



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 113 794** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 01 N 63/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 93004923/13, 22.05.1992
(30) Приоритет: 23.05.1991 KR 91-8328
(46) Дата публикации: 27.06.1998
(56) Ссылки: ЕР, заявка, 0097571, кл. А 01 N 63/00, 1984. SU, патент, 4563344, кл. А 0 1 N 25/00, 1986.
(86) Заявка РСТ:
KR 92/00017 (22.05.92)

(71) Заявитель:
Корея Рисерч Инститют оф Кемикал
Текнолоджи (KR)
(72) Изобретатель: Сонг Хае Бок (KR),
Ханг Ву Ли (KR), Кванг Хи Сон (KR), Сунг Ук
Ким (KR), Чжи Ву Ли (KR), До Йэоб Ким
(KR), Йонг Кук Квон (KR)
(73) Патентообладатель:
Корея Рисерч Инститют оф Кемикал
Текнолоджи (KR)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО ПЕСТИЦИДА С БИОПОЛИМЕРНЫМ ПОКРЫТИЕМ, МИКРОБНЫЙ ПЕСТИЦИД С БИОПОЛИМЕРНЫМ ПОКРЫТИЕМ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО ПЕСТИЦИДА ПЛАВУЧЕГО ТИПА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, получению средств защиты растений, в частности получению пестицидов с биополимерным покрытием. Способ получения пестицида с покрытием заключается в том, что биополимер смешивают с водой, нагревают смесь до 80 - 121°C до образования геля или пасты, охлаждают до температуры от комнатной до 60°C и смешивают с одним из нижеперечисленных штаммов микроорганизмов: *Bacillus subtilis* Krietiensis ATCC 55078 или 55079, *Pseudomonas fluorescence* ATCC 27663, *Gliocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Streptomyces cacaoi asoensis* ATCC 19093, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, 48585 или 48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaeas* ATCC 52634 в количестве 10^4 - 10^{14} клеток на 1 г пестицида. Полученную смесь формуют и сушат, получая пестицид. Целесообразно перед смешиванием охлажденного гелеобразного или пастообразного

биополимера с микроорганизмом или в процессе их смешивания вводить стабилизатор и питательную добавку. В качестве биополимера может быть использовано одно из приведенных веществ: зерна, клубни, корнеплоды, крахмал, экстрагированный из них гелерит, природные воск и смолы, их производные. В качестве стабилизатора используют глицерин, молоко, снятое молоко, сухое молоко, масло растительного или животного происхождения, а в качестве питательной добавки - соевую муку, муку из семян хлопчатника, пептоны из животного и растительного сырья, молоко, снятое молоко, порошкообразный хитин и компост, пшеничные отруби, дрожжевой и кукурузные экстракты, мелассу, глюкозу, сахарозу, декстрин, железо, марганец, цинк, кобальт, почву, экстракт почвы. Для получения пестицида плавучего типа полученный вышеописанным способом пестицид обрабатывают материалом, обладающим плавучестью, в качестве которого используют разбухшие зерна, рисовые отруби, ореховую скорлупу, ячменные отруби, оберточный лист кукурузного початка, ячменную солому, кукурузные стебли, стебли проса, листья, опилки, рисовую или пшеничную солому. Полученный пестицид воздействует на более широкий круг видов насекомых. 3 с. и 1 з.п.ф-лы, 10 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 113 794** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 01 N 63/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 93004923/13, 22.05.1992
(30) Priority: 23.05.1991 KR 91-8328
(46) Date of publication: 27.06.1998
(86) PCT application:
KR 92/00017 (22.05.92)

(71) Applicant:
Koreja Riserch Instit'jut of Kemikal
Teknolodzhi (KR)
(72) Inventor: Song Khae Bok (KR),
Khang Vu Li (KR), Kvang Khi Son (KR), Sung Uk
Kim (KR), Chzhi Vu Li (KR), Do Jehob Kim
(KR), Jong Kuk Kvon (KR)
(73) Proprietor:
Koreja Riserch Instit'jut of Kemikal
Teknolodzhi (KR)

