

## ЛЕКЦІЯ 12

### Тема: Біотехнологія виробництва бактерійних добрив, інсектицидів і засобів захисту рослин

#### План

1. Біотехнологія виробництва бактерійних добрив.
2. Виробництво біоінсектицидів і препаратів проти гризунів
3. Виробництво мікробних засобів захисту рослин.

#### 1. Біотехнологія виробництва бактерійних добрив

Використання мікроорганізмів у якості **біопестицидів** – перспективний напрям сучасної біотехнології, який має суттєві досягнення. У теперішній час бактерії, гриби, віруси знаходять все більш широке використання в якості промислових біопестицидів. Біотехнологія виробництва цих препаратів досить різноманітна, як різноманітними є природа і фізіологічні особливості мікроорганізмів-продуцентів. Проте існує ряд універсальних вимог, що висуваються до біопестицидів:

- селективність і висока ефективність дії (висока вірулентність для комах);
- безпечність для людини і корисних представників фауни і флори;
- тривалість зберігання і зручність використання (порошок, рідини тощо);
- гарне змочування і прилипання (мати адгезивні властивості);
- низька собівартість виробництва і висока якість.

У різних країнах виробляють понад 100 видів біопрепаратів, що знайшли застосування в рослинництві для захисту рослин від гризунів і комах, зокрема ентомопатогенні препарати (ендобактерин, інсектин, токсобактин, боверин, вирин), а також гербіциди, фунгіциди, бактерійні добрива (нітрагин, азотобактерин, форфобактерин), що належать до трьох груп: це бактеріальні, грибні та вірусні препарати.

Використання біологічних засобів захисту рослин, стимуляторів росту рослин і тварин, мікробних добрив дозволяє знизити дози хімічних засобів захисту і мінеральних добрив, що призводить до підвищення якості та безпечності сільськогосподарської продукції і створенню екологічно чистих технологій.

#### Біодобрива

Мікроорганізми відіграють значну роль у підвищенні родючості ґрунту, адже в процесі росту і розвитку мікрофлора ґрунту покращує його структуру, збагачує поживними речовинами, сприяє більш повному використанню добрив.

Інтенсивне рослинництво збіднює запаси азоту в ґрунті, адже значна частина його виноситься з ґрунту разом з врожаєм. Здавна для відновлення і покращення ґрунту існувала практика використання бобових рослин, здатних у симбіозі з азотфіксувальними мікроорганізмами поповнювати запаси азоту в результаті **діазотрофності** (утилізація атмосферного азоту).

Відомі три способи фіксації молекулярного азоту:

1. Спонтанна фіксація в атмосфері при електричних розрядах.
2. Промисловий синтез аміаку з азоту (процес Габера-Боша).
3. Біологічна фіксація азоту за участю бактерій.

Загальна кількість фіксованого азоту становить  $2,4 \times 10^8$  т на рік. З них 2/3 – результат біологічної фіксації, 1/4 – промислової фіксації, решта – спонтанної.

Уперше бульбочкові бактерії на коренях бобових рослин описали **І. Лахман** (1858 р.) і **М.С. Воронін** (1866 р.), незалежно один від одного, а чиста культура азотфіксаторів була отримана **М. Бейєринком** у 1888 році. **Виноградський** у 1893 р. вперше виділив і описав анаеробну спороносну бактерію, що фіксувала молекулярний азот, і назвав її на честь Луї Пастера *Clostridium pasteurianum*. У 1901 році Бейєринк відкрив вільноживучу азотфіксувальну бактерію *Azotobacter*. Висока продуктивність азотфіксації *Azotobacter* стала використовуватись для інтродукції цих бактерій у ґрунті з метою відновлення ресурсів азоту.

Практичне використання також знайшли симбіотичні бактерії роду *Rhizobium*, що розвиваються в бульбочках бобових рослин. Зараз активно розробляються технології внесення цих мікроорганізмів у ґрунт і для інокуляції насіння.

Найпростіший спосіб інокуляції, який було розроблено наприкінці XIX ст. і застосовується дотепер, заснований на використанні ґрунту після вирощування бобових культур. Проте цей метод має суттєвий недолік – необхідність перемішувати великі об'єми ґрунту (100-1000 кг/га), а також можливість поширення захворювань. Більш ефективним виявилось використання для інокуляції насіння спеціальних препаратів азотфіксувальних бактерій.

