

ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПЕСТИЦИДІВ  
НА ОСНОВІ *BACILLUS THURINGIENSIS*

**Безусов А. Т.<sup>1</sup>**, д.т.н., професор,  
<https://orcid.org/0000-0002-0690-2406>

**Крутякова В. І.<sup>2</sup>**, директорка,  
<https://orcid.org/0000-0002-6578-952X>

**Мирошніченко О.М.<sup>1</sup>**, к.т.н., доцент,  
<https://orcid.org/0000-0002-7376-8008>

**Доценко Н.В.<sup>1</sup>**, к.т.н., доцент  
<https://orcid.org/0000-0001-6191-965X>

**Нікітчина Т.І.<sup>1</sup>**, к.т.н., доцент  
<https://orcid.org/0000-0002-1034-3483>

<sup>1</sup>Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса, Україна

<sup>2</sup>Інженерно-технологічний інститут «Біотехніка» НААН України, с.м.т.Хлібодарське,  
Україна

<https://doi.org/10.31073/foodresources2021-16-03>

**Предмет дослідження.** Основу біопестицидів складають живі культури спеціально відібраних корисних мікроорганізмів з контрольованими властивостями. Вони володіють вираженою фітопротекторною і стимулюючою дією, завдяки чому забезпечують ефективну профілактику і захист рослин від хвороб. Отриманий біопрепарат підвищує продуктивність, поліпшує якість і структуру врожаю, не накопичуються в рослинах, що дозволяє отримувати екологічно чисту сільськогосподарську продукцію і не завдає шкоди навколишньому середовищу. Серед великого числа бактерій, в якості джерела мікробіологічного інсектициду є *Bacillus thuringiensis*, що інфікує лускокрилих шкідників і призводить до їх загибелі. Препарати на основі цього штаму ефективні при використанні у малих концентраціях розчинів. Штам *Bacillus thuringiensis* виробляє декілька токсинів з інсектицидною дією, серед них  $\beta$ -екзотоксин і  $\delta$ -ендотоксин. Токсична дія проявляється і призводить до паралічу кишкового тракту паразитів. Препарати  $\beta$ -екзотоксин і  $\delta$ -ендотоксин отримують шляхом культивування бактерій *Bacillus thuringiensis* в рідкому середовищі. В науковій роботі запропоновано метод промислового виробництва з використанням побічних продуктів переробки рослинної сировини, що робить економічно доцільним використання таких субстратів. **Мета дослідження** – Розробка технології, рецептури поживного середовища, параметрів процесу для культивування бактерій роду *Bacillus thuringiensis* та отримання культуральної рідини, яка містить речовини класу біопестицидів. **Методи.** Стандартні та загальноприйняті методи досліджень біопродуктів у біотехнології. Утворення біоінсектицидів встановлювали методами гідролізу з наступним визначенням складової  $\beta$ -екзотоксину – рибози, утворення восьмигранних кристалів екзотоксину – мікроскопічним методом. **Результати досліджень.** Розроблене 3 варіанта складу поживних середовищ до складу яких входять дріжджово-поліцукровий комплекс: кукурудзяна мука, кукурудзяна олія, дріжджовий автолізат. Досліджено параметри процесу культивування бактерій. Кінцевим продуктом є паста або порошок з титром  $35 \cdot 10^9$  спор в 1 г біопродукту. **Сфера застосування результатів дослідження.** Мікробіопрепарати на основі *Bacillus thuringiensis* високоспецифічні і діють тільки на личинок комах з класів *Lepidoptera* і *Diptera*. Отриманий біопестицид може бути застосовано проти шкідників широкого асортименту овочевих і плодових культур.

*Ключові слова:* біопестициди, поживне середовище, режими культивування, *Bacillus thuringiensis*, активна кислотність

## TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF BIOPESTICIDES BASED ON *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Anatolii Bezusov*<sup>1</sup>, D-r of Sciences, Technics, Professor,  
<https://orcid.org/0000-0002-0690-2406>

*Valentyna Krutiakova*<sup>2</sup>, Director,  
<https://orcid.org/0000-0002-6578-952X>

*Olena Myroshnichenko*<sup>1</sup>, PhD, Technics, Associate Professor,  
<https://orcid.org/0000-0002-7376-8008>

*Nataliia Dotsenko*<sup>1</sup>, PhD, Technics, Associate Professor,  
<https://orcid.org/0000-0001-6191-965X>

*Tetiana Nikitchina*<sup>1</sup>, PhD, Technics, Associate Professor,  
<https://orcid.org/0000-0002-1034-3483>

<sup>1</sup>Odessa National Academy of Food Technologies, Odessa, Ukraine

<sup>2</sup>Engineering and Technological Institute "Biotechnology" NAAS of Ukraine, Khlivobodarskoe, Ukraine

