на шата прототип *Bacillus subtilis* 8A с титър 10^7 КОЕ/ml, другата част е инокулирана в препарата, получен по описания по-горе начин на базата на заявения шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 с титър 10^7 КОЕ/ml, а третата част от кълновете е третирана със стерилна вода (контрол). След 25 дни са извършени измервания на биомасата с репички, а след 30 дни - на биомасата с пшеница. Резултатите от опитите са представени в Таблици 7 и 8.

Таблица 7. Ефективност на ризосферните бактериални шамове при вегетационните опити с пшеница от сорта „Веда“

Вариант на опита: третиране с биопрепарат на базата на бактериален шам	Биомаса, г	Увеличение на контролната биомаса	
		г	%
Контрол (без третиране)	85		
<i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	101	16	18,8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	122	37	43,5

Таблица 8. Ефективност на ризосферен бактериален шам при вегетационните опити с репички от сорта „Дуро Краснодарско“

Вариант на опита: третиране с биопрепарат на базата на бактериален шам	Биомаса		Плодна маса	
	г	% увеличение при контролата	мм	% увеличение при контролата
Контрол (без третиране)	42,5		18,0	
<i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	50,2	18,1	29,1	61,7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	65,3	53,6	38,5	113,9

При сравняване на резултатите от опитите с пшеница от сорта „Веда“ и репички от сорта „Дуро Краснодарско“, представени в таблици 7 и 8, може да се направи следния извод: микробният препарат, получен на базата на заявения бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, има много по-ефикасно действие върху пшеницата и репичките в сравнение с микробния препарат, базиран на шата прототип *Bacillus subtilis* 8A.

По емпиричен път е установено, че за оптимално третиране на семената на селскостопанските растения следва да се използва 10% разтвор на микробния препарат, базиран на заявения ризосферен бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, а за вегетиращи растения - (0,1-3)% разтвор на препарата.

Ефективното прилагане на щама *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 за повишаване на продуктивността и качеството на продукцията се определя чрез полски опити на зърнени, зеленчукови и технически култури (пролетна, зимна пшеница, ечемик, картофи, зеле, лен, слънчоглед, захарно цвекло) чрез третиране с три микробни препарата: „Фитоспорин“ на базата на бактериалния щам *Bacillus subtilis* ВНИИСХМ 128), микробен препарат на базата на щама прототип *Bacillus subtilis* 8А и микробен препарат на базата на заявения бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин.

Полските опити с пролетна пшеница от районирания сорт „Лада“ се провеждат в Краснодарския край на мощни черноземни, средно глинести, средно хумусни пови, с хумус (по Тюрин) - 3,24%, нитратен азот - 8,3 mg/kg, фосфор - 64 mg/kg, калий - 150 mg/kg, рН на водната среда - 6,46.

Полските опити са заложи по блоковия метод за провеждане на опити върху пробни площи в географска мрежа на Руския институт по торове, почвознание и аграрно дело (Оценка на ефективността на микробните препарати в земеделието /Под ред. на А. А. Завалин - М: Селскостопанска академия на Русия, 2000 г. - 82 стр.). Пробната посевна площ е 40 m², а големината на реколтната парцела е 30 m². Опитът се провежда в четири повторения. Засяването на пшеницата се извършва в земя с предшественик чиста угар при торов фон N₆P₅₂ (моноамониев фосфат). Обработка преди засяване - култивация до дълбочина 5-7 cm, сеитбена норма на пролетната пшеница - 5,0 млн. кълняеми семена на хектар. В деня на засяването една част от семената на пшеницата не се третират с нищо (контрола), другата част е третирана с течен биопрепарат „Фитоспорин“ на базата на щама *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ (стандарт), третата част от семената е обработена с течен биопрепарат на базата на щама *Bacillus subtilis* 8А (прототип), а последната част от семената - с течен препарат на базата на бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин. Третирането на семената пшеница се извършва на базата на 1 t семена - 1 l от съответния биопрепарат се разрежда с 9 l вода с добавяне на 20-30 g Na-СМС - натриева карбоксиметил целулоза.

Преди сеитбата почвата се култивира и ръчно се добавя минерален тор - моноамониев фосфат (N₆P₅₂), съгласно опитната схема, след това семената се засяват, като се обособяват отделни посевни площи според третирането със съответния биопрепарат и контролна зона.