Для обробки насіння і ґрунту при посіві використовують інокулят, який містить життєздатні клітини бактерій. Виготовляють такі види інокуляту:

1) пляшкову або агарову культуру на скошеному щільному середовищі; культуру на основі торфу;

2) рідку культуру;

3) ліофілізовану культуру;

4) заморожені концентрати.

Препаратами обробляють насіння або вносять у ґрунт при посіві. У 1 г торф'яного інокуляту має бути близько  $10^8$  життєздатних клітин. Перед обробкою торф'яний препарат розводять водою і обробляють насіння з розрахунку 5 г інокуляту на 1 кг насіння.

Найчастіше виготовляють препарати на основі торфу, оскільки торф забезпечує добрий захист бактерій при пакуванні та збереженні їхніх властивостей на насінні. Крім торфу, як носії використовують пил бурого вугілля, бентоніт. Як адгезини до препаратів додають цукри.

До носіїв, що використовуються для приготування азотфіксувальних бактерій, висувають такі вимоги:

- вони мають бути нетоксичними для бактерій;
- мати гарні адсорбуючі та адгезивні властивості;
- містити достатню кількість органічних речовин;
- добре піддаватися висушуванню і розпилюванню;
- мати низьку собівартість.

Бульбочкові бактерії роду *Rhizobium*, розвиваючись у кореневій системі бобових рослин, у симбіозі з ними фіксують атмосферний азот, забезпечують азотне живлення рослин. Згідно сучасних уявлень азотфіксація є відновлювальним процесом перетворення газоподібного азоту в аміак, який в подальшому асимілюється рослинами з утворенням амінокислот. Азотфіксувальні бактерії мають специфічний фермент **нітрогеназу**, у активному центрі якої відбувається активування інертної молекули  $N_2$  і відновлення до  $NH_3$ .

Бульбочкові бактерії відрізняються вибірковою здатністю щодо рослини-хазяїна. Процес азотфіксації відбувається лише в бульбочках на коренях бобових рослин, що утворюються в результаті проникнення бактерій через кореневі волоски до кореня. Взаємозв'язок бактерій з рослинами залежить від комплексу умов: фізіологічного стану і умов росту рослин, фізіологічного стану і вірулентності бактерій; від температури і

вологості ґрунту, наявності біогенних елементів, необхідних для розвитку бактерій і рослин.

Перша комерційна різновидність культури для інокуляції насіння (товарна назва «Nitragin») була запатентована у Великій Британії **Ноббе і Хилтнером** у 1896 р. Для різних бобових випускалися 17 варіантів культури. У 20-ті роки минулого століття випускалося багато різновидів інокулятив, серед яких були чисті культури, суміш бактерій з піском або торфом, а також культури, вирощені на щільному агарі або рідкому середовищі.

На основі симбіотичних азотфіксувальних бактерій роду *Rhizobium* виготовляють сухий препарат **ризобін** і **торф'яний ризобін**, а також **нітрагін**.

**Нітрагін** – препарат, що містить бактерії, які здатні перебувати в симбіозі з бобовими рослинами. Виготовляють нітрагін двох видів: сухий і ґрунтовий.

**Сухий нітрагін** – порошок бульбочкових бактерій з наповнювачем (бентоніт і торф). Вологість препарату – 5-7%, титр – 9 млрд. клітин/г.

**Ґрунтовий нітрагін** – це культура бактерій у стерильному ґрунті. В 1 г. препарату міститься не менше 300 млн. клітин бактерій.

#### **Технологічна схема отримання нітрагину:**

1. Вирощування посівного матеріалу на агаризованих середовищах.
2. Вирощування в колбах.
3. Підготовка інокулятив у стерильних середовищах.
4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі впродовж 18-20 годин за температури +30°C.
5. Підготовка ферментера і середовища.
6. Вирощування у ферментері при гарній аерації впродовж 48-72 годин (+30°C, рН 6,5-7,2).
7. Обробка захисними засобами (20 % меляси і 1 % тіосечовини).
8. Змішування з наповнювачем (торф, бетоніт).
9. Висушування, фасування і пакування.

