

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
02 июня 2022 (02.06.2022)



(10) Номер международной публикации
WO 2022/115002 A1

(51) Международная патентная классификация:

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/20 (2020.01)
B09C 1/10 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2021/050376

(22) Дата международной подачи:

15 ноября 2021 (15.11.2021)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:

2020139179 27 ноября 2020 (27.11.2020) RU

(71) Заявитель: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ОРГАНИК ПАРК"
(ORGANIC PARK LIMITED LIABILITY
COMPANY)** [RU/RU]; Восстания ул., д. 100, здание 45,
пом. 9 Казань, 420095, Kazan (RU).

(72) Изобретатели: **МУРАТОВА, Анна Юрьевна
(MURATOVA, Anna Yurievna)**; Чернышевского ул., д.
14, кв. 312 Саратов, 410076, Saratov (RU). **ТУРКОВ-
СКАЯ, Ольга Викторовна (TURKOVSKAYA, Olga
Viktorovna)**; Шелковичная ул., жилой комплекс Цари-
цынский, д. 2, кв. 182 Саратов, 410071, Saratov (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (ii))
- касающаяся права испрашивать приоритет предшествующей заявки (правило 4.17 (iii))

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- со сведениями относительно депонированного биологического материала, представленными в соответствии с правилом 13bis отдельно от описания (правила 13bis4(d)(i) и 48.2(a)(viii))
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

(54) Title: RHODOCOCCUS QINGSHENGII BACTERIAL STRAIN THAT DEGRADES IMAZETHAPYR AND STIMULATES CROP GROWTH

(54) Название изобретения: ШТАММ БАКТЕРИЙ RHODOCOCCUS QINGSHENGII - ДЕСТРУКТОР ИМАЗЕТАПИРА И СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ

(57) Abstract: The invention relates to agricultural microbiology, ecology and biotechnology and is intended for remediating soil contaminated with imidazolinone herbicides and stimulating the growth of planted crops. A *Rhodococcus qingshengii* bacterial strain deposited under VKPM number Ac-2143 was isolated from an enrichment culture based on rhizosphere microflora of soybeans grown on soil treated with the herbicide imazethapyr. The *Rhodococcus qingshengii* strain deposited under VKPM number Ac-2143 degrades the herbicide imazethapyr and stimulates the growth of crops planted in soil contaminated with imazethapyr.

(57) Реферат: Изобретение относится к области сельскохозяйственной микробиологии, экологии и биотехнологии, предназначено для восстановления почвы от загрязнения гербицидами класса имидазолинонов и стимуляции роста высаженных растений. Штамм бактерий *Rhodococcus qingshengii*, депонированный под номером ВКПМ Ac-2143, выделен из накопительной культуры на основе ризосферной микрофлоры сои, выращенной на почве, обработанной гербицидом имазетапиром. Штамм *Rhodococcus qingshengii*, депонированный под номером ВКПМ Ac-2143, является деструктором гербицида имазетапира и стимулятором роста растений, выращенных в загрязненной имазетапиром почве.



WO 2022/115002 A1

ОПИСАНИЕ

ШТАММ БАКТЕРИЙ RHODOCOCOCCUS QINGSHENGII - ДЕСТРУКТОР ИМАЗЕТАПИРА И СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ

Область техники

Изобретение относится к области сельскохозяйственной микробиологии, экологии и биотехнологии, предназначено для восстановления почвы от загрязнения гербицидами класса имидазолинонов, стимуляции роста высаженных растений и представляет собой штамм бактерий *Rhodococcus qingshengii*, депонированный под номером ВКПМ Ас-2143.

Развитие современного сельскохозяйственного земледелия невозможно без применения удобрений и химических средств защиты растений – пестицидов, среди которых максимальная доля приходится на гербицидные препараты. В процессе использования гербициды попадают в почву, где время их полураспада зависит от большого количества факторов: химической спецификации вещества, типа и физико-химических свойств почвы, климатических и географических особенностей сельскохозяйственных территорий. Многие гербициды (как например, имидазолиноны) крайне медленно разрушаются в почве, и микробная деградация подобных стойких соединений может быть единственным способом восстановления почвенного здоровья и обеспечения урожайности новых посевов.

Предшествующий уровень техники

Из современного уровня развития науки и техники известен биопрепарат, обладающий свойством деструкции пестицидов на примере симазина и стимулирующий почвенное плодородие. Основу биопрепарата-биодеструктора составляет консорциум молочнокислых бактерий

Streptococcus thermophilus, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus salivarius* var. *salicinicus*, *Lactobacillus salivarius* var. *salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* (ВКПМ-5972), растительные полисахариды, микроэлементы в виде комплексов, ненасыщенные жирные кислоты – предшественники простагландинов (Пат. РФ № 2203870; Пат. РФ № 2203879).

Однако указанная микробная композиция не способна к разложению гербицидов классов имидазолинонов и не способна стимулировать рост растений.

