



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112249** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**A01N 63/00**  
**C12N 1/20** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2016 05680</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Вінніков Альберт Іванович (UA),</b> <b>Дрегваль Оксана Анатоліївна (UA),</b> <b>Власенко Ольга Григорівна (UA),</b> <b>Черевач Наталія Василівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>26.05.2016</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.12.2016</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.12.2016, Бюл.№ 23</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b> <b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА,</b> пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010 (UA)

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РІДКОГО КОНЦЕНТРАТУ ІНСЕКТОАКАРИЦИДНОГО БІОПРЕПАРАТУ "БАКТОФУНГІН-LS"**

**(57) Реферат:**

Спосіб одержання рідкого концентрату інсектоакарицидного біопрепарату "Бактофунгін-LS" включає сумісне вирощування *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB-7186 та *Beauveria bassiana* IMB-F-100043 на поживному середовищі до рівня споруючої бактерій 95-98 % з титром не менше  $2,5 \times 10^9$  спор на 1 мл та максимального накопичення бластоспор, додавання до культуральної рідини 20 % розчину  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 5 % для осадження ентомоцидних компонентів. Суміш перемішують та відстоюють 12-18 годин при температурі 20-24 °C, після чого верхній прозорий шар рідини видаляють декантацією, а нижній шар темно-коричневого кольору переносять у ємності для зберігання, додаючи 2-3 % карбоксиметилцелюлози та 8-10 % гліцерину.

UA 112249 U



Корисна модель належить до біотехнології, а саме до біологічних засобів захисту рослин, і може бути використана у виробництві мікробних препаратів для захисту рослин від шкідників.

Ентомопатогенні бактерії та гриби широко застосовуються для регуляції чисельності шкідників у сільському господарстві. Більшість мікробних інсектицидів створено на основі різних сероваріантів ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Незважаючи на велику кількість добре відомих ентомопатогенних грибів, у виробництві мікоінсектицидів використовуються їх обмежена кількість, переважно представники родів *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* та *Verticillium* [1-3]. Більшість препаратів отримують на основі монокультур продуцентів. Недоліком монопрепаратів є нестабільність дії, пов'язана з чутливістю до несприятливих факторів навколишнього середовища та вузький спектр інсектицидної дії. Стабілізувати ефективність біопрепаратів можна шляхом введення до їх складу мікроорганізмів різних таксонів. У зв'язку з цим стратегія створення біопрепаратів останнім часом спрямована на розробку біотехнологій на основі асоціацій мікроорганізмів [4].

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб одержання пастоподібної форми інсектоакарицидного біопрепарату "Бактофунгін-LS", який містить споро-кристалічний комплекс та  $\beta$ -екзотоксин *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB-7186 і бластоспори *Beauveria bassiana* IMB-F-100043, залишки середовища після культивування, наповнювач КМЦ, консерванти гліцерин та KCl, має темно-коричневий колір та в'язку консистенцію [5]. Недоліком цієї форми є обмежений термін зберігання (не більше 6 місяців), що пов'язано із загибеллю бластоспор *B. bassiana*, потреба у додатковому обладнанні (сепаратори, центрифуги) та додаткових енергозатратах для осадження ентомоцидних компонентів препарату.

В основу корисної моделі поставлена задача створення рідкого концентрату біопрепарату зі збільшеним терміном зберігання без використання додаткового обладнання для осадження.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання рідкого концентрату комплексного інсектоакарицидного біопрепарату "Бактофунгін-LS", який включає сумісне вирощування *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB-7186 і *Beauveria bassiana* IMB-F-100043 на поживному середовищі до рівня споруючості бактерій 95-98 % з титром не менше  $2,5 \times 10^9$  спор на 1 мл та максимального накопичення бластоспор, додавання до культуральної рідини 20 % розчину  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 5 % для осадження ентомоцидних компонентів, згідно з корисною моделлю, суміш перемішують та відстоюють 12-18 годин при температурі 20-24 °C, після чого верхній прозорий шар рідини видаляють декантацією, а нижній шар темно-коричневого кольору переносять у ємності для зберігання, додаючи 2-3 % карбоксиметилцелюлози (КМЦ) та 8-10 % гліцерину.

Рідка концентрована форма містить спорокристалічний комплекс та  $\beta$ -екзотоксин *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB-7186 і бластоспори *B. bassiana* IMB-F-100043, залишки середовища після культивування, прилипач КМЦ, консерванти гліцерин та  $\text{CaCl}_2$ , має темно-коричневий колір.