На основі вільноживучих азотфіксувальних бактерій *Azotobacter chroococcum* виготовляють бактерійний препарат **азотобактерин**. Для його виробництва *A. chroococcum* культивують на середовищі з сахарозою або мелясою при активному аеруванні. Використовують також моно-, ди-, трисахариди, органічні кислоти і спирти, а також вносять Р, S, Ca, Mg, Mo, Fe, солі амонію. Оскільки клітини азотобактеру є маложиттєздатними, засів ферментера здійснюють великим об'ємом інокуляту (10 %).

Препарат виготовляють у двох формах: сухий і ґрунтовий (торф'яний) азотобактерин. Сухий азотобактерин використовують для обробки овочевих культур.

Пакети з торфом стерилізують радіаційним способом. Культуру азотобактера вирощують методом глибинного культивування і додають в пакет із стерильним торфом із таким розрахунком, щоб 1 г препарату містив 40-50 млн. життєздатних клітин. Мішки поміщають до термостату й вирощують у них культуру азотобактера при 25-27°C протягом 4-6 діб до вмісту не менше 180-200 млн. клітин азотобактера в 1 г препарату. Потім мішки герметично запаюють і зберігають в холодильнику при 7-12°C. Отримані препарати зберігають свою активність протягом 3-4 місяців.

Перспективними є препарати на основі бактерій *Azospirillum lipoferum*, що живуть на коренях тропічних трав, які виділяють для бактерій аспартат, лактат, піруват, сукцинат.

Крім бактерійних препаратів, що сприяють азотному живленню рослин, виготовляють також препарати для забезпечення рослин *доступними формами фосфору* на основі бактерій *Bacillus megaterium*, клітини яких перетворюють складні фосфаторганічні сполуки і мінеральні фосфати в доступну для рослин форму

**Фосфобактерин** – це препарат у вигляді порошку, який містить в 1 г не менше 8-10 млрд. життєздатних спор культури *Bacillus megaterium*.

**Технологічна схема** отримання фосфобактерину подібна, як для виготовлення препаратів нітрагіну. Культуру культивують до стадії спороутворення глибинним способом у стерильних умовах на середовищі з мелясою, кукурудзяним екстрактом, амоній сульфатом, крейдою впродовж 30-48 годин за температури 28-30°C і рН 6,5-7,5. Для виділення клітин використовують центрифугування. Отриману біомасу висушують у розпилювальній сушарці за температури 65-75°C до вологості 2-3 %, змішують з каоліном, фасують по 50-500 кг у водонепроникні герметичні мішки. Термін зберігання при кімнатній температурі становить 1 рік. Культура повинна бути стійкою до фагів. У 1 г препарату має бути 8 млрд. життєздатних клітин.

Фосфобактерин – це препарат *стимулювальної дії*, він не замінює мінеральних фосфорних добрив. Його застосовують на чорноземних ґрунтах.

**Різоагрін** – біопрепарат, що стимулює ріст на основі штаму *Agrobacterium radiobacter*, рекомендується для передпосівної обробки насіння зернових. Володіє потужною стимулюючою дією на рослини за рахунок посилення мінерального живлення. В першу чергу відбувається посилення фосфорного харчування за рахунок мобілізації орґанофосфатів ґрунту. Також мікроорґанізми, що входять до складу біопрепарату володіють високою конкурентоспроможністю до фітопатогенних грибів, що підвищує стійкість рослин до хвороб.

## 2. Виробництво біоінсектицидів і препаратів проти гризунів

**Біоінсектициди або ентомопатогенні препарати** містять спори або вегетативні клітини мікроорґанізмів і продукти їх життєдіяльності, які патогенні для комах та кліщів. Промислове виробництво біоінсектицидів почалося порівняно недавно. Відомо понад 90 видів бактерій, що інфікують комах, проте більшість промислових штамів належить до роду *Bacillus*, основна маса препаратів (понад 90%) виготовлена на базі *Bacillus thuringiensis* (**Bt**). Випускають препарати проти 160 видів комах. Такі препарати не виявляють негативного впливу на людину і тварин.