Описан биопрепарат для очистки воды, почвы, промышленных стоков от устойчивых к разложению пестицидов, выбранных из хлорфеноксиуксусных кислот, таких как 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т), хлорфеноксиуксусная кислота (ХФУК), феноксиуксусная кислота (ФУК), -2,4-дихлорфенокси- α -пропионовой кислоты, 2-метил-4-хлорфенокси- α -пропионовой кислоты, 2,4,5-трихлорфенокси- α -пропионовой кислоты, 2,4-дихлорфенокси- α -масляной кислоты, метил-[1-(бутиламино)карбонил]-1Н-бензимидазол-2-илкарбамата, 2,4-дихлорфенола, имидоклаприда, гексахлоргексана, а также фенола (Пат. РФ № 2484131). Биопрепарат представляет собой ассоциацию штаммов бактерий *Pseudomonas putida* ВКПМ В-10997, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10999 и *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ - Ас-1882 в массовом соотношении (1-2):(1-2):1. Биопрепарат содержит дополнительно сорбент, органические, минеральные и стимулирующие добавки и обладает стимулирующей рост растений активностью и фунгицидными свойствами.

Указанный биопрепарат обладает стимулирующим рост растений действием, но не способен подвергать деградации гербициды класса имидазолинонов.

Известен штамм бактерий *Bacillus megaterium* 501, который может использоваться для деструкции остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в природных средах (А.с. СССР №1735359). Однако указанный

микроорганизм не проявляет стимулирующей рост растений активности.

Известен штамм бактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2623D, для очистки почв, загрязненных гексахлорбензолом, линданом, дихлордифенилтрихлорэтаном, дихлордифенилдихлорэтаном, триаллатом и эфирами фталиевой кислоты (дибутилфталатом, диоктилфталатом) (Пат. РФ № 2562156).

Недостатком этого изобретения является отсутствие способности у штамма *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2623D подвергать деградации гербициды группы имидазолинонов.

Известен штамм бактерий *Achromobacter* sp. ВКМ В-2534 Д, используемый для очистки почв и жидких сред, например, грунтовых и поверхностных вод, загрязненных органофосфонатами (Пат. РФ № 2401298). Штамм бактерий *Achromobacter* sp. Кг 16 был выделен методом накопительных культур из почвы, загрязненной глифосатом, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ В-2534 Д. Штамм утилизирует органофосфонаты: глифосат, метилфосфонат, аминометилфосфонат, фосфоноацетат, 2-аминоэтилфосфонат, N-(фосфонометил)иминодиацетат. Показана устойчивость штамма к высоким концентрациям гербицида глифосата, что расширяет диапазон его применения, в том числе в аварийных ситуациях.

Указанный штамм *Achromobacter* sp. ВКМ В-2534 подвергает деградации гербициды класса органофосфонатов, но не имидазолиноны и не способен стимулировать рост растений.

Наиболее близким к предлагаемому микроорганизму по способности к биодegradации имазетапира является штамм бактерий *Pseudomonas* sp. IM-4 (Huang et al., 2009). Данный штамм утилизирует более 73% имазетапира, присутствующего в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации 50 мг/л в жидкой минеральной среде, а также способен разрушать этот гербицид в почве на 67,6% за 25 дней при исходной концентрации имазетапира в почве 10 мг/кг. Однако сведения о наличии у этого штамма

признаков, позволяющих стимулировать рост растений (например, синтез фитогормонов, сидерофоров и других фитоактивных веществ), а также данные о стимуляции роста таких злаковых культур как пшеница или рожь, отсутствуют.

Раскрытие изобретения

Задачей, на решение которой направлено заявляемое техническое решение, является получение микробного штамма, подвергающего деградации имазетапир – гербицид класса имидазолинонов – и обладающего свойствами стимулятора роста растений.

Технический результат, который может быть получен при использовании заявляемого изобретения, заключается в повышении биodeградации гербицида имазетапира и стимуляции роста растений на почве, содержащей его остаточные концентрации.

Штамм IMZT-32 был исследован на наличие свойств, прямо или косвенно способствующих росту растений: синтез фитогормона индолил-3-усускной кислоты (ИУК), фиксация атмосферного азота, растворение фосфатов, синтез фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) деаминазы, синтез сидерофоров, стимуляция всхожести и развития проростков растений. Установлено, что IMZT-32 способен продуцировать сидерофоры, АЦК-деаминазу и фитогормон ИУК, стимулировать рост побегов и корней пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и ржи озимой (*Secale cereale* L.) в лабораторных вегетационных опытах с 4-сут. проростками.

Штамм IMZT-32 был депонирован с регистрационным номером IBPPM 646 в Коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, а затем в связи с расширением направлений фундаментальных и прикладных исследований этого штамма идентифицирован как вид *Rhodococcus qingshengii*, переименован в *Rhodococcus qingshengii* OPI-01 и депонирован во Всероссий-

ской коллекции промышленных микроорганизмов под номером Ас-2143.