<https://doi.org/10.31073/foodresources2021-16-03>

**Subject of research.** *Biopesticides are based on live cultures of specially selected beneficial microorganisms with controlled properties. They have a pronounced phytoprotective and stimulating effect, thus providing effective prevention and protection of plants from diseases. The obtained biological product increases productivity, improves the quality and structure of the crop, does not accumulate in plants, which allows to obtain environmentally friendly agricultural products and does not harm the environment. Among the large number of bacteria, as a source of microbiological insecticide is Bacillus thuringiensis, which infects lepidopteran pests and leads to their death. Preparations based on this strain are effective when used in low concentrations of solutions. The Bacillus thuringiensis strain produces several toxins with insecticidal action, including  $\beta$ -exotoxin and  $\delta$ -endotoxin. Toxic effect is manifested and leads to paralysis of the intestinal tract of parasites. Preparations  $\beta$ -exotoxin and  $\delta$ -endotoxin are obtained by culturing Bacillus thuringiensis bacteria in a liquid medium. The scientific work proposes a method of industrial production using by-products of vegetable raw materials, which makes it economically feasible to use such substrates. The purpose of the study is the development of technology, formulation of nutrient medium, process parameters for the cultivation of bacteria of the genus Bacillus thuringiensis and obtaining a culture fluid containing substances of the class of biopesticides. Methods. Standard and generally accepted methods of research of bioproducts in biotechnology. The formation of bioinsecticides was established by hydrolysis methods, followed by determination of the component of  $\beta$ -exotoxin – ribose, the formation of octagonal crystals of exotoxin – by microscopic method. Research results. Three variants of nutrient media, which include yeast-polysaccharide complex: corn flour, corn oil, yeast autolysate were developed. The parameters of the bacterial cultivation process were studied. The final product is a paste or powder with a titer of  $35 \cdot 10^9$  spores in 1 g of the bioproduct. Scope of research results. Microbiological preparations based on Bacillus thuringiensis are highly specific and act only on insect larvae from the classes Lepidoptera and Diptera. The resulting biopesticide can be used against pests of a wide range of vegetable and fruit crops.*

**Key words:** *biopesticides, nutrient medium, cultivation, Bacillus thuringiensis, active acidity*

**Постановка проблеми.** В останні роки відкриття в області біотехнології намагаються змінити сільськогосподарську галузь, щоб впроваджувати більш екологічні методи вирощування рослинної продукції. Активне застосування пестицидів і мінеральних добрив незворотно впливає на хімічний склад і екосистему біоценозів. Благополуччя сільськогосподарської галузі багато в чому залежить від можливості виростити та зберегти урожай.

Рослини, які є основою сільськогосподарських і лісових екосистем, піддаються постійним атакам комах-фітофагів і фітопатогенних мікроорганізмів. Для захисту рослин використовують різні засоби і методи, з яких найбільш поширеними є хімічні пестициди. Незважаючи на високу ефективність дії на шкідників врожаю, хімічні пестициди одночасно впливають на корисні об'єкти, викликають розвиток резистентності у фітофагів і фітопатогенів, що призводить до небажаного збільшення норм витрат пестицидів. Поступове накопичення синтетичних хімічних засобів захисту рослин в ґрунті, водоймах, рослинній продукції негативно впливає на здоров'я людини і тварин. Екологічно безпечною альтернативою хімічним пестицидам можуть бути біологічні препарати, створені на основі природних мікробних агентів регуляції чисельності фітофагів і фітопатогенів.

Основу біопестицидів складають живі культури спеціально відібраних корисних мікроорганізмів з контрольованими властивостями. Вони володіють вираженою фітопротекторною і стимулюючою дією, завдяки чому забезпечують ефективну профілактику і захист рослин від хвороб, підвищують продуктивність, поліпшують якість і структуру врожаю.

Біопестициди вибірково інгібують розвиток шкідників та збудників хвороб, і, завдяки високій специфічності дії, не завдають шкоди навколишньому середовищу, тваринам і людині, сприяють збереженню природного балансу. Як правило, в основі біологічних засобів захисту рослин використовують сапрофітні мікроорганізми, що мешкають в ґрунті. Тому при їх інтродукції в агроценози, в складі біопрепаратів, ніяких сторонніх речовин у навколишнє середовище не потрапляє. Вони не накопичуються в рослинах, що в сукупності дозволяє отримувати екологічно чисту сільськогосподарську продукцію. До того ж, у збудників хвороб не виникає до цих препаратів звикання, і використовувати їх можна тривалий час.

В цілому це безпечні для людини і біосфери засоби захисту сільськогосподарських рослин від хвороб і шкідників, здатні регулювати чисельність шкідливих організмів на екологічно безпечному рівні.

Ключовими питаннями біотехнології мікробних засобів захисту рослин від шкідників і хвороб є: вибір найбільш придатних агентів біологічної регуляції чисельності фітофагів і фітопатогенів, механізм їх взаємодії з шкідливими видами і навколишнім середовищем, способи виробництва і форма препаратів, підвищення ефективності використання в сільському і лісовому господарстві. Основою цих препаратів є як живі культури мікроорганізмів, так і продукти їх метаболізму (токсини, ферменти та ін.) [1].