(54) **METHOD OF PREPARING MICROBE PESTICIDE WITH BIPOLAR COVER, MICROBE PESTICIDE WITH BIOPOLYMERIC COVER, METHOD OF PREPARING MICROBE PESTICIDE OF BUOYANT TYPE**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, biotechnology, pesticides. SUBSTANCE: invention relates to preparing agents for plant protection, in part, pesticides with biopolymeric cover. Method involves mixing biopolymer with water, heating a mixture to 80-121 C up to gel or paste formation, cooling to the temperature from room point to 60 C and mixing with one of the following strain of microorganisms: *Bacillus subtilis* krietiensis ATCC 55078 or 55079, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663, *Gliocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Streptomyces cacaoi asoensis* ATCC 19093, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, 48585 or 48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaeas* ATCC 52634 taken in the amount 10^4 - 10^{14} cells/1 g pesticide. Obtained mixture is formed and dried and pesticide is prepared. Before

mixing the cooled gel-like or paste-like biopolymer with microorganism or in the process of their mixing stabilizing agent and nutrient addition are added expediently. The following substances can be used as a biopolymer (one component): grains, tubers, root crops, starch extracted from their, gelrit, natural wax and resins and their derivatives. Stabilizing agents: glycerol, milk, skim milk, dry milk, vegetable oil, animal fat. Nutritional addition: soybean meal, cotton seed meal, skim milk, peptones from animal or vegetable raw, milk, powder-like chitin and compost, wheat bran, yeast and corn extracts, molasses, glucose, sucrose, dextrin, iron, manganese, zinc, cobalt, soil, soil extract. For preparing buoyant type pesticide the above described obtained pesticide is treated with the following material exhibiting buoyancy: swollen grains, rice bran, nut shells, barley bran, corn cob covering leaves, barley straw, corn stems, millet stems, wood saw-dust, rice or wheat straw. Obtained pesticides affect more insect species. EFFECT: improved method of preparing, enhanced effectiveness of pesticide. 4 cl, 10 tbl

Изобретение относится к усовершенствованному способу получения микробных пестицидов с покрытием и к продуктам, полученным этим способом, более конкретно к способу, который заключается в покрытии антагонистических микроорганизмов природными биополимерами, предварительно переработанных в виде геля или пасты.

Во все большей степени проблема загрязнения окружающей среды становится объектом заботы каждого человека: загрязнение земли и воды, вызванное избыточным использованием различных химикатов, например химических пестицидов, стало особым предметом дискуссии из-за серьезных последствий для здоровья и экологии.

Следовательно, для улучшения проблемы загрязнения окружающей среды, вызванного использованием токсичных химических веществ, проведены исследования для поиска жизнеспособного решения проблемы биологического контроля патогенов растений с помощью использования встречающихся в природе микроорганизмов.

В частности, сделаны попытки разработать дешевые и не загрязняющие природную среду пестициды, применяя антагонистические микроорганизмы. Однако из-за их неэффективности и других недостатков этих продуктов результаты оказались неудовлетворительными.

Например, изобретение, описанное Че с сотр. в патенте США N 4748021, относится к противогрибным композициям, содержащим *Trichoderma*, который является активным антагонистом *Fusarium*. В предпочтительном варианте этого изобретения, однако, почву стерилизуют, например, метилбромидом перед нанесением биоконтролирующей композиции, содержащей новый микроорганизм, названный Т-35. В соответствии с этим изобретением биологическая композиция, состоящая из пищевой основы, которая функционирует просто как питательная среда, дополнительно содержит определенный химический адгезив для ее связывания. Из-за этих ограничительных требований изобретение Че не нашло практического применения или может быть использовано очень ограничено.

Вайзели с сотр. в патенте США N 4259317 описали порошкообразный препарат, содержащий в качестве активного ингредиента высокую концентрацию ооспор *Pythium oligandrum*, который наносят на семена сахарной свеклы. Тонкий порошок препарата, описанный в патенте Вайзели, пристает к поверхности семян. Препарат состоит из высушенного и измельченного ферментированного крахмального субстрата, на котором размножен *Pythium oligandrum* в условиях, благоприятствующих споруляции, в частности в присутствии жидкой питательной среды, содержащей хлористый кальций, при облучении ферментируемого субстрата. Необходимость применения облучения и жидкой питательной среды наряду с другими факторами делает изобретение Вайзели мало жизнеспособным, а применяемый крахмальный субстрат функционирует просто как питательная среда.

Леви в патенте США N 4985251 заявил инсектицидную композицию, содержащую по

крайней мере один суперабсорбирующий твердый органический полимер, представляющий собой гидрофильный акриламидный или акрилатный полимер, и жидкий носитель, например воду или масло, что затрудняет работу с этой композицией и ее хранение. Кроме того, требование использования таких органических полимеров, как полимеры акриламида или акрилатов, в действительности подрывает истинную цель разработки биоразрушаемого пестицида.