Мікроорґанізми-патогени виділяють з організму загинувших під час епідемії комах. Найбільш вживаними для виготовлення препаратів є бактерії роду *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*). Вони патогенні для лускокрилих комах.

Вперше ці бактерії були виділені **Л. Пастером** з гусені тутового шовкопряду, які він назвав *Bacillus bombicus* – «бактерії з незвичайними ядрами» – які спричиняли параліч у гусені. Пізніше з'ясувалося, що то були не ядра, а кристали ендотоксину, які назвали параспоровими тілами. У 1911 році **Е. Берлінер** детально описав цю бактерію і назвав її *Bacillus thuringiensis*.

Відомо понад 20 серотипів *B. thuringiensis*, що відрізняються біохімічними і серологічними властивостями й ентомоцидністю. Ця бактерія утворює спори, проростання яких у тілі комах призводить до його розривання. Бактерії патогенні для 130 видів комах. Токсичними є продукти цих бактерій: *термостабільний екзотоксин*, *термолабільний ендотоксин*, *протоксин* і *специфічні ферменти*, які в лужному середовищі шлунку гусені гідролізуються протеїназами комах і спричиняють параліч шлунку або тіла комах.

На основі бактерій *Bacillus thuringiensis* (**Bt**), здатних утворювати спори, кристали і токсичні речовини в процесі росту, випускають у різних країнах препарати проти комах (понад 20), що мають різну назву: ентобактерин, інсектин тощо.

**Технологія отримання біопестицидів** на основі ентомопатогенних бактерій являє собою типовий приклад періодичної гомогенної аеробної глибинної культури, яка культивується в суворо стерильних умовах, що контролюються. Основу поживного середовища складають дріжджополісахаридна суміш і піногасник (кашалотовий жир).

Тривалість ферментації 28-30°C у режимі перемішування і аерації впродовж 35-40 годин до накопичення в культуральній рідині 5-10% спор і кристалів від загальної кількості (при титрі культури не менше 1 млрд. спор в 1 мл). Далі спори і кристали відділяють в процесі сепарування і зневоднення. Товарна форма препарату – сухий порошок, а також стабілізована паста. На базі пасти в процесі висушування в розпилювальній сушарці отримують сухий продукт (вологість 10 %, титр 100-150 млрд. спор/г). Препарат стабілізується каоліном. Готовий продукт вістить 30 млрд. спор/г.

**Ентобактерин, лепідоцид** (аналог – **дипел**) – містять спори, ендотоксин і наповнювачі. Ефективний проти лускокрилих комах: яблуневої і плодової молі, шовкопрядів, капустяної молі, капустяного білана тощо. Застосовується для захисту плодкових дерев.

**Бітоксисацілін** – містить спори, ендотоксин, термостабільний екзотоксин. Препарат застосовують для захисту картоплі, томатів, баклажанів від колорадського жука; льону – від совок, овочевих культур – від совок, біланів, молі; плодкових і лісових рослин – від комплексу листогризух лускокрилих шкідників.

**Дендробацілін** – містить спори й ендотоксин. Застосовується проти сибірського шовкопрядя, а також шкідників овочевих і плодкових культур.

**Бактокуліцид** – містить ендотоксин, що вибірково вбиває лише личинок комарів.

Окрім *Bacillus thuringiensis* використовують й інші види бактерій, серед яких: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas septica*, *Vibrio leonardii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, *Diplococcus spp.*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus* та *Bacillus moritai*.

На основі бактерій *Bacillus subtilis* створено препарат **фітоспорин** проти бактерійних і грибкових фітопатогенів.

## Грибні препарати

Перспективними для виготовлення ентомопатогенних препаратів вважають гриби, які мають ряд переваг: вони уражують велике коло комах; мають різноманітні шляхи передачі інфекції, добре зберігаються в навколишньому середовищі у вигляді спор, склероціїв, спорангіїв; здатні продукувати широкий спектр біологічно активних речовин – токсинів, які викликають загибель комах. Гриби можуть інфікувати не через кишковий тракт, а через кутикулу, що нехарактерне для інших мікроорганізмів.

Грибні ентомопатогенні препарати спричиняють загибель комах внаслідок утворення токсинів (боверин), розвитку міцелію по всьому тілі комахи або активного спороношення. Зараження може відбуватись на різних стадіях розвитку (у фазі лялечки, імаго).