З ентомопатогенних біопрепаратів найбільш поширені бактеріальні – на основі спор і токсинів ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt). Розроблено біопрепарат «Ентобактерин» на основі *Btsubsp. galleriae*, виділеної з гусені бджолоїної вогнівки. Пізніше, в якості господарів різних підвидів *Bacillus thuringiensis*, було виявлено комахи не тільки загону лускокрилих, але і двокрилих, і жуків, що призвело до поділу бактерії на патоваріанти А, В, С та ін. При цьому кожен патоваріант, активний тільки для певного кола комах, відрізнявся за формою білкового кристала  $\delta$ -ендотоксину, як основної діючої речовини. Відомо про застосування біопрепаратів «Лепідоцид» на основі *Btsubsp. kurstaki* і «Бітоксисабацилін» (БТБ) на основі *Btsubsp. thuringiensis*, які використовуються в даний час в сільському і лісовому господарствах. Відповідно до назви БТБ містить поряд з білковим ендотоксином  $\delta$ -екзотоксин. Вміст двох мікробних токсинів в препараті розширює спектр його дії. Як основа грибних біопрепаратів важливі представники

ентомопатогенних грибів царства Fungi [2-4]. Більшість недосконалих грибів, паразитів членистоногих, відноситься до родів *Beauveria*, *Isaria* (колишній рід *Paecilomyces*), *Metarhizium*, *Lecanicillium* (раніше *Verticillium*). На основі цих грибів створено препарати «Боверин» [5] і «Вертіцілін» [6], ефективні в захисті тепличних культур від шкідників. До категорії мікробних засобів захисту рослин відносять також групу вірусних ентмопатогенних препаратів. Їх основу складають бакуловіруси, як високоспецифічні природні регулятори чисельності комах. Рід *Baculovirus* представлений групами А і В. До групи А входять віруси ядерного поліедроза (ВЯП) з ДНК-паличкоподібним віріоном. До групи В входять віруси – збудники гранульоза (ВГ), що відрізняються від ВЯП тим, що одиночний віріон знаходиться в білковій капсулі (гранулі). Виділено та ідентифіковано бакуловіруси ряду комах, у тому числі ВЯП капустиної совки, непарного шовкопряду, рудого соснового пильщика (РСП), а також ВГ яблуневої плодожерки. На їх основі розроблені препарати під загальною назвою «Вірінії» («Вірін-КС» проти капустиної совки, «Вірін-Діпріон» проти РСП, «Вірін-ГЯП» проти яблуневої плодожерки та ін.) [7, 8].

Важлива роль в придушенні розвитку хвороб рослин належить грибам-антагоністам. Гриби мають широкий спектр антагоністичних властивостей – гіперпаразитизм, конкуренція за живильний субстрат, продукують антибіотики та інші речовини, які пригнічують життєдіяльність фітопатогенів. Більшість грибів, які використовують в біотехнології засобів захисту рослин від хвороб, відносяться до недосконалих грибів. Біопрепарат проти хвороб рослин створено на основі гриба *Trichoderma viride* (*lignorum*). Гриби цього роду можуть пригнічувати розвиток фітопатогенів шляхом прямого паразитування за рахунок продукування ряду антибіотиків (вірідін, глітоксинта ін.) [9, 10].

Конкуренцію грибним препаратам, які контролюють чисельність збудників хвороб рослин, складають бактеріальні. В основі використання бактеріальних препаратів проти хвороб рослин також лежить механізм антибіоза, який регулює взаємовідносини мікроорганізмів в природі. Джерелом отримання штамів бактерій-антагоністів служать, як правило, супресивні ґрунти. В даний час бактеріальні препарати проти хвороб рослин більш поширені, ніж грибні. Їх основою є бактерії двох родів – *Pseudomonas* та *Bacillus*. Сапрофітні псевдомонади, які інфікують ризосферу, є природними регуляторами фітопатогенних мікроорганізмів: *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens* та інші види. Дані неспорують бактерії характеризуються швидким ростом, продукують антибіотики, бактеріюцини і сидерофори, а також ростові стимулятори. Ці властивості обумовлюють захисний ефект псевдомонад від фітопатогенів, а також стимулюють ріст рослин. Серед антибіотиків, що продукуються псевдомонадами, виявлено феназин-1-карбонову кислоту, похідні флороглюцину, пірролітрінта ін. Синтезовані псевдомонадамідерофори утворюють стабільні комплекси, які пов'язують іони тривалентного заліза в ґрунті, сидерофори позбавляють багато видів фітопатогенних грибів необхідного елемента живлення, що призводить до зупинки їхнього розвитку.

Бактерії *B. subtilis* є найбільш продуктивними з роду *Bacillus* для синтезу антибіотиків, які пригнічують ріст фітопатогенних мікроорганізмів. Виділено різні штами культури цих бактерій, що призвело до створення асортименту біопрепаратів на основі *B. subtilis* («Бактофіт», «Фітоспорин», «Алірін-Б» і «Гамаір»). Прикладом препарату, на основі спеціалізованого гіперпаразиту фітопатогенних грибів, може служити «Ампеломіцин», який досить широко використовувався в тепличних господарствах. Основа цього біологічного фунгіциду – пікнідіальний гриб *Ampelomyces quisqualis*, в природних умовах паразитує на міцелії, конідії і клейстотеції борошнисто-росяних грибів – *Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp., *Podosphaera* spp. Важливий підбір оптимального живильного середовища для культивування біологічних агентів. Культивування в рідкому поживному середовищі (глибинний спосіб) використовують, як правило, для отримання бактеріальних препаратів, і в певній мірі грибних. Грибні препарати отримують не тільки глибинним, але і поверхневим, а також глибинно-поверховим культивуванням.