Юнг с сотр. (французский патент N 2501229) разработали способ включения микроорганизмов в полимерную гелевую матрицу на основе сшитого полисахарида при использовании солей металлов, например, Fe, Al солей, или при синергетической обработке другим полисахаридом. Изобретение, описанное Юнгом с сотр., также использует такой абсорбент, как оксид кремния, силикоалюминаты и целлюлозу. Следовательно, процесс Юнга является не только громоздким, но также и менее экономичным.

Шигемицу в патенте США N 4647537 описал способ получения пестицида, содержащего живые биоконтролирующие микроорганизмы, с применением каррагинана; Маруа с сотр. в патенте США N 4724147 описал способ получения таблеток, содержащих живые биоконтролирующие грибы, измельченные пшеничные отруби и альгинат. Однако микробные пестициды, сформулированные в соответствии с этими известными способами, не обеспечивают достаточной адгезии к целевым объектам, таким как листья растений, листьям, стеблям и макушкам, и, следовательно, они являются менее эффективными и неэкономичными.

Известен способ получения микробных пестицидов с биополимерным покрытием, предусматривающий термическую обработку биополимера в виде зерен, природных смол при температуре 70-80°C, охлаждение биополимера до 40-45°C и смешивание охлажденного биополимерного геля с микроорганизмами (заявка EP 0097571, A 01 N 63/00, 1984).

Известен способ получения микробных пестицидов плавучего типа, предусматривающий обработку пестицида плавучим материалом, в качестве которого используют кукурузные початки (патент SU, 4563344, A 01 N 25/00, 1986).

Однако данные способы обладают вышеперечисленными недостатками.

В результате продолжает существовать необходимость в разработке незагрязняющего окружающую среду пестицида, получаемого с использованием простого экономичного процесса, который может дать микробные пестициды с широким спектром контролируемых объектов с высокой степенью эффективности.

В соответствии с настоящим изобретением обнаружено, что микробные пестициды, полученные путем создания покрытия на антагонистических микроорганизмах из природных биополимеров, могут давать желаемые результаты, обеспечивая незагрязняющий окружающую среду пестицидный эффект против широкого спектра болезней растений, вызываемых различными вредными

насекомыми и микроорганизмами, при сопутствующем устранении различных затруднений, связанных с известными биологическими пестицидами.

В частности, микробный пестицид настоящего изобретения способен эффективно поставлять свои биоактивные материалы для контроля таких объектов, как вредные насекомые, патогенные растительные грибы, сорняки и т.п. Кроме того, указанный пестицид может быть получен экономически целесообразно в соответствии с настоящим изобретением.

Способ получения микробного пестицида с покрытием включает

переработку одного или более биополимерных материалов, выбранных в группе, состоящей из микробиологически метаболизируемых природных веществ, содержащих биополимеры, и микробиологически метаболизируемых биополимеров, экстрагированных из них, и их производных, в виде геля или пасты при повышенной температуре;

охлаждение указанных переработанных биополимеров до более низкой температуры; смешивание или покрытие одного либо более антагонистических микроорганизмов в геле или пасте;

формирование и сушку покрытых биополимером микроорганизмов.

Термин "антагонистический микроорганизм" так, как он использован в настоящем изобретении, означает микроорганизм, который уничтожает такие контролируемые объекты, как вредные насекомые, патогенные для растений грибы или сорняки и т. п., путем продуцирования и выделения определенных биоактивных материалов, например, антибиотиков, которые являются селективно токсичными или разрушающими для контролируемых объектов, либо путем уничтожения контролируемых объектов, обеспечивая подавляющий или конкурирующий механизм.

"Биоактивные материалы", упоминаемые в настоящем изобретении, являются такими материалами, которые функционируют как пестициды.

Термин "пестицид" так, как он использован здесь, включает гербициды, инсектициды, альгициды, бактерициды, фунгициды, нематоциды и т.п.