Некореновата обработка на растенията се извършва на етап 3-5 листа и в края на братене, начало на вретене чрез пръскане с ръчна пръскачка при съотношение на разтвора - 1 l от съответния биопрепарат на 300 l вода на 1 хектар.

Агротехниката за отглеждане на пшеница съответства на блоковата технология. Продуктивността се определя по добив зърно от реколтата на парцела. Прибирането на реколтата се извършва с комбайн САМПО-130. Добивът е приравнен към 100% чист посев и 14% влага. Количеството глутен се определя по стандарт ГОСТ 13586.1/68, а протеини - по ГОСТ 10846/91. Статистическата оценка на надеждността на получените резултати е извършена въз основа на дисперсионен анализ при 95% ниво на значимост. Резултатите от опита с пролетна пшеница са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Влияние на ризосферния бактериален щам върху добива и качеството на зърното от пролетния сорт пшеница „Лада“ (Краснодарски край).

Вариант	Добив на зърно, центнер/ха	Увеличение на добива		Качество на зърното		
		центнер/ха	%	Глутен, %	компресибилитет, усл. ед.	Клас зърно
Контрола	39,0	-	-	22,5	85	3
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорин“, стандарт)	42,5	4,3	11,0	23,5	80	3
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	45,1	6,1	15,6	24,0	80	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	49,7	10,7	27,4	26,0	75	2

Полските опити със зимен сорт пшеница „Мироновска 808“ са проведени в Уляновска област на черноземни, излужени, средно мощни, глинести, средно хумусни почви, с хумус (по Тюрин) - 2,89%, нитратен азот - 9,5 mg/kg, фосфор - 79 mg/kg, калий - 140 mg/kg, рН на водната среда - 6,62.

Пробната посевна площ е 30 м², а големината на реколтната парцела е 25 м². Опитът се провежда в четири повторения. Засяването на пшеницата се извършва в земя с предшественик чиста угар при торов фон N₆P₅₂ (моноамониев фосфат). Обработка преди засяване - култивация до дълбочина 5-7 cm, сеитбена норма на зимната пшеница 4,8 млн. кълняеми семена на хектар.

В деня на засяването една част от семената на пшеницата не се третират с нищо (контрола), другата част е третирана с течен биопрепарат „Фитоспорин“ на базата на щам *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ (стандарт), третата част от семената е обработена с течен биопрепарат на базата на щам *Bacillus subtilis* 8А (прототип), а последната част от семената - с течен препарат на базата на бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин.

Третирането на семената пшеница се извършва на базата на 1 t семена - 1 l от съответния биопрепарат се разрежда с 9 l вода с добавяне на 20-30 g Na-СМС - натриево карбоксиметил целулоза.

При всички опитни варианти по време на сеитбата под предпосевното култивиране ръчно се добавя минерален тор - моноамониев фосфат (N₆P₅₂) съгласно опитната схема, след което семената се засяват, като се обособяват отделни посевни площи според третирането със съответния биопрепарат и контролна зона.

Некореновата обработка на растенията се извършва на етап братене и в началото на вретене чрез пръскане с ръчна пръскачка при съотношение на разтвора - 1 l от съответния биопрепарат на 200 l вода на 1 хектар.

Агротехниката за отглеждане на зимната пшеница съответства на блоковата технология. Прибирането на реколтата се извършва с комбайн САМПО-130. Добивът е приравнен към 100% чист посев и 14% влага. Количеството глутен се определя по стандарт ГОСТ 13586.1/68.

Статистическата оценка на надеждността на получените резултати е извършена въз основа на дисперсионен анализ при 95% ниво на значимост. Резултатите от опита със зимна пшеница са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Влияние на ризосферния бактериален шам върху добива и качеството на зърното от зимния сорт пшеница „Мироновска 808“ (Уляновска област).

Вариант	Добив на зърно от зимна пшеница, центнер/ха	Увеличение на добива		Глуцен, %
		центнер/ха	%	
Контрола	35,7	-	-	20,0
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорин“ - стандарт)	39,1	3,4	9,5	22,0
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	41,5	5,8	16,2	22,5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	44,7	9,0	25,2	25,0

Полските опити с пролетния сорт ечемик „Прерия“ се провеждат в Краснодарския край на черноземни, мощни, средно глинести, средно хумусни почви, с хумус (по Тюрин) - 3,24%, нитратен азот - 8,3 mg/kg, фосфор - 64 mg/kg, калий - 150 mg/kg, рН на водната среда - 6,46.