Це пов'язано з тим, що бластоспори грибів, які одержуються в глибинній культурі, не настільки життєздатні і активні, як конідії, утворені грибами на поверхні живильного середовища. В останні роки більш популярним став спосіб поверхневого культивування грибів на сипучих субстратах. Головною особливістю виробництва вірусних ентомопатогенних препаратів є накопичення вірусної біомаси на живих комах з подальшим витяганням бакуловірусів із загиблих особин, що більш трудомістке, але економічно вигідніше через малі норми витрати вірусних інсектицидів.

Технологія розмноження бакуловірусів на культурі клітин комах вивчалася починаючи з другої половини ХХ ст., але практичного втілення ця технологія не отримала через економічну недоцільність. Зазначені особливості отримання біопрепаратів визначають можливість їх виробництва в умовах біолабораторій та біотехнологічних виробництв. Концепція малотоннажного виробництва, запропонована близько 25 років, зіграла значну роль в розвитку біотехнології мікробних засобів захисту рослин. У той час було розроблено ряд технологічних регламентів біопрепаратів з прискореною реєстрацією для виробництва в умовах біолабораторій, що призвело до посилення використання біопрепаратів в захисті рослин. Одночасно було розроблено і запропоновано спеціальні ферментатори для малотоннажних виробництв в біолабораторіях [11].

У виробництві препаратів важливим завершальним етапом є приготування препаративної форми (формуляція чинного початку). Препаративна форма тісно пов'язана з технологією застосування біопрепаратів і з терміном їх зберігання. Від того, наскільки вона буде сприяти прояву потенціалу штаму-продуцента, залежить і ефективність мікробного препарату. Невід'ємна частина технологічного процесу отримання біопрепаратів – їх стандартизація та оцінка якості. Без цього неможливо їх раціональне використання в біологічному захисті рослин. Хоча головною перевагою біопрепаратів є високий ступінь екологічної безпеки, їх ефективність не завжди порівняна з ефективністю хімічних пестицидів в зв'язку з більшою залежністю від температури, вологості, інсоляції.

На міжнародному ринку компанія Greenlight Biosciences (Массачусетс, США) пропонує біопестициди, спрямовані на певний вид комах-шкідників і не чинять шкоду іншим видам. Компанія застосовує технологію на основі РНК, суть якої в тимчасовому придушенні генів, що відповідають за розвиток комах, наприклад формування крила. При цьому не відбувається генетичних модифікацій організму, і зміни не передаються наступним поколінням. Винахід компанії буде ефективним для застосування на рослинах, в запиленні яких беруть участь комахи (бджоли). Перші дослідження було спрямовано на розробку засобу боротьби з колорадським жуком. У 2019 компанія залучила \$ 50 млн інвестицій і вже планує виводити свої перші продукти на ринок.

Компанія AgBiome запропонувала інноваційні біологічні препарати для захисту рослин. Компанія займається секвенуванням геномів мікробів з метою створення найбільш ефективних препаратів для боротьби з шкідниками і вирощування сільськогосподарських культур. У 2016 році компанія випустила перші фунгіциди - Marazo, Mazolin, Miresa, Xiphosin; інсектицид - Azomar. Список продуктів компанії зростає. Сьогодні – це пестициди (Perissim, Lektivar 40SC), біологічні препарати (Howler, Zio) [12].

Крім антибіотиків, які використовують в якості препаратів захисту рослин від хвороб, ефективну дію проявляють бактеріальні препарати. Із всіх ентомопатогенних бактерій найбільш часто використовують грам-позитивні бактерії *Bacillus thuringiensis*.

Сьогодні до 90% комерційних інсектицидів - препарати на основі цього патогена. Готові форми цих препаратів є споровокристалічний комплекс, що містить живі суперечки Ентомопатогенні мікроорганізми і кристалічний ендотоксин білкової природи, а в ряді препаратів міститься також термостабільний екзотоксин.

Бактерії *Bacillus thuringiensis* продукують специфічні як кристальні токсини, які володіють великою ентомоцидною активністю. В процесі споруляції всередині клітин за допомогою звичайної мікроскопії виявляються живі препарати бактерій, часто звані

параспоральними включеннями або ендотоксинами. Після закінчення процесу спороутворення токсини у вільному вигляді виділяються в середу. Форма кристалів - ромбовидна (тетрагональна). Величина кристалів залежить від виду культур бактерій і варіюється в інтервалі 1-3 мкм. Ентомоцідні кристали являють собою речовини білкової природи, до складу яких входять 18 амінокислот. Цей білок - термолабільний, при 60°C він руйнується. Кристали можуть проявляти токсичну дію для лускокрилих комах тільки при пероральному введенні, викликаючи параліч середньої кишки гусениць. Для загибелі комах достатня дуже мала концентрація розчинів.

Крім кристалів токсинів, деякі бактерії *Bacillus thuringiensis* виділяють в навколишнє середовище ентомоцідні речовини, розчинні у воді. З них найбільший інтерес викликає термостабільний токсин (бета-екзотоксин). Ця речовина, на відміну від ентомоцідних кристалів, що не піддається руйнуванню навіть при температурі 100-120°C. Термостабільний екзотоксин має менш специфічне ентомоцідне дію - він проявляє активність по відношенню до різних видів комах - совки, комарі, мухи і деякі інші шкідливі комахи. Мікробіопрепаратів на основі *Bacillus thuringiensis* високоспецифічні і діють тільки на личинок комах з класів *Lepidoptera* і *Diptera*.