Термин "микроорганизм" так, как он использован здесь, охватывает широкий спектр микроорганизмов, включая грам-отрицательные и положительные бактерии, актиномицеты, грибы, дрожжи, простейшие, водоросли и их споры и т.п. Примеры антагонистических микроорганизмов, которые могут быть применены в настоящем изобретении, включают микроорганизмы-ингибиторы патогенных грибов растений, такие как *Bacillus subtilis* подвиды *Krietiensis* ATCC 55078 и 55079, *Pseudomonas pyrocinia* ATCC 15958, *Pseudomonas fluorescence* ATCC 27663, *Gliocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440 и *Streptomyces casaoi* подвиды *asoensis* ATCC 19093; такие инсектицидные микроорганизмы, как *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, 48585 и

48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969 и *Verticillium lencanii* ATCC 46578; и микроорганизмы, контролирующие сорняки, такие как *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiae* ATCC 52634.

В способе настоящего изобретения, кроме того, используются биополимеры, изготовленные из одного или более "природных полимеров, выбранных в группе, состоящей из природных веществ, содержащих микробиологически метаболизируемые полимеры, и микробиологически метаболизируемых полимеров, извлеченных из них, и их производных.

Указанные биополимеры включают: зерна, такие как рис, пшеницу, кукурузу, ячмень, фасоль, итальянское просо, индийское просо, китайское просо (сорго) и гречиху; клубни, такие как картофель; корнеплоды, такие как сладкий картофель (батат) и касабэ; экстрагированные из них крахмалы, и их производные; и, кроме того, могут включать агар, желатину, полигалактуроновую кислоту, хитозан, карбоксиметилцеллюлозу, гелитрин, природный воск, натуральную смолу и их производные.

Биополимер, как описано выше, не только удовлетворяет традиционным требованиям к системе, эффективно доносящей пестицид, но также обеспечивает различные дополнительные преимущества:

во-первых, указанный полимер может служить источником метаболизируемой питательной среды для антагонистических микроорганизмов и, следовательно, способствует росту и размножению указанных микроорганизмов и продукции биоактивных материалов;

во-вторых, доставка пестицидных компонентов осуществляется с помощью природного процесса, т. е. антагонистические микроорганизмы находятся на природном биополимере и катаболизируют его, в результате обеспечивается замедленная выделительная система биоактивных материалов;

в-третьих, природный биополимер при переработке его в гель или пасту становится высоко адгезивным к целевым мишеням, и, следовательно, микробный пестицид, поданный в результате, может быть эффективно высвобожден на различные целевые мишени или в окружающую среду, такую как почва, вода, растения и т.п.;

в-четвертых, биополимеры, также как и микроорганизмы, происходят из природной среды, и, следовательно, применяемые микробные пестициды в основном являются незагрязняющими окружающую среду;

в-пятых, в большинстве случаев применяемые биополимеры являются дешевыми природными продуктами, которые являются доступными в избытке, следовательно, микробные пестициды изобретения могут быть приготовлены с низкой стоимостью.

Антагонистический микроорганизм может быть добавлен или покрыт предварительно переработанным гелеподобным биополимером по крайней мере в размножаемом количестве, но не в избыточном количестве, чтобы полимер выполнял свою функцию. Следовательно,

антагонистический микроорганизм применяют предпочтительно в интервале от примерно 10^4 до 10^{14} клеток, более предпочтительно 10^6 - 10^9 клеток на 1 г полностью высушенного микробного пестицида, в зависимости от использованных микроорганизма и природного биополимера.

Некоторые биополимерные материалы могут быть переведены в гель или в пасту при кипячении либо пропаривании их при температуре между 80 и 121°C в течение 10-60 мин и разминании для получения геля или пасты. Некоторые другие материалы могут быть переведены в гель или пасту при смешивании материалов с водой и последующим нагреванием при температуре между 80 и 121°C.

Указанное кипячение, пропаривание или нагревание предпочтительно проводят при стерилизующей температуре, например 121°C. Это устраняет возможность роста загрязнений, находящихся в природных полимерах, и дает возможность антагонистическим микроорганизмам иметь преимущество при колонизации.

Нагретые природные биополимеры могут быть охлаждены до температуры, являющейся комфортной для антагонистических микроорганизмов, предпочтительно находящейся между комнатной температурой и примерно 60°C.

Охлажденный гель или пасту затем смешивают с указанным одним или более антагонистическими микроорганизмами. На этой стадии культуральный бульон, содержащий антагонистические микроорганизмы, или клетки и/или споры сами по себе, выделенные из указанной культуры, могут быть смешаны с приготовленным гелем или пастой. Альтернативно лиофилизированные клетки могут быть непосредственно смешаны с указанным гелем или пастой.

