



УДК 579.22.7; 632.9; 632.95

БИОКЕНБИД – НОВЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЗЕРНА ОТ АМБАРНЫХ ВРЕДИТЕЛЕЙ

*И.В. Чарыкова, И.Е. Парамонова, Н.И. Некрасова, Р.В. Матиева,
Н.А. Талжанов, Д.С. Балпанов*

biomedpreparat@bk.ru

ТОО «НАЦ «Биомедпрепарат», г. Степногорск

Разработан инсектицидный биопрепарат - «БиоКенБид – БМП, КС», на основе культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis*, предназначенный для защиты складских помещений и запасов зерна при хранении от комплекса амбарных вредителей. Препарат безопасен для человека, домашних и диких животных, а также полезной энтомофауны.

Приведены материалы исследований по условиям и режиму культивирования штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis*, биохимическим показателям, продуктивности и экзотоксинообразованию в процессе культивирования. Представлены результаты испытаний биологической эффективности опытной партии препарата на амбарном клеще и данные по разработке товарной формы.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, β -экзотоксин, δ -эндотоксин, штамм-продуцент, средства защиты растений (СЗР).

Введение

В связи с потеплением климата условия хранения зерна и зернопродуктов существенно изменились. Кроме того, ухудшение экономической ситуации во многих хозяйствах отрицательно сказывается на качестве послеуборочной доработки урожая и его хранения. Особенно важно отметить некачественную подготовку зернохранилищ, обработка которых проводится пестицидами, несоответствующими сформировавшейся вредной фауне, что, в свою очередь, ухудшает фитосанитарную ситуацию в складских помещениях при хранении продукции, вследствие чего потери в складских условиях могут составлять от 15 до 30% и выше [1].

Химическая дезинсекция тары, зерна, территории зерноперерабатывающих предприятий производится с использованием технологий контактного действия с помощью химических препаратов. После такой обработки продукция длительное время содержит остатки химических веществ и может использоваться только после того, как их концентрация станет ниже максимально допустимого уровня (МДУ) [2]. При этом следует отметить, что в странах ЕС и США

химическое обеззараживание зерна в зернохранилищах запрещено.

В отличие от химических инсектицидов бактериальные препараты не вызывают привыкания к ним насекомых-вредителей, являются экологически безвредными, так как не впитываются в растения и являются строго специфичными протоксинами, преобразующимися в токсины только внутри насекомых под действием ферментов их кишечника. Также способствуют сохранению биоразнообразия окружающей среды, что обеспечивает участие природных агентов в регулировании численности вредных объектов и приводит к восстановлению естественной саморегуляции биоценозов.

Введение биопрепаратов в системы защиты обеспечивает:

- увеличение урожая основных культур и повышение качества сельскохозяйственной продукции;
- возможность отказа от использования ряда дорогостоящих пестицидов;
- повышение плодородия почв, оздоровление почвенной микробиоты;
- возможность переориентации хозяйств на производство экологически чистой продукции.



Основное место среди биологических средств защиты растений (СЗР) занимают бактериальные препараты на основе спорокристаллообразующих бактерий группы *Bacillus thuringiensis* (Bt), представленной более чем 20 серологическими разновидностями.

Патогенное действие *Bacillus thuringiensis* на насекомых связано с токсинами и другими метаболитами бактерий. Основными, определяющими энтомопатогенные свойства бактерий, являются δ -токсины – кристаллические включения белкового происхождения. β -экзотоксин продуцируется только отдельными подвидами *Bacillus thuringiensis* и по структуре является аналогом аденозинтрифосфорной кислоты [3]. Экзотоксин играет особую роль в патогенезе насекомых, оказывая не только летальный, но и тератогенный эффект [4], и действуя как синергист в комплексе со спорами бактерий и кристаллами δ -токсина. Учитывая, что β -экзотоксин имеет спектр токсического действия, отличающийся от кристаллического δ -токсина, и обладает иным механизмом действия, перспективным является создание бактериальных препаратов на основе патогенов, содержащих оба токсина.

Целью данной работы - является разработка технологии получения биологического препарата для контроля численности амбарного клеща (*Acaroidea*) - вредителя сельскохозяйственных культур в виде новой товарной формы и обладающей высокой удельной патогенностью, стабильностью и экологической безвредностью.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали штамм *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* I серотипа 620M, т.к., кроме кристалловидных токсинов, бактерии этого штамма выделяют в среду растворимые в воде энтомоцидные вещества, из которых наибольший интерес представляет термо-стабильный β -экзотоксин, представляющий собой атипичный нуклеотид, в состав

которого входят остатки аденина, рибозы, глюкозы, аллослизевой и ортофосфорной кислот. Экзотоксин безопасен для теплокровных и человека, а спектр его действия для насекомых практически неограничен, он может быть использован как кишечный, так и контактный яд. Эндотоксин бактерий *Bac. thuringiensis subsp. thuringiensis* токсичен для представителей отряда чешуекрылых. Наша задача получить препарат с широким спектром действия, поэтому в качестве действующего вещества основное внимание уделялось экзотоксину.