Заявляемый штамм характеризуется следующими культурально-морфологическими, физиолого-биохимическими и биотехнологическими признаками.

Морфологические признаки: В мазках суточной культуры присутствуют короткие палочки неправильной формы, V-образной формы, с зачатками слабого ветвления. По Граму окрашиваются положительно. Спор не образуют. Неподвижные.

Культуральные признаки: Аэроб. Температурный оптимум 30°C. После инкубации на мясо-пептонном агаре через 2 сут. образует округлые, выпуклые колонии диаметром около 2 мм с блестящей поверхностью, непрозрачные, однородной структуры и густой маслянистой консистенции. Со временем колонии приобретают розоватый оттенок. Рост на скошенном мясо-пептонном агаре отчетливый по штриху на 2 сут.

Физиолого-биохимические признаки: Продуцирует каталазу, уреазу, но не оксидазу, лецитиназу, липазу, фенилаланилдеаминазу. Не гидролизует желатин и крахмал. При росте на мясо-пептоном бульоне образует сероводород, но не индол и аммиак. Флюоресцирующие и другие пигменты не образует. Осуществляет редукцию нитратов. Способен расти на среде в присутствии 2,5% NaCl. Утилизирует цитрат на среде Симмонса. В О/Ф-тесте окисляет ксилозу, мальтозу, но не лактозу и маннит.

Генетические характеристики: филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16SpРНК, показал, что штамм ОРІ-01 является представителем вида *Rhodococcus qingshengii*.

Биотехнологические признаки:

- способность стимулировать рост растений, за счет продукции фитогормона ИУК, фермента АЦК-деаминазы и сидерофоров. Синтезирует ИУК в концентрации 8-12 мкг/мл за 7 сут. культивирования в среде, содержащей предшественник фитогормона аминокислоту триптофан. Продукция ИУК

штаммом определяется с использованием ВЭЖХ по появлению и накоплению фитогормона. Стимулирует рост побегов и корней пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) и ржи озимой (*Secale cereale* L.) в лабораторных вегетационных опытах с 4-сут. проростками.

- способность подвергаться деградации гербицид имазетапир. Разрушает гербицид имазетапир в концентрации 50 мг/л за 7 сут. на 23% при культивировании в жидкой минеральной среде MSM. Активность, связанная с деградацией гербицида, определяется по убыли субстрата из среды культивирования. Остаточное содержание имазетапира определяется с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В лабораторных условиях (не в коллекции) культуру хранят при 4°C на столбиках агаризованной (0,6 %) среды LB (г): агар – 6; бактотриптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; дистиллированная вода – 1 л; pH 7.0-7.2.

Штамм *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 авирулентен (Протокол экспериментального исследования по определению среднелетальной дозы (LD50) на белых мышах, проведенного 16.04.2019 г. – 29.04.2019 г. в лаборатории диагностических технологий отдела микробиологии отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) и может быть использован для восстановления почвы от остаточного загрязнения гербицидными препаратами на основе имазетапира и для стимуляции роста растений на такой почве.

Вариант осуществления изобретения

Штамм бактерий *Rhodococcus qingshengii*, депонированный под номером ВКПМ Ас-2143, которому первоначально был присвоен лабораторный шифр IMZT-32, был выделен из накопительной культуры на основе микрофлоры ризосферы сои (*Glycine max* L.), выращенной на почве, обработанной герби-

цидным препаратом «Фабиан», действующим веществом которого является имазетапир. Для постановки накопительной культуры образцы корней растений с оставшейся закрепленной на них почвой (не более 2 мм) помещали в колбу с минеральной средой MSM (Huang X., Pan J.J., Liang B., Sun J.Q., Zhao Y.Y., Li S.P. Isolation, characterization of a strain capable of degrading imazethapyr and its use in degradation of the herbicide in soil // Curr. Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 363–367.) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,5; KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,5. В качестве единственного источника углерода и энергии в среду добавляли имазетапир до конечной концентрации 50 мг/л. Колбы с накопительными культурами инкубировали на шейкере при 140 об/мин и 30°C в течение восьми недель, еженедельно заменяя среду в колбах на свежую. По окончании культивирования из накопительных культур были приготовлены десятикратные разведения, которые высевали на поверхность агаризованной среды MSM, содержащей 100 мг/л имазетапира в качестве единственного источника углерода и энергии. Посевы инкубировали в термостате при 30°C в течение 7 сут, после чего учитывали появившиеся колонии, отсеивая их для получения чистых культур. В дальнейшем все полученные таким образом изоляты проверяли на способность к деградации имазетапира, при культивировании их в жидкой среде MSM, содержащей гербицид в концентрации 50 или 100 мг/л в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм IMZT-32 отличался способностью подвергать деградации гербицид имазетапир на 23% за 7 сут. культивирования.