Приклад. Для одержання рідкого концентрату біопрепарату "Бактофунгін-LS" пропонується глибинний спосіб вирощування обох мікроорганізмів на ферментаційному середовищі наступного складу (г/л):

кукурудзяний екстракт	13
зелена патока	15
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,51
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2,32
гумат	4,4
pH=7,0.	

Середовище стерилізують автоклавуванням при 112 °C 30 хвилин.

Гумат готують на 0,01 н розчині NaOH, стерилізують в автоклаві при 121 °C 40 хвилин.

Для отримання маточних культур використовують ферментаційне середовище без гумату, *B. thuringiensis* вирощують протягом 48 годин, *B. bassiana* - протягом 4-5 діб. Засів здійснюють ендоспорами *B. thuringiensis* і бластоспорами *B. bassiana* в кількості 2 % від об'єму середовища, що в сумі складає 2-10 спор/мл. Співвідношення спор бактерій *B. thuringiensis* і бластоспор грибів *B. bassiana* у посівному матеріалі 1:1. Культивування здійснюють у глибинних умовах на круговій качалці (200 об/хв.) у склянках ємністю 3000 мл з об'ємом середовища 900 мл, при  $t=28$  °C протягом 3-4 діб.

Концентрацію ендоспор *B. thuringiensis* у культуральній рідині визначають методом серійних розведень з послідовним висівом на МПА. Концентрацію бластоспор *B. bassiana* визначають методом серійних розведень з послідовним висівом на МПА з 2 % глюкози, до якого додається антибіотик стрептоміцин для пригнічення росту бактерій. Паралельно підраховують кількість бластоспор у камері Горяєва.

Продуктивність сумісної культури через 4 доби вирощування становить  $(2,5 \pm 0,2) \times 10^9$  КУО/мл *B. thuringiensis* і  $(1,0 \pm 0,4) \times 10^8$  КУО/мл *B. bassiana*. Для осадження ентомоцидних компонентів до культуральної рідини додають 20 %  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 5 %, суміш перемішують та відстоюють 12-18 годин при температурі 20-24 °С, після чого верхній прозорий шар рідини видаляють декантацією, а нижній шар темно-коричневого кольору переносять у ємності для зберігання. Титр одержаного концентрату становить  $(1,5 \pm 0,1) \times 10^{10}$  КУО/мл *B. thuringiensis* і  $(5,0 \pm 0,2) \times 10^8$  КУО/мл *B. bassiana*.

Найкращими добавками для зберігання рідкого концентрату є 2-3 % КМЦ та 8-10 % гліцерину (таблиця 1). Термін зберігання рідкого концентрату з цими добавками становить не менше 21 місяця при температурі 4-6 °С.

Перевірку інсектицидної активності на тест-об'єкті личинках II-III віку листокрутки всеїдної здійснюють у лабораторних умовах. Листки липи, які слугують кормом для цих комах, зволожують 3 % розчином рідкого концентрату та годують комах. Контрольну групу комах годують листям, зволженим стерильною водопровідною водою.

Таблиця 1

Вплив різних концентрацій добавок на збереження життєздатності *B. thuringiensis* і *B. bassiana*

Добавки до рідкого концентрату	Кількість КУО/мл через 21 місяць зберігання	
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. bassiana</i>
1 % КМЦ, 5 % гліцерину	$(9,3 \pm 0,6) \times 10^{11}$	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^5$
2 % КМЦ, 8 % гліцерину	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^{12}$	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^7$
3 % КМЦ, 10 % гліцерину	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{12}$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^7$
4 % КМЦ, 14 % гліцерину	$(8,5 \pm 0,4) \times 10^{11}$	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^6$
2 % КМЦ	$(6,8 \pm 0,3) \times 10^{11}$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^5$
3 % КМЦ	$(8,0 \pm 0,1) \times 10^{11}$	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^5$
Без добавок	$(7,5 \pm 0,2) \times 10^{11}$	$(4,3 \pm 0,2) \times 10^5$

Підрахунок загиблених комах здійснюють щодобово упродовж 7 діб. Інсектицидну активність препарату виражають у процентах смертності (С) личинок, з поправкою на контроль, за формулою Аббота [6].

$$C = \frac{M_o - M_k}{100 - M_k} \times 100, \text{ де}$$

$M_o$  - % загибелі особин у досліді (середньоарифметичне),

$M_k$  - % загибелі у контролі (середньоарифметичне).