Бактерии выращивали на подработанной нами ранее питательной среде, где источником углеводного питания микроорганизмов являются кормовые дрожжи [5]. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл, с объемом среды – 15 мл, на термостатируемой качалке с числом оборотов 240 мин⁻¹–260 мин⁻¹ при температуре (29±1)°С до накопления в культуральной жидкости (КЖ) 80–90% свободных спор и кристаллов от общего количества.

Посевным материалом служила жидкая посевная культура, выращенная при тех же условиях.

В культуральной жидкости (КЖ) определяли: стадию и синхронность развития культуры, концентрацию клеток, содержание белка δ -эндотоксина, содержание β -экзотоксина, концентрацию питательных веществ.

Микробиологическую продуктивность штамма оценивали по титру спор на 1 мл КЖ и содержанию β -экзотоксина.

Титр бактериальных спор в КЖ определяли методом серийных разведений с последующим высевом в плотную питательную среду. Подсчет количества выросших колоний производили после 24-часового выращивания культуры в термостате при температуре (29±1)°С.

Содержание β -экзотоксина определяли согласно утвержденной лабораторной методике по определению содержания β -экзотоксина в культуральной жидкости



Bacillus thuringiensis спектрофотометрическим методом [6].

Метод основан на способности β -экзотоксина показывать максимум поглощения УЗ-лучей при длине волны 260 нм, а при длине волны 290 нм – незначительное остаточное поглощение. Отношение $\Sigma 290/\Sigma 260$ является для чистого экзотоксина величиной постоянной и равно 0,023.

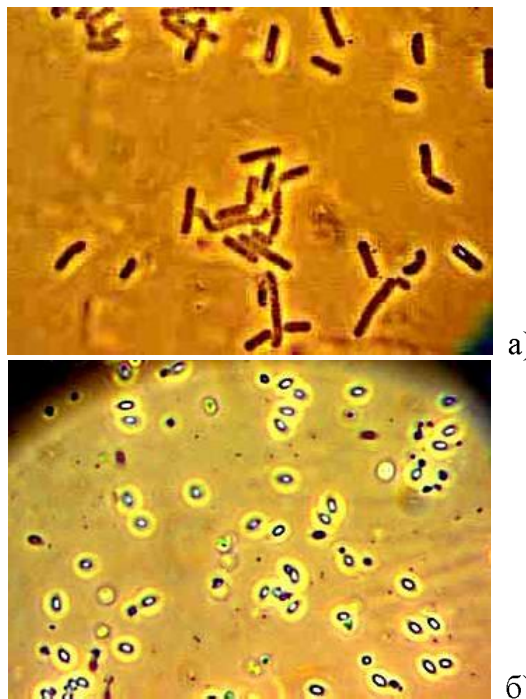
Содержание δ -эндотоксина определяли методом, основанном на выделении белка токсина и растворении его в растворе гидроксида натрия с концентрацией 0,05 М с последующим спектрофотометрическим определением по величине экстинкции при длине волны 280 нм [7].

В питательных средах определяли биохимические показатели: рН, аминный азот, крахмал, рН среды определяли потенциометрическим методом [8]. Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования [9]. Методом Бертрана определяли содержание крахмала [10].

Результаты и обсуждение

Культура *Bacillus thuringiensis* в своем развитии проходит ряд стадий: лаг – фаза и начало вегетативного роста; экспотенциальная фаза или собственно размножение вегетативных клеток; «гранулез» или начало спорообразования; спорообразование до появления единичных свободных спор в культуральной жидкости; массовое «высыпание», т.е. освобождение спор и кристаллов из клетки. Но несмотря на такое многообразие вариантов и сложность процесса развития культуры, этомоцидные препараты производят по одной технологической схеме, в основе которой лежит глубинное культивирование с целью получения максимального титра клеток в культуральной жидкости.

В глубинном культивировании культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 620M* вырастают перетрихальные, грамположительные, спорообразующие палочки (рис. 1).



а) вегетативные и заспорованные клетки палочковидной формы, расположены одиночно или в цепочках;

б) кристаллы δ -токсинов и овальные споры (препарат «раздавленная капля», увеличение в 2080 раз)

Рис. 1. Микроструктура 2-суточной культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 620 M* на среде ДПС

Культивирование штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 620 M* проводили в глубинных условиях на полупромышленной пилотной установке в биореакторе «Electrolux» объемом 130 литров на ферментационной среде следующего состава: дрожжи кормовые; крахмал картофельный; соевая мука; кальций хлористый; вода водопроводная.