Промышленная применимость

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Биодegradация имазетапира и близких по структуре метаболитов штаммом *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 при культивировании в жидкой минеральной среде.

Способность штамма *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 деградировать гербицид имазетапир и его возможные метаболиты исследовали, культивируя микроорганизм в жидкой минеральной среде MSM, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии имазетапир в концентрации 50 мг/л или один из метаболитов (2,3-пиридиндикарбоновую кислоту – ПДК или 2-гидроксиникотиновую кислоту – ГНК) в концентрации 200 мг/л.; pH среды 6,8 – 7,0. Посев микроорганизма в среду проводили до получения начальной плотности микробной суспензии 0,05 или 0,1 ед. опт. пл., измеренной при 600 нм. В качестве контроля использовали среду с имазетапиром или метаболитами без бактерий. Все варианты опыта имели трехкратную повторяемость. Культивирование проводили 7 дней в условиях аэрации на качалке при 150 об./мин., 30°C. В конце эксперимента в среде после культивирования определяли остаточное содержание имазетапира, ПДК и ГНК методом ВЭЖХ (таблица 1).

Таблица 1 – Биодegradация имазетапира и близких метаболитов – гидроксиникотиновой и пиридиндикарбоновой кислот – в качестве единственных источников углерода и энергии в среде MSM штаммом *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143

Вариант опыта	имазетапир, мг/л	ГНК, мг/л	ПДК, мг/л
Контроль (без микроорганизма)	52,5±1,9	219,4±11,6	203,6±4,1
<i>Rhodococcus qingshengii</i> ВКПМ Ас-2143	40,6±5,6	202,1±6,3	166,3±8,3

Анализ остаточного содержания гербицида и близких по химической структуре метаболитов в среде после культивирования в течение 7 сут. и в контрольном варианте без микроорганизма показал, что имазетапир разрушался штаммом *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 на 22,7%, ПДК – на

18,3%, а ГНК – на 6,9%.

Полученные данные свидетельствовали о способности штамма *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 подвергать деградации имазетапир и близкие к нему по химической структуре метаболиты, используя их в качестве единственного источника углерода и энергии.

Пример 2. Влияние штамма *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 на рост и развитие растений пшеницы мягкой в почве, искусственно загрязненной имазетапиром.

Почву в эксперименте искусственно загрязняли гербицидным препаратом «Виадук ВК» (ДВ: имазетапир, 100 г/л), внося препарат с водой для полива в дозировке, согласно инструкции, до конечной концентрации по имазетапиру 10 мг/кг почвы. Почву увлажняли до 50% от полной влагоемкости. Семена пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Фаворит» по 20 шт. высевали в 1-л вегетационные сосуды, содержащие 1 кг почвы. Для стимуляции роста растений после появления всходов почву дважды – на 5 и 21 дни культивирования – обрабатывали бактериями, внося микробную суспензию с водой для полива до конечной концентрации микроорганизма-инокулянта в почве – 10^7 кл./г. Для приготовления суспензии 3-суточную LB-агаровую культуру штамма отмывали в фосфатном (рН 7.2) буфере и ресуспендировали в воде для полива растений. Эксперимент проводили в контролируемых условиях: при температуре 24/20 °С, световом режиме 14/10 ч (освещенность – 8000 люкс) соответственно день/ночь, поддерживая влажность почвы на уровне 50% от полной влагоемкости поливом отстоянной водопроводной водой, необходимость которого определяли взвешиванием сосудов. Продолжительность эксперимента составляла 47 сут. По окончании эксперимента растения извлекали из сосудов, корни отмывали от почвы проточной водой. Высушивали фильтровальной бумагой, измеряли длину корней и побегов, отделяли их и высушивали до постоянного веса при 65 °С. Образцы почвы (5 г)

отбирали и высушивали до воздушно-сухого состояния перед анализом на гербицид. Содержание имазетапира в почве определяли как описано ранее (Assalin M.R., Queiroz S.C.N., Ferracini V.L., Oliveira T., Vilhena E., Mattos M.L.T. A method for determination of imazapic and imazethapyr residues in soil using an ultrasonic assisted extraction and LC-MS/MS // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2014. – Vol. 93. – P. 360–364) с использованием ВЭЖХ.

В свежезагрязненной имазетапиром почве наблюдалось сильное угнетение роста растений пшеницы: за 25 сут. вегетации практически все растения в варианте без бактериализации так и остались на стадии проростков. Из необработанной и обработанной микроорганизмом почвы отобрали растения и сравнили их по морфометрическим показателям (рисунки 1 и 2). У бактериализованных растений длина побегов и корней была на 61 и 38%, а прирост биомассы – на 17 и 9% больше по сравнению с небактериализованными соответственно. Таким образом, и в этом варианте опыта штамм *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 проявил способность к стимуляции роста растений.