Особливістю цих біопрепаратів є прояв ефективної дії тільки при високій харчової активності шкідників, що спостерігається при температурі не нижче 16°C. бактеріальні препарати при впливі сонячної радіації, температури і вологості швидко інактивуються в природному середовищі.

Серед токсичних продуктів, що виробляються цими бактеріями, є чотири компоненти.

Термостабільний токсин ( $\beta$ -токсин), якій складається з рівних співвідношень аденіна, рибози і фосфора.  $\beta$ -екзотоксин – це нуклеотид, зв'язаний через рибозу, глюкозу з алослизовою кислотою.

В порівнянні з іншими токсинами, які продукуються *Bacillus thuringiensis*,  $\beta$ -екзотоксин є мутагенним, який вражає генетичний апарат. Спори *Bacillus thuringiensis* утворюють токсичні продукти, спори, кристали, які використовують мікроорганізми патогенних препаратів.

Фосфоліпаза С ( $\alpha$ -екзотоксин) утворюється в клітинах бактерій, які зростають. Токсична дія ферменту пов'язана з розпадом фосфоліпідів тканин комах, що призводить до їх загибелі.

Екзотоксин міститься у культуральній рідині *Bacillus thuringiensis*, яка представлена у вигляді порошку з вмістом 3,3% екзотоксину.

Таксобактерин – отримують на основі спор і кристалів у вигляді порошку з вмістом 30 млрд.спор на 1г.

Параспоральний кристалічний ендотоксин ( $\sigma$ -ендотоксин) утворюється на останній стадії спороутворення у формі восьмигранних кристалів. Вони не розчинні в органічних розчинниках, добре розчиняються в лужних середовищах при рН=11,5. При нагріванні при 100°C впродовж 40хв втрачають токсичні властивості.

Здатність бактерій групи *Bacillus thuringiensis* утворювати токсичні продукти, спори та кристали, які використовують при виробництві великої кількості різних ентомопатогенних препаратів.

В світі відомо понад 20 промислових форм препаратів, в основі яких містяться різні різновидності *Bacillus thuringiensis*: «Ендобактерин», «Дендробацилін», «Бітоксібактерин», «Гомелін», «Лепідоцид», «Бактокуліцид», «Діпел», «Бактосилін».

Як і більшість біоінсектицидів, бактеріальні препарати, які отриманні у результаті культивування бактерій штаму *Bacillus thuringiensis*, в рекомендованих дозах безпечні для корисних комах; малотоксичні для птахів, теплокровних тварин, риб і людини [13].

Захист культурних рослин від шкідників з використанням мікробіологічних процесів та формування екологічно чистих продуктів, в наш час, стає особливо актуальним.

**Матеріали та методи.** В якості продуцента біопестициду використовували штамм *Bacillus thuringiensis*.

Компоненти субстратів: кукурудзяний екстракт, кукурудзяне борошно, дріжджовий автолізат, глюкоза технічна, NaCl, соняшниковий фуз, вівсяні висівки.

Обладнання: ваги, біореактор лабораторний, центрифуга, термометр ртутний, рН-метр, апарат для сушіння.

Для вирощування бактерій використовували підготовку поживного середовища та умови для глибинного методу культивування - ГОСТ 26670.

При культивуванні визначали показник активної кислотності рН - ISO 787-9-81.

Розділення культуральної рідини - методом центрифугування ДСТУ 4008-2001

Визначали продукти гідролізу в біопрепараті:

- β-токсин - методом з діфениламіном на вміст рибози [14];
- ендотоксину формі восьмигранних кристалів - метод [15]
- титр *Bacillus thuringiensis* у біопрепаратах - ISO 7932:2004

**Результати та обговорення.** Метою дослідної роботи було розробка технології виробництва біопрепаратів на основі *Bacillus thuringiensis*.

В дослідній роботі в якості продуцента було обрано *Bacillus thuringiensis*. Робота саме з цими бактеріями визначається легкістю розмноження, вони спонтанно спорюють на багатьох харчових середовищах. При завершенні вегетативного росту утворюють спори і парасполярне тіло – кристалічний ендотоксин. Кристали складаються із білка, пов'язаного з кремнієм, та за хімічним складом близьким до білка оболонки спор.

Вплив дії кристалів на комах пов'язують із присутністю кишкових протеаз, які здійснюють гідроліз кристалів *in vivo*.

Для вирощування бактерій використовували глибинний метод культивування, який полягає у використанні рідких поживних середовищ. Він технічно більш досконалий, чим поверхневий, так як легко піддається механізації і автоматизації, і перехід до більших масштабів виробництва здійснюється значно легше і простіше.

Дослідні бактерії відрізнялись високою стійкістю при проведенні технологічних операцій: центрифугування, вакуумування, сушіння.

Серед всіх мікробних патогенів, які випускаються, бактеріальні препарати найбільш поширені. Всі бактеріальні ентомопатогенні препарати отримують по технології, яка включає на стадії глибинного способу отримання мікроорганізмів: вирощування посівного матеріалу в лабораторії і в посівному апараті, культивування у ферментері, концентрування культуральної рідини, сушіння та стандартизація готової продукції.