Для виготовлення препаратів використовують гриб *Beauveria bassiana*, який уражує понад 70 видів комах, зокрема яблуневу плодожерку, колорадського жука, совку озиму тощо. Захворювання, що викликають боверії, називають кам'яниця (так виглядає личинка, уражена грибом).

Препарати **боверин** і **біотрол** готують на основі конідій даного гриба. Отримання **боверина** можливе як екстенсивним поверхневим, так і більш економічним глибинним способом ферментації. Проте глибинне культивування є досить складним технологічним завданням.

**Глибинне культивування.** Культивування гриба реалізується в суворо стерильних умовах при 25-28°C впродовж 3-4 діб. Поживне середовище містить дріжджі, крохмаль, NaCl, CaCl<sub>2</sub>. Велике значення має концентрація азоту, адже його дефіцит уповільнює швидкість росту, проте надлишок – стимулює утворення гонідій (гіфальні тільця), а не конідій (спор). Оптимальна концентрація амінного азоту становить 10-15 мг%. Титр конідіеспор в культурі – 0,3-1,3 млрд./мл. Культуральну рідину сепарують з утворенням пасти з вологістю 70-80% і титром спор 8 млрд./г. Пасту висушують розпилюванням у

сушарці до вологості 10 % і титру  $8 \times 10^9$  клітин/г. До готового препарату додають речовину-прилипач і стабілізують каоліном.

**Поверхнєве культивування** гриба потребує значних виробничих площ і більш трудомістке. Спосіб реалізується в різних варіантах:

1) на рідкому середовищі без дотримання стерильності, аерації та перемішування; утворення спор спостерігається через 7-10 діб, а на 18-25 добу спороносна плівка, що утворилася, знімають.

2) на твердому середовищі в умовах асептики, з використанням сусло-агара, картоплі, зерна пшениці або кукурудзи. Утворення конідіеспор завершується на 12-15 добу.

Отриманий матеріал висушують, подрібнюють і змішують з тальком або торфом. Готова форма препарату – сухий дрібнодисперсний порошок конідіеспор, змішаний з каоліном (титр – 1,5 млрд. конідій/г). Препарат є ефективним проти листогризух садових шкідників, шкідників лісу, яблуневої плодожерки, личинок колорадського жука. Застосовують боверин шляхом обприскування рослин з розрахунку 1-2 кг/га.

Відомі сотні видів ентомопатогенних грибів, але найбільш перспективними вважаються дві групи – мускарідні гриби з родини *Euascomycetes* і ентомотрофні з родини *Entomophthoraceae*.

Основну увагу привертають наступні грибні патогени: збудник білої мускариди (рід *Beauveria*), збудник зеленої мускариди (рід *Metarrhizium*).

Збудник зеленої мускариди (рід *Metarrhizium*) – це найбільш відомий ентомопатогенний гриб, описаний більше 100 років тому як зелений мускарідний гриб. На його основі були отримані перші препарати біопестицидів у промислових масштабах. Цей гриб уражує комах з багатьох груп, включаючи слинового пасовищного клопа і шкідника цукрової тростини.

Для інфікування сарани в США використовують австралійський мікроскопічний гриб *Entomophthora praxibuli*. Сарана гине протягом 7-10 днів після застосування препарату. Спори гриба після зимівлі в ґрунті здатні вражати наступні покоління комах.

### **Вірусні препарати**

Дуже перспективними для захисту рослин є ентомопатогенні препарати створені на базі вірусів (**вірини**). Віруси високовірулентні й вузькопецифічні, добре зберігаються в природі. Проте, вони є практично повністю безпечними для людини і усієї біоти. Інфікуються комахи вірусами при живленні. Тільця-включення, що потрапили в кишковик, руйнуються в лужному середовищі. Віріони, що звільнилися, проникають через стінку кишковика до клітин і реплікуються в ядрах.

Перший вірусний інсектицид, створений компанією «Сандоз» у 70-ті роки, був призначений для боротьби з бавовняними хробаками.

У відповідності з рекомендаціями Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я 1973 р. особлива увага при вивченні вірусів була звернена на одну групу – **бакуловіруси**. У цій групі відсутні віруси, патогенні для хребетних.