Анализ содержания имазетапира в почве проводили перед посевом растений (исходная точка) и в конце опыта. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Изменение содержания имазетапира в почве в лабораторном эксперименте

Вариант опыта	Содержание имазетапира, мг/кг	Дегградация, %
Исходная загрязненная почва	6,17	
Не бактерилизованная почва, без растений	5,87	4,9
Не бактерилизованная почва, с пшеницей	5,90	4,3
Бактерилизованная почва, без растений	5,36	13,1
Бактерилизованная почва, с пшеницей	5,78	5,7

Примечание. ОДК в почве для имазетапира 0,1 мг/кг

Таким образом, предложенный штамм бактерий обладает свойствами

деградировать гербицид имазетапир и стимулировать рост растений, выращиваемых в загрязненной им почве. Сочетание указанных свойств может обеспечить как биodeградацию загрязнителя в грунте, так и приживаемость и стимуляцию роста высаженных в загрязненную почву растений.

Пример 3. Влияние штамма *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 на рост и развитие растений мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Симбирцит» в песке, искусственно загрязненном имазетапиром.

В качестве модельного гербицида использовали препарат «Пивот, ВК» (ДВ: имазетапир, 100 г/л). Растворы препарата вносили в следующих количествах (на г сухого кварцевого песка): 114×10^{-7} мл, $28,5 \times 10^{-7}$ мл. Расчет концентраций гербицида на единицу массы субстрата проводили, исходя из насыпной плотности кварцевого песка 1750 кг/м^3 и предполагаемой глубины проникновения пестицидов 20 см. Обработку песка клетками *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 проводили после внесения в грунт гербицида, из расчета 10^7 клеток/г песка. Суспензию клеток микроорганизма готовили в стерильном растворе Кнопа с микроэлементами и глицерином в качестве источника углерода и энергии в концентрации 3 г/л.

Перед закладкой опытов песок стерилизовали автоклавированием при давлении 1 атм. в течение 1 часа. Бактеризацию грунта проводили в двух вариантах: **А** – через 1 сут. после обработки грунта пестицидом, посев растений – через 14 сут., **Б** – через 5 сут. после добавления пестицида в песок, посев растений – через 21 сут. До высадки растений песок увлажняли стерильным раствором Кнопа с глицерином в концентрации 0,5 г/л, но без микроэлементов; после посева семян пшеницы – стерильным раствором Кнопа без глицерина и микроэлементов.

Перед посадкой семена растений стерилизовали с помощью 3 % перекиси водорода с последующей десятикратной отмывкой стерильной дистиллированной водой.

Оценку роста растений проводили спустя 4 недели после их посадки. Об интенсивности роста судили на основании морфологических параметров (длины корней и побегов), а также проводили определение содержания белка в корнях и побегах растений по методу Лоури и определение содержания хлорофилла в листьях спектрофотометрическим методом.

При анализе влияния бактериализации на рост пшеницы сорта «Симбирцит» установлено, что внесение в песок культуры *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 оказывает благоприятный эффект на рост и развитие растений в загрязнённом грунте (таблица 3, рисунки 3 и 4).

Таблица 3 – Морфометрические и биохимические показатели растений пшеницы сорта Симбирцит при воздействии гербицида Пивот и бактериализации *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143.

Обработка Параметр	Пивот, 0 мл/г		Пивот, $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г		Пивот, 114×10^{-7} мл/г	
	Без м/о	Ас-2143	Без м/о	Ас-2143	Без м/о	Ас-2143
А. Внесение биопрепарата через 1 день после обработки песка гербицидом, посадка растений через 14 дней после внесения гербицида						
Длина, мм						
корень	121,5 ± 29,1	145 ± 33,4	47,0 ± 5,6	68,1 ± 20,2	35,4 ± 9,1	42,1 ± 11,3
побег	352,8 ± 67,4	350,6 ± 45,9	99,6 ± 37,4	217,1 ± 47,4	43,0 ± 17,7	119,6 ± 35,1
Белок, % от сухой массы						
корень	1,58 ± 0,11	1,34 ± 0,37	0,53 ± 0,19	1,29 ± 0,35	0,29 ± 0,03	1,27 ± 0,17
побег	0,42 ± 0,22	0,19 ± 0,06	0,3 ± 0,07	0,29 ± 0,05	0,18 ± 0,06	0,27 ± 0,09
Хлорофиллы, мкг/г						
<i>a</i>	838 ± 301	711 ± 257	597 ± 277	768 ± 192	267 ± 54	458 ± 116
<i>b</i>	387 ± 128	338 ± 107	239 ± 106	333 ± 85	107 ± 38	190 ± 43
общее содержание	1226 ± 428	1049 ± 363	836 ± 382	1101 ± 276	374 ± 92	647 ± 159
Б. Внесение биопрепарата через 5 дней после обработки песка гербицидом, посадка растений через 21 день после внесения гербицида						
Длина, мм						
корень	124,4 ± 17,9	120 ± 21,2	29,5 ± 9,1	54,1 ± 12,0	28,8 ± 5,5	42,8 ± 8,7
побег	340,1 ± 36,6	353,3 ± 26,5	56,4 ± 11,6	182,4 ± 25,4	31,5 ± 7,8	108,0 ± 22,1