На рис.1 наведено розроблену технологічну схему виробництва бактеріальних ентомопатогенних препаратів.

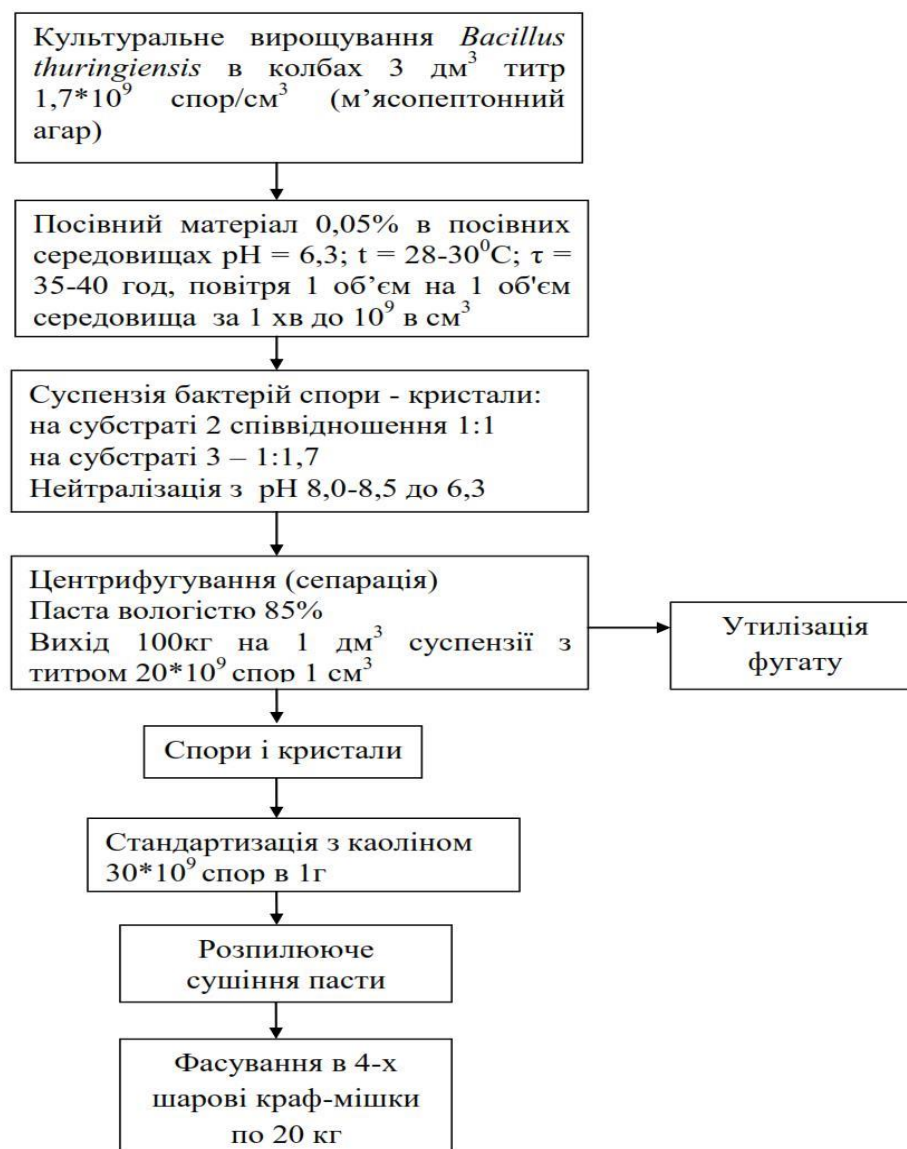
Посівний матеріал отримують на стадіях вирощування культури в колбах на 3 дм<sup>3</sup>, отриманим посівним матеріалу з титром не менш  $1,5 \cdot 10^9$  спор в 1 см<sup>3</sup>, в кількості 0,05 % від об'єму середовища засівають апарат і культивують при об'єміаерації 0,2 дм<sup>3</sup> на 1 дм<sup>3</sup> середовища за 1 хв. Температуру культивування підтримують у межах 20-30°C, тривалість процесу 35-40 год.

Наступною технологічною задачею було розроблення оптимального поживного середовища.

В якості субстратів досліджували три варіанти поживних середовищ, які склались з наступних інгредієнтів (в частинах):

- субстрат №1 - дріжджово-полісахаридне середовище: дріжджовий автолізат – 2-3; кукурудзяне борошно – 1,5; соняшниковий фуз-1 (комплекс фосфоліпідів);
- субстрат №2 – технічна глюкоза - 0,7; кукурудзяний екстракт – 4; NaCl – 0,2;
- субстрат №3 – кукурудзяний екстракт – 4; вівсяні висівки -2.

Оптимальні властивості для росту *Bacillus thuringiensis* було отримано на дріжджово-полісахаридному середовищі, субстрат №1, де використовували дріжджовий автолізат, кукурудзяне борошно і побічний продукт переробки соняшника - фуз.



**Рис. 1. Технологічна схема виробництва бактеріальних ентомопатогенних препаратів**

При культивуванні змінюється рН середовища: на початку процесу культивування рН складає 6,2-6,5, а наприкінці – 8,0-8,5. Високі значення рН середовища призводять до руйнування кристалів параспоруального кристалічного ендотоксину. Для попередження цього процесу, культуральну рідину нейтралізують до рН 6,0-6,2 при досягненні ступеню спорулізації 90-95 % і титру  $10^9$  в  $1\text{ см}^3$ .