Пробната посевна площ е 40 м², а големината на реколтната парцела е 30 м². Опитът се провежда в четири повторения. Засяването на ечемика се извършва на земя с предшественик чиста угар при торов фон N₆P₅₂ (моноамониев фосфат). Обработка преди засяване - култивация до дълбочина 5-7 cm, сеитбена норма - 4,0 млн. кълняеми семена на 1 хектар. В деня на засяването една част от семената на ечемика не се третира с нищо (контрола), другата част е третирана с течен биопрепарат „Фитоспорин“ на базата на шамата *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ (стандарт), третата част от семената е обработена с течен биопрепарат на базата на шамата *Bacillus subtilis* 8А (прототип), а последната част от семената - с течен препарат на базата на бактериалния шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин. Третирането на семената на ечемика се извършва на базата на 1 t семена - 1 l от съответния биопрепарат се разрежда с 9 l вода с добавяне на 20-30 g Na-СМС - натриева карбоксиметил целулоза.

Преди сеитбата почвата се култивира, като за целта ръчно се добавя минерален тор - моноамониев фосфат (N₆P₅₂) съгласно опитната схема, след което се засяват семената на ечемика, като се обособяват отделни посевни площи според третирането със съответния биопрепарат и контролна зона.

Некореновата обработка на растенията се извършва на етап 3-5 листа и в края на братене, начало на вретене чрез пръскане с ръчна пръскачка при съотношение на разтвора - 1 l от съответния биопрепарат на 300 l вода на 1 хектар.

Агротехниката за отглеждане на пролетния ечемик съответства на блоковата технология. Добивността се определя по добив зърно от реколта на парцела. Прибирането на реколтата се извършва с комбайн САМПО-130. Добивът е приравнен към 100% чист посев и 14% влага. Количеството протеин се определя по стандарт ГОСТ 10846/91. Статистическата оценка на надеждността на получените резултати е извършена въз основа на дисперсионен анализ при 95% ниво на значимост. Резултатите от опита с пролетен ечемик са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Влияние на ризосферния бактериален шам върху добива и качеството на зърното от пролетния сорт ечемик „Прерия“ (Краснодарски край).

Шам	Добив на зърно от ечемик, центнер/ха	Увеличение на добива		Количество протеин в зърното
		центнер/ха	%	%
Контрола	41,0	-	-	9,0
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорин“, стандарт)	44,2	3,2	7,8	9,8
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	45,0	4,0	9,9	10,2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	48,3	7,3	17,8	12,5

Данните, представени в таблици 9, 10 и 11 сочат, че микробният препарат, получен на базата на заявения бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, има по-силно въздействие върху добива и качеството на зърнените селскостопански култури в сравнение с биопрепарата, базиран на шата прототип *Bacillus subtilis* 8А.

Полски опити с картофи от сорта „Невски“ са проведени в Ленинградска област на слабо подзолисти глинести почви с хумус (по Тюрин) - 2,30%, нитратен азот - 22,1 mg/kg, фосфор - 315 mg/kg, калий - 52 mg/kg, рН в водата - 5,6.

Посадъчен материал: картофени клубени, подбрани от една партида затоплени и щателно почистени семена. Тегло на клубените за засаждане: 60-70 g, със „събудени очи“. Предшественик - едногодишна трева за зелен фураж. Торов фон - не е извършвано органично торене под картофите, минерални торове са добавяни при оформянето на браздите в съотношение N₁₀₀Pn₁₁₀K₁₃₀.

Пробната посевна площ е 50 м², а големината на реколтната парцела е 25 м². Опитът се провежда в четири повторения. Схема на садене - 75 x 30 cm, което означава гъстота на засаждане - 44 000 бр. клубени на 1 хектар. Към момента на прибиране не е определена средна гъстотата на растенията - 43 500 бр. на хектар.