Белок, % от сухой массы						
корень	1,26 ± 0,08	1,24 ± 0,08	0,62 ± 0,04	1,49 ± 0,10	0,49 ± 0,03	1,12 ± 0,15
побег	0,51 ± 0,07	0,41 ± 0,05	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,26 ± 0,03
Хлорофиллы, мкг/г						
<i>a</i>	859 ± 112	572 ± 68	382 ± 15	574 ± 145	301 ± 37	376 ± 184
<i>b</i>	377 ± 34	284 ± 40	170 ± 36	286 ± 62	154 ± 17	169 ± 81
общее со- держание	1236 ± 146	856 ± 108	552 ± 51	860 ± 207	455 ± 54	546 ± 265

Высев пшеницы в песок, предварительно обработанный штаммом *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143, через 14 сут. после бактериализации приводил к формированию более развитых корней и побегов у растений пшеницы. Так, при концентрации препарата Пивот $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г песка добавление микроорганизмов в песок приводило к удлинению корней в 1,5 раза (на 45 %), при концентрации данного препарата 114×10^{-7} мл/г песка наблюдалось удлинение корней в 1,2 раза (на 19 %). При этом в обоих случаях длина побегов увеличивалась более чем в 2 раза по сравнению с не бактеризованными вариантами. В то же время посев пшеницы через 21 день после бактериализации песка приводил к более выраженному эффекту микроорганизмов на прорастание растений. В данном случае при концентрациях пестицида $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г песка и 114×10^{-7} мл/г песка отмечено увеличение длины корней в 1,8 раз (на 84 %) и в 1,5 раз (на 49 %), соответственно. Также в песке, обработанном микроорганизмами, отмечено увеличение длины формируемых побегов пшеницы более чем в 3 раза по сравнению с растениями, высеянными в загрязнённый грунт без добавления *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143.

Таким образом, показано, что штамм *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 оказывает положительное воздействие на морфологические и биохимические характеристики растений мягкой яровой пшеницы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм бактерий *Rhodococcus qingshengii*, депонированный под номером ВКПМ Ас-2143, деструктор гербицида имазетапира и стимулятор роста растений, выращенных в загрязненной имазетапиром почве.



Рисунок 1. Растения пшеницы сорта «Фаворит» (26 сут.), выросшие в почве, загрязненной «Виадуксом» (имазетапиром), не обработанной (А) и обработанной *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 (Б).

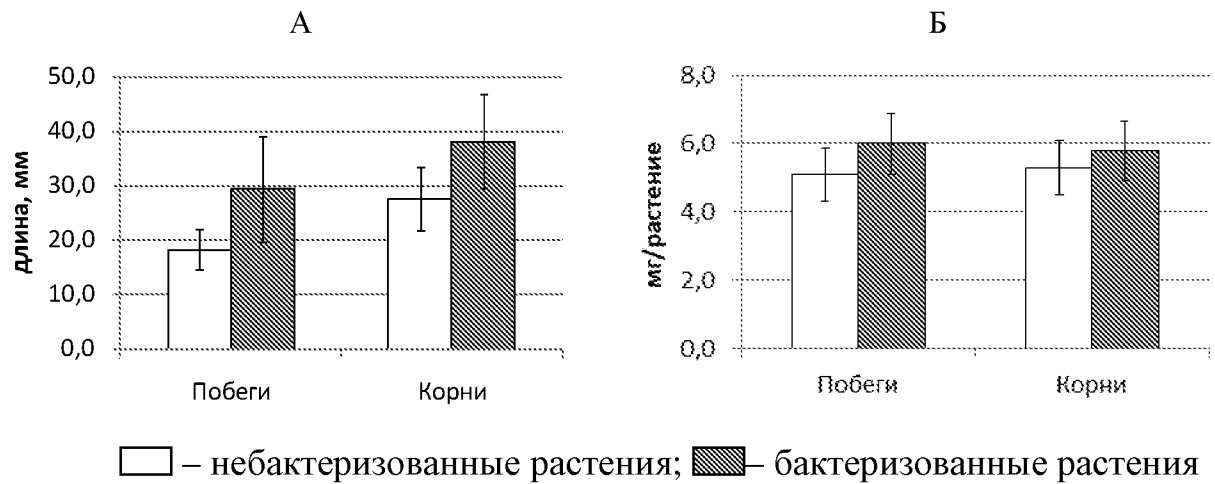
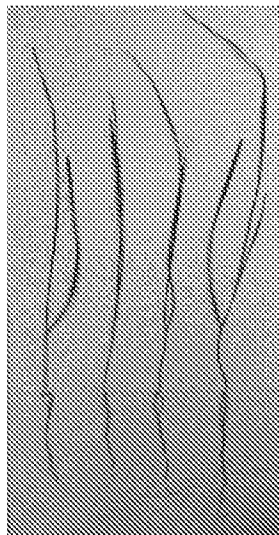
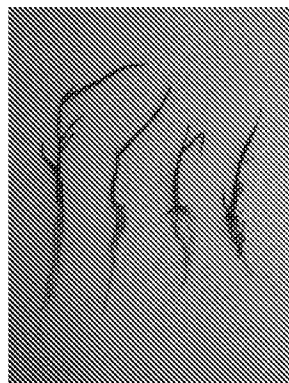


