



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56033 (13) A

(51) 7 C12P1/04, C12N1/20, C12N3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ПАСТОПОДІБНОГО ЕНТОМОЦИДНОГО БІОПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

1

2

(21) 2002097414

(22) 12 09 2002

(24) 15 04 2003

(46) 15 04 2003, Бюл. № 4, 2003 р.

(72) Патица Володимир Пилипович, Мельничук Тетяна Миколаївна, Кузнецова Людмила Миколаївна, Шерстобоева Олена Володимирівна, Татарин Людмила Миколаївна, Патица Тетяна Іванівна

(73) ПІВДЕННИЙ ФІЛІАЛ ІНСТИТУТУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, ІНСТИТУТ АГРОЕКОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) 1 Спосіб виготовлення пастоподібного ентомоцидного біопрепарату на основі *Bacillus**thuringiensis*, що включає приготування поживних середовищ, вирощування мікроорганізмів, перевірку на наявність сторонньої мікрофлори, центрифугування та уведення стабілізаторів, який відрізняється тим, що як складові поживного середовища для культивування бактерій вибрані м'яся і кукурудзяний екстракт, а для тривалого зберігання ентомоцидної властивості препарату введені стабілізатори карбоксиметилцелюлоза і бензойна кислота

2 Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що поживне середовище містить 1,5 % м'яся і 2,0 % кукурудзяного екстракту, а кінцевий продукт - паста містить стабілізатори 0,2% карбоксиметилцелюлози і 0,1 % бензойної кислоти

Винахід відноситься до прикладної мікробіології, а саме до способу виготовлення пастоподібного препарату для захисту сільськогосподарських рослин від шкідливих комах родів *Coleoptera* на основі бактерій *Bacillus thuringiensis*

За найближчий аналог обраний спосіб виготовлення біопрепарату бітоксібациліну на основі бактерій *Bacillus thuringiensis* першого серотипу (ТУ - 59 05 104 23 -80)

Бітоксібацилін (БТБ) - сухий бактеріальний інсектицидний препарат, який одержують мікробіологічним шляхом. Препарат призначено для боротьби з коларадським жуком і бавовняною совкою. До складу БТБ входять спорокристалевий комплекс, термостабільний екзотоксин, залишки середовища і наповнювач - каолін.

Кристалотворюючі ентомопатогенні бактерії роду *Bacillus thuringiensis* є грам позитивні факультативні аероби. Вегетативні клітини - палички, рухоми, мають перитрихальні джгутики та здатність до утворення ланцюжків. Розмір клітин 0,8 - 1,3 x 3,0 - 6,0 мкм. Спори в спорангії розташовані субтермінально, на протилежному кінці спорангії знаходяться білкові включення (кристали) ендотоксину.

Культури бактерій на агаризованому середо-

вищі утворюють круглясті, сірувато-кремовею кольору колонії з матовою поверхнею і вихлястими краями.

Джерелом виділення утворюючих кристали бацил є комахи, птахи, рослини, тварини, а також ґрунт і вода.

Спосіб виготовлення сухого бітоксібациліну включає:

1 Розмноження посівного матеріалу скошено-м'ясопептоному агарі.

2 Трикратний пасаж із поступовим збільшенням об'єму ферментерів у виробничих середовищах, які складаються з кормових дріжджів, глюкози та стандартного набору солей для поживних мікробіологічних середовищ.

3 Сепарування або центрифугування.

4 Лioфілізація, сублімаційна сушка.

Ознаками прототипу, які співпадають з суттєвими ознаками винаходу, є спосіб розмноження і отримання інюляційного матеріалу, стерилізація середовищ та технологія культивування бактерій.

Недоліком прототипу є висока енергетична та економічна вартість кінцевого процесу - сушіння і відсутність деяких компонентів сировини в Україні для виробництва препарату.

В основу винаходу, що заявляється, постав-

(13) A

(11) 56033

(19) UA

лено технічну створення енергозберігаючого способу виготовлення вітчизняного ентомоцидного біологічного препарату для контролю чисельності шкідливих комах зі строком зберігання не менш 5 місяців. Перевагами розробленого способу виготовлення препарату є використання більш дешевих та доступних в Україні складових середовищ для культивування бактерій (меляса та кукурудзяний екстракт), енергозберігаюча технологія культивування (технічна зрілість культури у запропонованому середовищі досягається через 48 годин проти 72 годин у прототипі), а спосіб одержання кінцевого продукту введенням стабілізаторів виключає енергоємний процес сублімаційного висушування.

Технічним результатом винаходу, що заявляється, є зниження енергоємності та трудових витрат технологічного процесу при збереженні якості препарату.

Поставлена задача вирішується шляхом приготування поживних середовищ, вирощування мікроорганізмів, перевірки на наявність сторонньої мікрофлори, центрифугування та уведення стабілізаторів, при цьому в якості складових поживного середовища для культивування бактерій обрані меляса та кукурудзяний екстракт, а для тривалого зберігання ентомоцидної властивості препарату введені стабілізатори карбоксиметилцелюлоза і бензойна кислота.