В деня на засаждането една част от картофените клубени не се третира с нищо (контрола), другата част е третирана с течен биопрепарат „Фитоспорин“ на базата на шата *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ (стандарт), третата част е обработена с течен биопрепарат на базата на шата *Bacillus subtilis* 8А (прототип), а последната част - с течен препарат на базата на бактериалния шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин. Преди саденето картофените клубени са третирани с разтвор в съотношение 1 l от съответния биопрепарат на 9 l вода на 1 t клубени.

Саденето на картофите се извършва с редосеялка на междуредие 75 cm и с гъстота на посева 400 бр. на 100 м², като се обособяват посевни площи според третирането със съответния биопрепарат и контролна зона.

Грижа за растенията: обработка на междуредията - два пъти преди поникване и един път след поникване; пръскане на растенията с хербицид „Титус“ (0,03 kg/ha) + „Тренд“ (0,2 kg/ha) и инсектицид „Актара“ на гранули, диспергиращи се във вода (0,06 kg/ha), с помощта на шангова пръскачка ОН-600 с разходна норма

на работната течност 300 l/ha. Пръскането на растенията във всяка обособена площ се извършва с ръчна пръскачка е разтвор на съответния биопрепарат в съотношение - 1 l от биопрепарата на 300 l вода на 1 хектар, като първото пръскане е на етап пълно поникване, а второто - на етап бутонизация. Косене на върховете преди прибиране на реколтата: с косачка БД-4-7. Прибиране на реколтата: с картофовадачка КТН-2Б с ръчно събиране на клубените. Резултатите от опита с картофи са представени в Таблица 12.

Таблица 12. Ефективност на ризосферните бактериални шамове при полските опити с картофи от сорта „Невски“ (Ленинградска област).

Вариант	Добив на картофи, центнер/ха	Увеличение на добива	
		центнер/ха	%
Контрола	191	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 („Фитоспорин“ - стандарт)	217	26	13,6
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	225	34	17,8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	251	60	31,4

Полските опити на малки площи с главесто зеле от сорта „Подарък“ са проведени в Ленинградска област на подзолисти глинести почви, с хумус (по Тюрин) - 3,50%, нитратен азот - 30,5 mg/kg, фосфор - 280 mg/kg, калий - 40 mg/kg, рН на водната среда 6,0.

За получаването на разсад семената на главестото зеле от сорта „Подарък“ се засяват в сандъчета с торфено-минерален субстрат, който се приготвя по следния начин: ливадно-подзолистата песъчливо-глинеца почва от опитното поле на ГНУ ВНИИСХМ (30%) се смесва с торфена почва „Теравит“, производство на фирма ЗАО МНПП „Фарт“ (50%), и промит кварцов пясък (20%) с добавен разтвор на препарата „Азофоска“, представляващ 100% NPK. Полученият субстрат се разбърква и разпределя в 4 сандъчета от по 10 kg всеки.

Зелето се третира с 0,1% разтвор на следните биопрепарати: на базата на щама *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ („Фитоспорин“ - стандарт); на базата на щама прототип *Bacillus subtilis* 8А; на базата на заявения бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин. В три от сандъчетата се излива по 1 l от 0,1% разтвор на всеки един от изброените по-горе биопрепарати, а в четвъртия - само вода (контрола).

Сандъчетата със зеле се поставят в парник при температура 15-20°C. Пикирането на растенията се извършва на етап 2-3 същински листа в торфени саксии с обем 0,5 l, поставени в пръст.

Едновременно с пресаждането на растенията от далено сандъче в торфени саксии в гнездата се налива 0,1% разтвор от препарата, вложен по-рано в съответния субстрат (а в контролата - вода), в съотношение 1 ml разтвор на 1 растение. Отглеждането на разсада се провежда в 30 повторения.

След това на етап 4-5 същински листа разсадът, заедно с буца пръст, се засажда за постоянно в почва, като се обособяват отделни посевни площи според третирането с един от посочените по-горе биопрепарати или вода. Размерът на площите е 5 m² с разстояние между редовете 50 cm, а между растенията в реда 35 cm. Агротехниката за отглеждане на зелето е общоприетата. За борба с вредителите растенията двукратно се

третиран с 0,15% разтвор на инсектицида димофос (40% емулсия) и се подхранват с минерални торове, както следва: на 3-та седмица след засаждането на разсада с $N_{35}P_{20}K_{30}$ и на етап розетни листа с $N_{30}P_{20}K_{35}$.