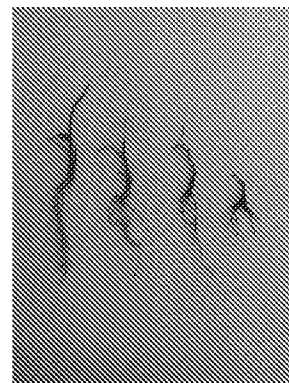
Рисунок 2. Влияние бактериализации штаммом *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ас-2143 на рост пшеницы сорта «Фаворит» (А – длина корней и побегов; Б – масса корней и побегов) в почве, загрязненной «Виадуксом» (имза-тапиром).



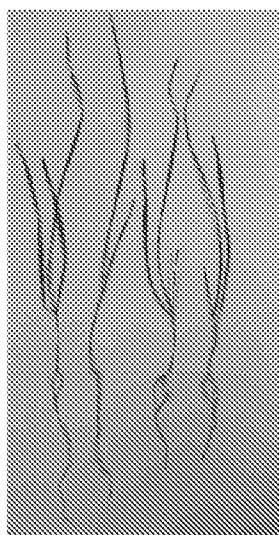
Контроль
(без обработки)



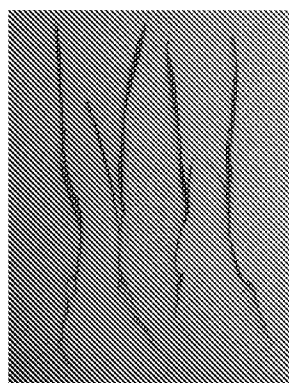
Пивот $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г
песка



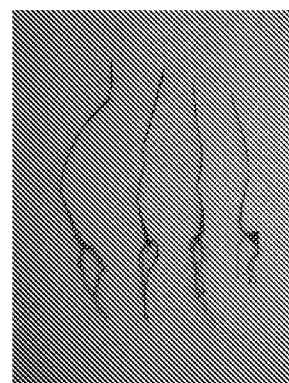
Пивот 114×10^{-7} мл/г
песка



Rhodococcus qingshengii
Ac-2143

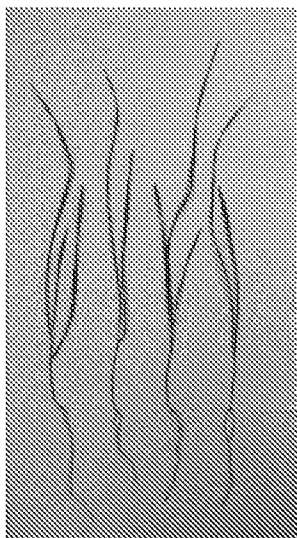


Пивот $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г
песка + *Rhodococcus*
qingshengii Ac-2143

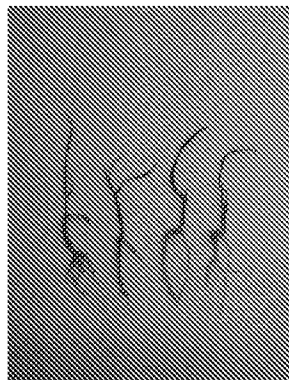


Пивот 114×10^{-7} мл/г
песка + *Rhodococcus*
qingshengii Ac-2143

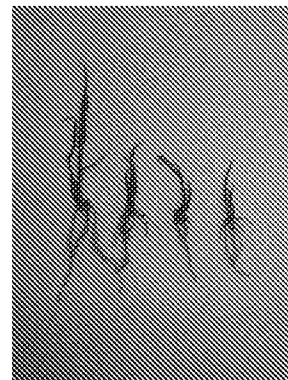
Рисунок 3. Внешний вид растений пшеницы яровой (сорт «Симбирцит»), выращенных при различных условиях обработки песка гербицидом Пивот и клетками *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ac-2143. Внесение биопрепарата через 1 сут., посадка растений через 14 сут. после обработки песка гербицидом. В качестве контроля использован чистый песок, не содержащий гербицидов и микроорганизмов.