Готову суспензію бактерій центрифугують і отримують пасту вологістю 85 % з виходом 100 кг в  $1\text{ м}^3$  культуральної рідини і титром  $20 \cdot 10^9$  спор в 1 г. Кінцевим продуктом є паста або порошок з титром  $35 \cdot 10^9$  спор в 1 г біопродукту. Для стабілізації пасту її змішують з карбометилцелюлозою або каоліном.

Для спрощення операцій транспортування та зберігання готового біопродукту можна використовувати процес видалення вологи із пасту. Пасту сушать на розпилюючій сушарці до вмісту вологи 10%, а потім фасують в полімерну герметичну тару.

**Висновки.** Аналіз літературних джерел показав, що одним із відомих засобів захисту рослин від шкідливих комах є бактерії *Bacillus thuringiensis*, які володіють багатьма позитивними властивостями: легко розмножуються на різних споживчих середовищах, утворюють спори і кристалічний ендотоксин та ферменти проти комах.



Розроблено технологічну схему виробництва біопестицидів на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Розроблено технологічні параметри процесу і визначено форми реалізації продукту. Дана технологія може бути реалізована на обладнанні дріжджового і бактеріального виробництва. Отриманий біопестицид може бути застосовано проти шкідників картоплі, томата, баклажана, перцю (колорадський жук), капусти та інших овочевих культур (капустяна міль, репная і капустяна білявки, вогнівки (гусениці 1-2 віку), капустяна совка), яблуні, сливи, абрикоси, черешні, груші та інших плодових дерев (американський білий метелик), плодова та яблунева молі (гусениці 1-3 віку), п'ядуна, златогузки, шовкопряди (гусениці 1-3 віку), листовійки весняної групи і інших.

### Бібліографія

1. Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2012. № 2 (18). С. 92–100. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tendentsii-razvitiya-biotehnologii-mikrobnyh-sredstv-zaschity-rasteniy-v-rossii/viewer>
2. Глухов В.В. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год, 2001. 736 с.
3. Воронина Э.Г. Энтомофторовые грибы и препараты эпизоотического и токсического действия. *Защита и карантин растений*. 1997. № 5. С. 12–13.
4. Лобанова Н.В., Ракшаина М.Ц., Штерншис М.В. и др. Производство и применение пириформина в защите овощей закрытого грунта от вредителей. Новосибирск. СО ВАСХНИЛ, 1989. 21 с.
5. Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Рахман А.М. и др. Инсектицидные свойства bacillus thuringiensis var. israelensis. *Сельскохозяйственная биология*. 2019. № 6 (54). С. 1267-1280. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1267rus
6. Прищепа Л., Станкявичене А., Снешкене В. Спектр активности Bacillus thuringiensis бактериальных препаратов против вредителей. *Miestų želdynų formavimas*. 2016. 1(13). С. 315–322. URL: [http://www.krastotvarka.vhost.lt/documents/2016\\_36.pdf](http://www.krastotvarka.vhost.lt/documents/2016_36.pdf)
7. Гулий В.В., Штерншис М.В., Колтунов Е.В. Основные итоги и перспективы разработки вирусологического метода борьбы с вредителями. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 1976. № 5. С. 36–43.
8. Орловская Е.В. Биологические аспекты использования энтомопатогенов для регуляции численности насекомых – вредителей леса. *Информационный бюллетень ВПС МОББ*. 2002. № 33. С. 141–146.
9. Тюльпанова В.А., Громовых Т.И., Малиновский А.Л. Биотехнология новых форм грибных фунгицидов для защиты растений. *Сибирский экологический журнал*. 1997. № 5. С. 495–500.
10. Ермолова В.П., Гришечкина С.Д., Нижников А.А. Активность энтомопатогенных штаммов-продуцентов Bacillus thuringiensis var. israelensis при разных методах хранения. *Сельскохозяйственная биология*. 2018. № 1 (53). С. 201-208. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.201rus. URL: <https://readera.org/142214119>
11. Лыдина М.А., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Технология изготовления и контроля лабораторной серии фагового биопрепарата bacillus pumilus (mesentericus). *Биотика*. 2015. 1(2). С. 8-12. URL: [https://journal-biotika.com/current-issues/2015-01/article\\_02.pdf](https://journal-biotika.com/current-issues/2015-01/article_02.pdf).
12. Горобей И.М., Калмыкова Г.В., Давыдова Н.В., Андреева И.В. Штаммы Bacillus thuringiensis с ростостимулирующей и фунгицидной активностью. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2018. 48(6). С. 5-12. DOI:10.26898/0370-8799-2018-6-1
13. Погозий И.Т., Яценко В.Г. Эффективность и безопасность бактериального препарата битоксибациллина против листогрызущих вредителей сада: Сборник научных

трудоу «Технология защиты сельско-хозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков». Киев, 1991. С.38.