Співробітниками Південного філіалу Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН і Інституту агроєкології та біотехнології УААН розроблено технологію виробництва та стабілізації пастоподібного препарату на основі *Bacillus thuringiensis*, виділених з комах півдня України.

Вибір цього виду біопрепарату обумовлено рядом причин:

висока активність проти шкідливих комах роду *Coleoptera* і *Lepidoptera*,

можливість створення малотоннажних регіональних виробництв,

значно нижча енергоємність технологічного процесу виготовлення за рахунок виключення процесу сушки,

нижча собівартість кінцевого продукту,

технологічність застосування (персистентність пастоподібного препарату, при обробці рослин не потребує використання клейких речовин),

більша екологічна безпечність (більша частка небезпечного водорозчинного екзотоксину відділяється і утилізується з центрифугатом). Усі перелічені властивості дозволяють отримати високоякісний ентомоцидний біопрепарат зі строком зберігання до 5 місяців.

Готовий пастоподібний препарат містить спори бактерій, білкові кристали ендотоксину, невеликі залишки екзотоксину та компонентів середовища, має в'язку консистенцію, характерний неприємний (але не гнильний) запах і темно-коричневий колір.

Спосіб виготовлення пастоподібного препарату включає ряд основних етапів:

1 Зберігання та розмноження посівного матеріалу на скошеному м'ясопептоному агарі.

2 Одержання маточної культури бактерій, шляхом двох 16-годинних пасажів у колбах із ви-

робничим рідким поживним середовищем, яке в якості джерела вуглецю містить мелясу, а азоту - кукурудзяний екстракт. Культуру другого пасажу використовують для засіву виробничого поживного середовища у ферментері.

3 Культивування культури бактерій у ферментері для одержання великого об'єму рідкої спорової культури проводять з коефіцієнтом заповнення робочої камери поживним середовищем 0,6% при температурі 28 - 40°C протягом 48 годин. Рідка культура містить вільні спори і білкові кристали та залишки середовища.

4 Центрифугування протягом 10 хвилин при 6 тис. обертах за хвилину. Після зливу центрифугату осад, що залишається, являє собою пастоподібну масу коричневого кольору з вологістю 25 - 30% з титром спор 20 - 25 млрд в 1 г.

5 Стабілізація пасти, тобто додаток стабілізатору білку - карбоксиметилцелюлози і антисептика - бензойної кислоти. Масу перемішують до повного розчину компонентів.

6 Фасування.

Приклад. Спосіб здійснюється таким чином. На скошеному м'ясопептоному агарі у пробірках розмножують посівний матеріал, що одержано з колекції.

Виготовляють середовища, які використовують для одержання маточної культури і рідкої спорової культури.

Склад середовища (г/л)

K_2HPO_4	0,2
KH_2PO_4	0,5
Меляса	15,0
Кукурудзяний екстракт	20,0
Вода водопровідна	1000

До стерилізації pH середовища 8,0 - 8,2 встановлюють 10% розчином NaOH. Після стерилізації pH середовища мусить бути 7,4 - 7,8.

Відповідно потрібному об'єму виготовлення препарату розчин розливають у колби або бутлі і стерилізують при 1 атмосфері протягом 30 хвилин, потім охолоджують. Перевіряють якість стерилізації методом висіву однієї крапліни середовища на м'ясопептоний агар з вуглеводами.

Дотримуючись правил антисептики в поживне середовище поміщають посівний матеріал бактерій, який отримують згідно технології на скошеному м'ясопептоному агарі. Маточну культуру бактерій вирощують на качалці при 220 об/хв і температурі 28 - 32°C протягом 18 - 20 годин. Титр вегетативних клітин бактерій маточної культури - не менш 1 млрд в 1 мл.

Маточною культурою (1 - 2% від об'єму середовища) инокулюють середовище у ферментері, і вирощують з дотриманням технологічних параметрів: аерація 0,8 - 1,0 об/хв, температурі 28 - 32°C протягом двох діб при постійній роботі мішалки. Титр спор зрілої культури не менш 2 млрд.

Пастоподібну масу одержують шляхом центрифугування спорової культури протягом 10 хвилин при 6 тис. об/хв і зливу надосадної рідини.

Стабілізацію пасти проводять у змішувачу при постійному перемішуванні, додаючи карбоксиметилцелюлозу - 0,2% і бензойну кислоту - 0,1% від об'єму пасти. Титр одержаної пасти становить 20 - 25 млрд спор в 1 г.

5

56033

6

Застосовують пасту як водяну суспензію при нормі 6кг пасту на 1га посадок. Витрати робочої рідини при обробці посадок картоплі - 300л/га. Обробку рослин проводять обприскувачем неза-

лежно від фази розвитку рослин проти личинок листя гризучих комах. Технічна ефективність складає від 85 до 100%.