Культивирование проводили при температуре $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Расход воздуха ступенчатый в зависимости от стадии развития культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 620 M* - от 20 до 45 л/мин при постоянном перемешивании.

В таблице 1 представлены данные биохимических показателей, продуктивности и экзотоксинообразования культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis um. 620 M* в процессе культивирования на полупромышленной пилотной установке.



Таблица 1

Биохимические показатели, продуктивность и экзотоксинообразование культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* um. 620 M в процессе культивирования

Время роста, час.	pH	Аминный азот	Общие редуцирующие вещества	β -экзотоксин, мкг/мл	Титр, спор/мл 10^9
Питательная среда до засева	6,74	47,3	1,96	-	-
6	5,92	45,1	1,93	-	-
12	5,6	56,8	1,05	-	-
18	6,4	53,9	0,6	-	-
23	7,8	64,1	0,6	839,0	-
26	8,1	71,3	0,67	874,2	2,73
29	8,5	75,7	0,62	955,4	3,47
37	8,7	101,9	0,5	965,0	5,11
41	8,8	97,6	0,47	995,3	5,33

Установлено, что в период культивирования весь цикл развития культуры штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* 620 M соответствует пяти стандартным фазам развития бактерий группы *B. thuringiensis*. В стационарной фазе титр вегетативных клеток в жидкой культуре варьировал в пределах 2,73–3,47 млрд спор в 1 мл. В этот же период происходит интенсивное формирование белковых кристаллов и проспор. Последняя фаза культивирования характеризовалась активным процессом формирования спор и последующим лизисом и освобождением спор. Титр жизнеспособных спор в культуре составил 5,33 млрд спор в 1 мл среды и период культивирования – 41 час.

Таким образом, наработанная биомасса штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* 620 M, образующая спорокристаллический комплекс и продуцирующая термостабильный β -экзотоксин, явилась основой для разработки и производства опытного образца бактериального препарата для защиты запасов зерна при хранении от комплекса амбарных вредителей.

Успешное применение бактериальных препаратов против их вредителей, как и химических препаратов, зависит от товарной формы препарата. Как известно, биологические средства защиты растений (на основе *Bacillus thuringiensis*) выпускают в следующих формах [11]: порошки (дусты) – смесь сухого инсектицида и пеногасителя; смачивающие порошки, образующие при разбав-

лении устойчивые суспензии и содержащие, помимо действующего начала, ПАВ и прилипатели; гранулированные препараты – гранулы, пропитанные инсектицидом; концентрированные эмульсии; пасты.

На основе штамма *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* 620M разработана товарная форма препарата в виде концентрата суспензии «БиоКенБид-БМП» следующего компонентного состава: концентрированная суспензия спорокристаллического комплекса; сульфат аммония; тиомочевина и уксусная кислота.

Следует отметить, что введение в состав препарата сульфата аммония в качестве консерванта стабилизирует белок энтомоцидного кристалла, что приводит к длительному сохранению энтомоцидной активности жидкого препарата.

Введение тиомочевины усиливает антимикробные свойства, предотвращает развитие посторонней микрофлоры. Уксусная кислота для установления pH 4,5-5,0, что позволяет исключить развитие посторонней микрофлоры при любых температурных условиях и стабилизирует белок энтомоцидного кристалла, что приводит к длительному сохранению энтомоцидной активности жидкого препарата.

Полученный образец прошел испытание на биологическую эффективность в отношении амбарного клеща в ТОО «Казахский научно-исследовательский институт



переработки сельскохозяйственной продукции» (г. Астана)

Данные по продуктивности обработанного образца представлены в таблице 2.

Таблица 2

Продуктивность, экзотоксинообразование образца культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* um.620M для определения биологической эффективности

Наименование штамма	Титр спор/мл 10 ⁹	β-экзотоксин, мкг/мл	δ-эндотоксин мг/мл
<i>Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis</i> um.620M	5,33	995,3	4,39

Испытания проводились методом принудительного контакта амбарных клещей с обработанной поверхностью при различных концентрациях препарата. Контакт с каждой концентрацией препарата проводили в трех повторностях по 10 клещей в каждой при

комнатной температуре. В контроле, едином на весь опыт, также три повторности по 10 клещей. Учет результатов опыта проводили ежедневно в течение 5 суток. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3

Биологическая эффективность опытного образца препарата на основе культуры *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* um 620M в отношении амбарного клеща

Концентрация препарата, %	Оценка гибели амбарного клеща, сутки					
	2		3		4	
	состояние	% гибели	состояние	% гибели	состояние	% гибели
Контроль (без препарата)	+++	0	+++	0	+++	0
0,5	++	30,0	+	60,0	-	100,0
1,0	++	30,0	+	60,0	-	100,0
1,5	++	30,0	+	60,0	-	100,0
2,0	++	40,0	+	70,0	-	100,0

(+++) – живые клещи;

(++) – слабоподвижные клещи;

(+) – слабоподвижные клещи с резким нарушением координации;

(-) – мертвые клещи, не реагирующие на тепло и дыхание.