14. Справочник химика 21. URL <https://chem21.info/info/1400683/>

15. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности. Учебное пособие: Томск. 2018, 125 с. URL <https://core.ac.uk/reader/287420250>

### References

1. Shternshis, M. (2012). Tendencii razvitiya biotekhnologii mikrobnih sredstv zashchity rastenij v Rossii. [Trends in the development of biotechnology of microbial plant protection products in Russia]. Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya. [Bulletin of Tomsk State University. Biology]. № 2 (18). P. 92–100. [in Russian].

2. Glupov V. (2001). Patogeny nasekomyh: strukturnye i funkcional'nye aspekty. [Insect pathogens: structural and functional aspects]. M.: Kruglyj god. 736 p. [in Russian].

3. Voronina E. (1997). Entomofitovye griby i preparaty epizooticheskogo i toksicheskogo dejstviya. [Entomophthora fungi and preparations of epizootic and toxic effects]. Zashchita i karantin rastenij. [Plant protection and quarantine]. №5. P. 12–13. [in Russian].

4. Lobanova N., Rakshaina M., Shternshis M. (1989). Proizvodstvo i primeneniye piriformina v zashchite ovoshchej zakrytogo grunta ot vreditel'ej. [Production and use of piriformin in the protection of greenhouse vegetables from pests]. SO VASKHNIL. Novosibirsk, 21 p. [in Russian].

5. Ermolova V., Grishechkina S., Rahman A. (2019). Insekticidnye svoystva bacillus thuringiensis var. israelensis. [Insecticidal properties of bacillus thuringiensis var. israelensis]. Sel'skohozyajstvennaya biologiya. [Agricultural biology]. № 6(54). P. 1267-1280. [in Russian]. doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1267rus

6. Prishchepa L., Stankyavichene A., Sneshkene V. (2016). Spektr aktivnosti Bacillus thuringiensis bakterial'nyh preparatov protiv vreditel'ej. [Spectrum of activity of Bacillus thuringiensis bacterial preparations against pests]. Miestų želdynų formavimas. 1(13). P. 315-322. [in Russian].

7. Gulij V., Shternshis M., Koltunov E. (1976). Osnovnye itogi i perspektivy razrabotki virusologicheskogo metoda bor'by s vreditelyami. [The main results and prospects for the development of a virological method of pest control. Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki. [Siberian Bulletin of Agricultural Science]. № 5. P. 36–43. [in Russian].

8. Orlovskaya E. (2020). Biologicheskie aspekty ispol'zovaniya entomopatogenov dlya regulyacii chislennosti nasekomyh – vreditel'ej lesa. [Biological aspects of the use of entomopathogens for the regulation of the number of insects - forest pests]. Informacionnyj byulleten' VPS MOBB. [UPU MOBB newsletter]. № 33. P. 141–146. [in Russian].

9. Tyul'panova V., Gromovyh T., Malinovskij A. (1997). Biotekhnologiya novyh form gribnyh fungicidov dlya zashchity rastenij. [Biotechnology of new forms of fungal fungicides for plant protection]. Sibirskij ekologicheskij zhurnal [Siberian ecological journal]. № 5. P. 495-500. [in Russian].

10. Ermolova V., Grishechkina S., Nizhnikov A. (2018). Aktivnost' entomopatogennyh shtammov-producentov Bacillus thuringiensis var. israelensis pri raznyh metodah hraneniya. [Activity of entomopathogenic producer strains of Bacillus thuringiensis var. israelensis with different storage methods]. Sel'skohozyajstvennaya biologiya. [Agricultural biology]. № 1 (53). P. 201-208. [in Russian]. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.201rus.

11. Lydina M., Feoktistova N., Vasil'ev D. (2015). Tekhnologiya izgotovleniya i kontrolya laboratornoj serii fagovogo biopreparata bacillus pumilus (mesentericus). [Manufacturing technology and control of laboratory batch of phage biological product bacillus pumilus (mesentericus)]. Biotika. [Biotics]. 1(2). P. 8-12. [in Russian].

12. Gorobej I., Kalmykova G., Davydova N., Andreeva I. (2018). Shtammy Bacillus thuringiensis s rostostimuliruyushcheji fungicidnoj aktivnost'yu. [Strains of Bacillus

thuringiensis with growth-stimulating and fungicidal activity]. Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki. [Siberian Bulletin of Agricultural Science]. 48(6): P. 5-12. [in Russian].

13. Pogosij I., Yacenko V. (1991). Effektivnost' i bezopasnost' bakterial'nogo preparata bitoksibacillina protiv listogryzushchih vreditel'ej sada. [The efficacy and safety of the bacterial preparation bitoxibacillin against leaf-gnawing garden pests]. Sbornik nauchnyh trudov «Tekhnologiya zashchity sel'sko-hozyajstvennyh kul'tur ot vreditel'ej, boleznej i sornyakov». [Collection of scientific papers "Technology of protection of agricultural crops from pests, diseases and weeds"]. Kiev, P.38. [in Russian].

14. Spravochnik himika 21. [Chemist's Handbook 21]. URL<https://chem21.info/info/1400683/> [in Russian].

15. Minaeva O., Akimova E., Zyubanova T., Tereshchenko N. (2018). Biopreparaty dlya zashchity rastenij: ocenka kachestva i effektivnosti: Uchebnoe posobie. [Biologicals for plant protection: assessment of quality and effectiveness: Tutorial]. Tomsk. 125 p. [in Russian].