**Бакуловіруси** – це дволанцюгові ДНК-віруси, до яких належать віруси ядерного поліедрозу (ВЯП), віруси гранульозу (ВГ). Видові назви ентомопатогенних вірусів, що інфікують комах складаються з назви групи і господаря (наприклад, поліедроз шовкопряда непарного, гранульоз совки озимої), або включають місце локалізації віруса в тілі комах-господаря (ядерний поліедроз, цитоплазматичний поліедроз). Поліедрози уражують переважно лялечки (гусінь) лускокрилих, двокрилих і прямокрилих.

### **Технологічна схема отримання вірусних препаратів**

Процес виготовлення вірусних препаратів включає етапи:

1. Виготовлення їжі (суміш агару, сахарози, казеїну, проростків пшениці, солей) і вирощування гусені.
2. Відбір здорової гусені.
3. Зараження гусені та виділення вірусів (7-14 днів).

На основі бактерії *Salmonella enteritidis* готують препарати проти гризунів **бактороденцид**, який випускається у двох формах – зерновий (на основі зерна пшениці, ячменю або вівса) і амінокістковий (на залишках кісток). Зерновий бактороденцид застосовують проти польових видів мишоподібних гризунів, амінокістковий – проти щурів і мишей, що мешкають у житлових будинках. Препарат безпечний як для людини, так і для домашніх й диких тварин.

### **3. Виробництво мікробних засобів захисту рослин**

**Пестициди (гербіциди)** – хімічні препарати для боротьби з бур'янами, складають біля 50 % сумарного ринку хімікатів для сільського господарства. Альтернативою хімічним пестицидам, які негативно впливають на навколишнє середовище, є виготовлення **мікробних пестицидів (біогербіцидів)**, до яких належать мікроорганізми-патогени рослин, ферменти, а також напівпродукти, що отримують шляхом біоконверсії. Найчастіше використовують грибні фітопатогени і грибні фітотоксини. На основі *Alternaria cassiae* і *Fusarium lateritium* розроблено препарати, які застосовують при боротьбі з бур'янами, що ростуть на соєвих і арахісових полях.

Поряд із гербіцидами, для захисту рослин застосовують препарати для **боротьби зі збудниками захворювань**. На базі бактерій роду *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) отримано препарати, що пригнічують розвиток понад 40 видів мікроорганізмів, що уражують пшеницю, жито, ячмінь, а також проводять захист насіння сорго і кукурудзи від антракнозу і ризоктоніозу, а бавовника і сої – від вілту тощо.

Для боротьби зі фітофторозом яблунь застосовують препарати на базі ґрунтової бактерії *Enterobacter aerogenes*. Проти фітопатогенів роду *Ervinia*, які спричиняють гниль картоплі, ефективними є *Pseudomonas fluorescens*.

**Флавобактерин** – біофунгіцид для захисту основних сільськогосподарських культур від комплексу грибних і бактеріальних хвороб. Найбільш ефективний проти збудників хвороб зернових культур (борошниста роса, коренева гниль), картоплі (ризоктоніоз, парша звичайна, фузаріоз), винограду (оїдіум), соняшнику (прикоренева склеротинія). До складу препарату входять бактерії роду *Flavobacterium*, що продукують високоактивний антибіотик «флавоцин» з широким спектром дії на фітопатогенні гриби і бактерії.

Захист багатьох овочевих культур від захворювань, що викликаються певними видами мікроскопічних грибів, забезпечується застосуванням препаратів на базі культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

На основі мікробного синтезу налагоджено промислове виробництво **стимуляторів росту рослин – гіберелінів**. Цей процес здійснюють з використанням аскоміцетного гриба *Fusarium moniliforme*.

Виділяють гіберелін з фільтрату культуральної рідини. Процес відбувається у дві фази. На *першій фазі* проходить нагромадження біомаси, на *другій* – утворення продукту. Субстратом для вирощування продуцента є середовище, що містить сахарозу і соєву муку. Головною умовою є співвідношення азоту і вуглецю. Висока продуктивність культури відмічена при нестачі азоту і при високому рівні джерела вуглецю.