През вегетацията за всяка обособена посевна площ, според предишното третиране с един от упоменатите биопрепарати, се провежда двукратно пръскане на растенията с 0,5% разтвор на съответния биопрепарат при разчет 2 l/ha (2 l на 400 l вода на 1 ha) с ръчна пръскачка SOLO-456. Контролата не се пръска. Опитът се провежда в четири повторения. Резултатите от опита са представени в Таблица 13.

Таблица 13. Ефективност на ризосферните бактериални шамове при полски опити с главесто зеле от сорта „Подарък“ (Ленинградска област).

Вариант на опита (бактериален шам)	Добив на зеле, центнер/ха	Увеличение на добива	
		центнер/ха	%
Контрол (без третиране)	390	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИСХМ 128 (Фитоспорин - стандарт)	408	18	4,6
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	415	25	6,4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявеният)	451	61	15,6

От данните, представени в таблици 12 и 13, следва, че биопрепаратът, получен на базата на заявения бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantation* BS89, има по-силно въздействие върху добива (продуктивността) на зеленчуковите селскостопански култури в сравнение с биопрепарата, получен на базата на шата прототип *Bacillus subtilis* 8А.

Полските опити със захарно цвекло от сорта „Рамонско едносеменно 47“ са проведени в учебното опитно стопанство на Башкирския държавен аграрен университет, Република Башкортостан, на излужени черноземни почви. Съдържанието на хумус в почвата е 5,8%, рН - 6,5, фосфор (по Чириков) - 91,1 mg/kg, калий (по Чириков) - 130,8 mg/kg. Сорбционният капацитет на почвите е доста висок 54-56 mg.екв., а степента на наситеност с бази е 96-98%.

Сеитбената норма на семената е около 5,5 kg/ha. Гъстотата на поникналите растения към момента на прибиране на реколтата е 80 хил. бр./ha. Метод на засяване на захарното цвекло - широколентов с разстояние между редовете - 45 cm, а при крайните редове - 50 cm. Оптималната дълбочина на засяване на семената в почвата е 3-4 cm. Пробната посевна площ е 50 m², а големината на реколтната парцела е 25 m². Опитът се провежда в четири повторения.

Цялата посевна площ е разделена на четири блока. Посевите във всеки отделен блок се третира с 0,5% разтвор на един от следните биопрепарати: на базата на шата *Bacillus subtilis* 128 ВНИИСХМ („Фитоспорин“ - стандарт); на базата на шата прототип *Bacillus subtilis* 8А; на базата на заявения бактериален шам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, получен по описания по-горе начин, а контролният блок не се третира.

Третирането на растенията във всеки отделен блок става чрез двукратно пръскане с 0,5% разтвор на един от изброените по-горе биопрепарати при разчет 2 l биопрепарат на 400 l вода на 1 хектар с помощта на ръчна пръскачка SOLO-456, както следва: на етап 4-6 същински листа и затваряне на листата между редовете.

Контролата не се пръска. Опитът се провежда в четири повтаряния. Резултатите от опита със захарно цвекло са представени в Таблица 14.

Таблица 14. Ефективност на ризосферните бактериални щамове при полски опити със захарно цвекло от сорта „Рамонско едносеменно 47“ (Башкортостан).

Вариант на опита (бактериален щам)	Добив на захарно цвекло, центнер/ха	Увеличение на добива	
		центнер	%
Контрола (без третиране)	290	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 128 („Фитоспорин“)	322	32	11.0
<i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	331	41	14.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	355	65	22.4

Полските опити с маслодаен слънчоглед и лен са проведени в Ставрополския край на черноземни, средно мощни, средно глинести, средно хумусни почви с хумус (по Тюрин) - 3,71%, нитратен азот - 6,2 mg/kg, фосфор - 75 mg/kg, калий - 180 mg/kg, рН на водната среда 7,15. Агротехника: земя с предшественик пролетен ечемик, засяването на слънчогледа и лена се извършва със сеялки за точна сеитба СКС-610 с дозиращ изсяващ апарат.

Вариантите на опита предвиждат засяване на семената лен и слънчоглед без третиране (контрола) и с третиране с биопрепарати, както следва: „Фитоспорин“ (на базата на щама *Bacillus subtilis* 128), препарат на базата на щама прототип *Bacillus subtilis* 8A и препарат на базата на заявения щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, при разчет 2,0 l/t, както и третиране на растенията през вегетацията с посочените биопрепарати при разчет 1,0 l/ha.