В таблиці 2 наведені дані щодо концентрації колонієутворюючих одиниць в 1 мл (г) рідкого концентрату та пасти (найближчий аналог).

Таблиця 2

Порівняння якості зберігання рідкого концентрату та пастоподібної форми біопрепарату "Бактофунгін-LS"

Форма біопрепарату	Термін зберігання, місяці	Концентрація КУО/мл (г) на початку зберігання		Концентрація КУО/мл (г) в кінці зберігання	
		<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. bassiana</i>
Рідкий концентрат	21	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{10}$	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^8$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^{12}$	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^7$
Пастоподібна (найближчий аналог)	6	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{10}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^9$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{10}$	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^6$

Інсектицидна активність рідкого концентрату та пастоподібної форми біопрепарату наведені в таблиці 3. Отримані результати показують, що запропонована нова форма біопрепарату значно краще зберігається (21 місяць проти 6), містить більшу концентрацію ентомоцидних компонентів та вищу інсектицидну активність наприкінці терміну зберігання.

Таблиця 3

Порівняння інсектицидної активності  
рідкого концентрату та пастоподібної форми біопрепарату "Бактофунгін-LS"

Форма біопрепарату	Термін зберігання, місяці	Смертність личинок листокрутки всеїдної, % *	
		На початку зберігання	В кінці зберігання
Рідкий концентрат	21	94,3±2,1	78,0±2,5
Пастоподібна (найближчий аналог)	6	96,5±1,7	73,4±4,3

Примітки: \* - інсектицидна активність у лабораторних умовах при застосуванні 3 % розчинів біопрепарату.

Біологічна ефективність розробленої форми при застосуванні у польових умовах не поступається аналогу, рівень смертності лускокрилих шкідників на яблуневих деревах маточного саду складає 80-93 % при нормі витрати 3-4 л/га.

Перевагами розробленого способу виготовлення препарату є значно збільшений термін зберігання, економія електроенергії, робочих ресурсів та виробничого часу, можливість виготовлення препарату на виробництві за відсутності додаткового обладнання (сепаратори, центрифуги), легкість приготування робочих розчинів.

Джерела інформації:

1. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* I Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. - С.-Петербург, Пушкин: Научное издание "Инновационный центр защиты растений", 2009. - 252 с.

2. Abid Hussain, Ming-Yi Tian, Sohail Ahmed, Muhammad Shahid Current status of entomopathogenic fungi as mycoinsecticides and their inexpensive development in liquid cultures. In Zoology, ed. by Maria-Dolores Garcia. - In Tech, Chine, 2012. - 206 p.

3. Kabaluk, J. Todd, Antonet M. Svircev, Mark. S. Goettel, and Stephanie G. Woo (ed.). The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. IOBC Global., 2010. - 99 p.

4. Биорегуляция микробно-растительных систем: Монография /Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреюк Е.И. и др.; Под общей ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. - К.: Ничлава, 2010. - 464 с.

5. Патент на корисну модель № 90437, Україна, А01N 63/00, С12N 1/20, С12N 1/14, С12R 1/07, С12R 1/645. Спосіб отримання пастоподібної форми інсектоакарицидного препарату Бактофунгін - LS. /А.І. Вінніков, Н.В. Черевач, О.А. Дрегваль; заявник і патентовласник Дніпропетровський національний ун-т.; заявл. 30.12.2013; Опубл. 26.05.2014, Бюл. № 10.

6. Бровдій В.М., Гулий В.В., Федоренко В.П. Біологічний захист рослин. - К.: Світ, 2004. - 352 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання рідкого концентрату інсектоакарицидного біопрепарату "Бактофунгін-LS", який включає сумісне вирощування *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB-7186 та *Beauveria bassiana* IMB-F-100043 на поживному середовищі до рівня споруляції бактерій 95-98 % з титром не менше  $2,5 \times 10^9$  спор на 1 мл та максимального накопичення бластоспор, додавання до культуральної рідини 20 % розчину  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 5 % для осадження ентомоцидних компонентів, який **відрізняється** тим, що суміш перемішують та відстоюють 12-18 годин при температурі 20-24 °С, після чого верхній прозорий шар рідини видаляють декантацією, а нижній шар темно-коричневого кольору переносять у ємності для зберігання, додаючи 2-3 % карбоксиметилцелюлози та 8-10 % гліцерину.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601