Результаты проверки биологической эффективности опытного образца препарата в отношении амбарного клеща показали, что уже на 4-е сутки наступает массовая гибель насекомых даже при самой низкой концентрации препарата - 0,5% по сравнению с контролем, где наблюдалось 100%-ное выживание насекомых.

Интерпретируя результаты эксперимента, необходимо заметить, что данный препарат может применяться для защиты складских помещений и запасов зерна при хранении от комплекса амбарных вредителей в различных регионах Казахстана.

Заключение

В результате проведенной работы разработан биологический инсектицидный препарат «БиоКенБид-БМП, КС», обладающий акарицидными свойствами в отношении амбарного клеща.

Новый бактериальный препарат способствует расширению ассортимента экологически безопасных средств защиты растений и повышению эффективности защиты растений от насекомых-вредителей.

Препарат включен в план проведения регистрационных (мелкоделяночных) испытаний пестицидов Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан на 2010 год. Опытная партия направлена на регистрационные испытания в РГП «Фитосанитария» г. Астана.



Литература

1. Козич И.А. Амбарные вредители и меры борьбы с ними в Республике Беларусь // Вести Национальной Академии наук Беларуси. - 2005. - №5. - С.115-116.
2. Кутовой В.А., Рудяк Б.И., Базыма Л.А. Высокочастотная технология защиты зерна от амбарных вредителей // Вопросы атомной науки и техники. - 2001. - №4. - С. 128-129.
3. Глухов В.В. Патогенны насекомых: структурные и функциональные аспекты. – Москва: Круглый год, 2001. - 736 с.
4. Лескова А.Я., Рыбина Л.М. Энтопатогенные бактерии и роль их в защите растений. – Новосибирск, 1987. – 312 с.
5. Парамонова И.Е., Некрасова Н.И., Чарыкова И.В., Талжанов Н.А., Балпанов Д.С. Питательная среда для культивирования *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* ум. 98 // Биотехнология. Теория и практика. - 2010. - № 2 – С. 79–84.
6. №КЗ 07,00,01117-2010 Метод определения содержания β -экзотоксина в препарате «Битокситурин» и других препаратах на основе *Bacillus thuringiensis* МВИ30135217 – 01 - 2009.
7. №КЗ 07,00,01116-2010 Средства защиты растений биологические. Метод определения массовой доли белка δ -эндотоксина. МВИ 30135217-01-2009.
8. ЛМХ/СОП-01 «Определение рН в пробах воды».
9. ЛМ «Определение аминного азота методом формольного титрования».
10. ЛМ «Определение редуцирующих веществ методом Бертрана».
11. Славнова В.С., Кавызин Л.И., Шевцов В.В. Бактериальные инсектициды на основе *Bacillus thuringiensis* в интегрированной системе защиты растений // Обзорная информация. ВНИИСЭНТИ. - 1985. - Серия IV-М. - С. 39-43.

Түйін

Bacillus thuringiensis subsp thuringiensis өсіндісі негізінде «БиоКенБид – БМП, КС» - инсектицидті биопрепарат әзірленген. «БиоКенБид – БМП, КС» қамба зиянкестер кешенінен қойма ғимараттарды қорғау мен бидай қорын сақтауға арналған. Препарат адам, үй мен жабайы жануарлары үшін қауіпсіз және энтомофаунасы пайдалы болып келеді.

Мақалада биологиялық препаратты әзірлеу бойынша зерттеу жадығаттары: дайындалған қоректік ортада *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* штамының оңтайлы культивирлеу жағдайы, культивирлеу тәртібі, биохимиялық көрсеткіштер, культивирлеу үрдісінде экзотоксиннің түзілуі мен өнімділігі бойынша мағлұматтар көрсетілген. Қамба кенесінде препараттың тәжірибелі партиясының биологиялық тиімділігінің сынама нәтижелері және тауарлы түрін әзірлеу бойынша мағлұматтар ұсынылған.

Summary

Antiparasitic biopreparation «BioKenBid – BMP, KS» was worked out on the basis of culture *Bacillus thuringiensis subsp thuringiensis* and is designed for protection of warehouses and cache against the complex of storage pests. The product is harmless for human beings, pets and wild animals, as well as for useful entomofauna. The article represents investigation materials on working out of biological product: optimum conditions for strain cultivation *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis* on the growth-supporting microenvironment, cycle process of cultivation, biochemical figures, data on productivity and formation of exototoxin in the process of cultivation. Test results on biological efficiency of pilot lot of the product with granary mite and data on working out of commercial form are represented.