Опитът е заложен по блоковия метод при пробна посевна площ 30 m² и големина на реколтната парцела 25 m². Опитът се провежда в четири повторения. Прибирането на реколтата лен и слънчоглед се извършва с малогабаритен комбайн „Винтерщайгер“ е определяне на добива от всички опитни варианти. Резултатите от опитите са представени в Таблицы 15 и 16.

Таблица 15. Ефективност на ризосферните бактериални щамове при полски опити с маслодаен лен (Ставрополски край).

Вариант на опита (препарати на базата на бактериален щам)	Добив на семе, центнер/ха	Увеличение на добива	
		центнер	%
Контрола (без третиране)	7.0	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 128 (Фитоспорин)	8.1	1.1	15.7
<i>Bacillus subtilis</i> 8A (прототип)	8.5	1.5	21.4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	11.3	4.3	61.4

Таблица 16. Ефективност на ризосферните бактериални щамове при полски опити с маслодаен слънчоглед (Ставрополски край)

Вариант на опита (бактериален щам)	Добив на слънчоглед, центнер/ха	Увеличение на добива	
		центнер	%
Контрола (без третиране)	12,3	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 128 (Фитосворив)	13,5	1,2	9,8
<i>Bacillus subtilis</i> 8А (прототип)	13,7	1,4	11,4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> BS89 (заявен)	17,1	4,8	39,0

От представените в таблици 14, 15 и 16 данни се вижда, че биопрепаратът, получен на базата на заявения бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, притежава по-силно въздействие върху добива (продуктивността) на технически селскостопански култури: захарно цвекло, лен, слънчоглед в сравнение с биопрепарата, получен на базата на щамата прототип *Bacillus subtilis* 8А.

Тоест резултатите от тестването на биопрепарата, създаден на базата на бактериалния щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, потвърждават след проведените полски опити ефективността от неговото прилагане за повишаване на добива при отглеждането на такива селскостопански култури, като пшеница, ечемик, картофи, зеле, захарно цвекло, лен, слънчоглед, което доказва перспективното му използване в селското стопанство.

Следователно щамът на ризосферните бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89 е подходящ за използване в селското стопанство като ефективно средство за повишаване на продуктивността на растенията и защитата им срещу болести, причинени от фитопатогенни микроорганизми, с което се разширява арсеналът от подобни средства.

Патентни претенции

1. Бактериален щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BS89, депозиран във Федералното държавно бюджетно научно учреждение „Руски научноизследователски институт по селскостопанска микробиология“ под номер RСAM 03458, като средство за повишаване на продуктивността на растенията и тяхната защита срещу болести, причинени от фитопатогенни микроорганизми.

Литература

1. Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny J., Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9: 1084-1090.
2. Malfanova N, Franzil N, Lugtenberg B, Chebotar V, Ongena M. 2012. Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* C8. *Arch Microbiol* 194: 893-899.
3. Bais HP, Fall R, Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol* 134:307-319.
4. Kloepper J, Leong J, Teintze M. and Schroth MN. 1980. *Pseudomonas siderophores*: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology* 4: 317-320.

5. Chen X.-H., R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mogel, S. Kunz, and R. Borriss. 2009. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* 140:38-44.
6. Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, et al. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* 25: 1007-1014.
7. Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Sussmuth RD, Mitchell DA, BorrissR. 2011. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Bacterid.* 193: 215-224.
8. Molohon, K.J.; Melby, J.O.; Lee, J.; Evans, B.S.; Dunbar, K.L.; Bumpus, S.B.; Kelleher, N.L.; Mitchell, D.A. "Structure determination and interception of biosynthetic intermediates for the plantazolicin class of highly discriminating antibiotics." *ACS Chem. Biol.* 6:1307-1313 (2011). doi:10.1021/cb200339d.
9. He P, Hao K, Blom J, Ruckert C, Vater J et al. 2013. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *J Biotechnol* 164: 281-291.
10. Palacios OA., Bashan Y, de-Bashan LE. 2014. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria: an overview. *Biol. Fertil. Soils* 50: 415-432.