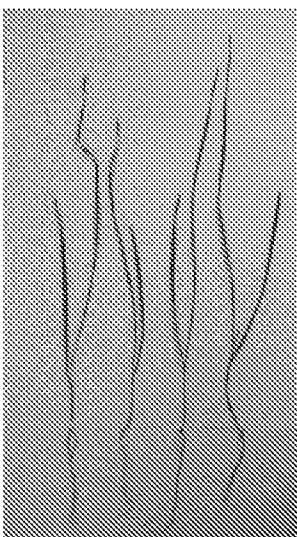
Контроль
(без обработки)



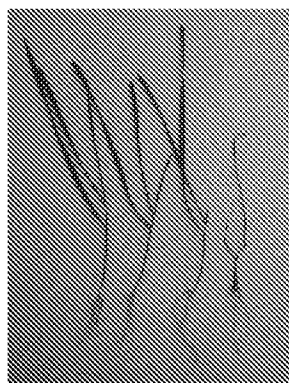
Пивот $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г
песка



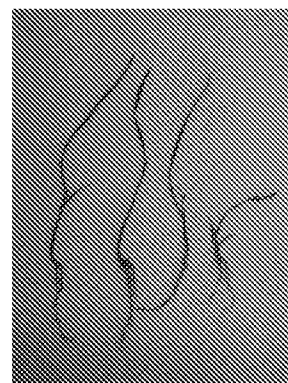
Пивот 114×10^{-7} мл/г
песка



Rhodococcus qingshengii
Ac-2143



Пивот $28,5 \times 10^{-7}$ мл/г
песка + *Rhodococcus*
qingshengii Ac-2143



Пивот 114×10^{-7} мл/г
песка + *Rhodococcus*
qingshengii Ac-2143

Рисунок 4. Внешний вид растений пшеницы яровой (сорт «Симбирцит»), выращенных при различных условиях обработки песка гербицидом Пивот и клетками *Rhodococcus qingshengii* ВКПМ Ac-2143. Внесение биопрепарата через 5 сут., посадка растений через 21 сут. после обработки песка гербицидом. В качестве контроля использован чистый песок, не содержащий гербицидов и микроорганизмов.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2021/050376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		<i>C12N 1/20 (2006.01)</i> <i>B09C 1/10 (2006.01)</i> <i>A01N 63/20 (2020.01)</i> <i>C12R 1/01 (2006.01)</i>
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N, B09C, A01N, C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAPATIS, Espacenet, PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PATENTSCOPE, eLIBRARY, ScienceDirect		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107699523 B (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 05.06.2020, the claims	1
A	RU 2618096 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BJUDZHETNOE OBRAZOVATELNOE UCHREZHDENIE VYSSHEGO OBRAZOVANIZA «KUBANSKY GOSUDARSTVENNY UNIVERSITET» (FGBOU VO «KUBGU»)) 02.05.2017, the claims	1
D, A	RU 2562156 C1 (KUMI VYACHESLAV VLADIMIROVICH) 10.09.2015, the claims, the abstract	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
“A”	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E”	earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L”	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O”	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family
“P”	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 January 2022 (26.01.2022)	Date of mailing of the international search report 27 January 2022 (27.01.2022)	
Name and mailing address of the ISA/ RU	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2021/050376

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;"><i>C12N 1/20 (2006.01)</i> <i>B09C 1/10 (2006.01)</i> <i>A01N 63/20 (2020.01)</i> <i>C12R 1/01 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>														
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C12N, B09C, A01N, C12R</p>														
<p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p>														
<p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">EAPATIS, Espacenet, PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PATENTSCOPE, eLIBRARY, ScienceDirect</p>														
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория*</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CN 107699523 B (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 05.06.2020, формула</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>RU 2618096 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (ФГБОУ ВО «КубГУ»)) 02.05.2017, формула</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">D, A</td> <td>RU 2562156 C1 (КУМИ ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ) 10.09.2015, формула, реферат</td> <td style="text-align: center;">1</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	CN 107699523 B (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 05.06.2020, формула	1	A	RU 2618096 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (ФГБОУ ВО «КубГУ»)) 02.05.2017, формула	1	D, A	RU 2562156 C1 (КУМИ ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ) 10.09.2015, формула, реферат	1
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №												
A	CN 107699523 B (NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY) 05.06.2020, формула	1												
A	RU 2618096 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (ФГБОУ ВО «КубГУ»)) 02.05.2017, формула	1												
D, A	RU 2562156 C1 (КУМИ ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ) 10.09.2015, формула, реферат	1												
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>														
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p> </td> </tr> </table>			<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>										
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>													
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">26 января 2022 (26.01.2022)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">27 января 2022 (27.01.2022)</p>												
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо: <p style="text-align: center;">Таратунина Л.</p> Телефон № +7 (495) 531-64-81</p>												