Смесь антагонистических микроорганизмов и природного биополимера может быть приготовлена в виде порошка, таблеток, гранул и т.п. с использованием обычной машины для приготовления препаратовивных форм, а затем при воздушной, тепловой сушке или сушке вымораживанием получают целевой микробный пестицид.

В непрерывном способе антагонистические микроорганизмы могут быть культивированы в жидкой среде и клетки и/или споры выделяют; при этом перерабатываемые природные биополимеры могут быть смешаны с отброшенным культуральным бульоном, чтобы в результате свести к минимуму или избежать какого-либо загрязнения либо проблем сброса, и нагревают для получения гелеобразной или пастообразной матрицы. После охлаждения гелевой или пастообразной матрицы антагонистический микроорганизм покрывают ею, а покрытую матрицу формуют и сушат.

Микробный пестицид с покрытием может, кроме того, содержать одну или более добавок, таких как дополнительные питательные компоненты для ускорения роста и размножения микроорганизма либо продуцирования биоактивных материалов; и/или стабилизатор микроорганизма для защиты микроорганизма во время процесса иммобилизации и/или сушки.

Типичные стабилизаторы микроорганизмов включают глицерин, снятое молоко, молоко, сухое молоко, животное или растительное масло.

Дополнительные питательные компоненты могут включать различные источники азота и углерода, такие как порошок целлюлозы, соевую муку, муку из семян хлопчатника, различные животные или растительные пептоны, молоко, снятое молоко, порошок хитина, порошок компоста, пшеничные отруби, кукурузный экстракт, дрожжевой экстракт, мелассу, глюкозу, сахарозу, декстрин и кукурузный сироп; микроэлементы, такие как железо, марганец, цинк и кобальт; почву; экстракт почвы и другие материалы, которые являются благоприятными для повышения жизнеспособности микроорганизмов. Кроме того, в пестицид могут быть включены другие материалы, которые улучшают свойства природного биополимера.

Эти добавки могут быть присоединены к различным совокупностям, например, клеток микроорганизма и гелеобразной или пастообразной матрицы перед или одновременно со смешением. Однако предпочтительно предварительно смешивать микроорганизмы и добавки.

Микробный пестицид с покрытием может быть непосредственно внесен на почву или растение; за счет его отличной адгезии может быть нанесен на растущие растения или на их продукты при хранении либо во время их транспортировки; он также может быть нанесен вблизи корней или черенков для защиты против патогенов.

Кроме того, микробный пестицид с покрытием может быть применен для водной культуры. Для применения микробного пестицида к растущему растению в гидропонике может быть использован плавучий пестицид, получаемый покрытием плавучего материала микробным пестицидом настоящего изобретения. В настоящем изобретении могут быть применены различные природные плавучие материалы, включая разбухшие зерна; плавучие сельскохозяйственные продукты, такие как рисовые отруби, ореховая скорлупа, ячменные отруби, листья кукурузных початков, пшеничная, ячменная или рисовая солома, стебли кукурузы, стебли проса и его листья, опилки и т.п. В водной культуре заболевание обычно происходит на поверхности воды, т.е. на границе между погруженной частью и частью, выступающей из воды. Поскольку полученный таким образом пестицид плавает над поверхностью воды и прилипает к указанной линии раздела на растении, он является очень эффективным для локальной борьбы с конкретным заболеванием.

Микробный пестицид можно использовать для покрытия семян. Полученные семена защищаются от патогенов, что улучшает их всхожесть.

Далее семена растений могут быть покрыты такими микробными пестицидами настоящего изобретения, что облегчает прорастание семян. Особенно это относится к семенам, обработанным природным пестицидом, покрытым азотфиксирующими микроорганизмами, например *Rhizobium* sp., поскольку они будут иметь преимущество в

обеспечении питательными веществами от последних микроорганизмов.

В цепи событий, которые могут происходить после нанесения покрытого микробного пестицида, т.е. нанесение на почву или растение → рост и развитие антагонистического микроорганизма → продуцирование биоактивного материала → пестицидное действие, природный биополимер, кроме того, функционирует как протектор и питательная среда для антагонистического микроорганизма и, следовательно, стимулирует рост и развитие микроорганизма и продукцию биоактивного материала.

Покрытый микробный пестицид за счет его отличной адгезии может быть нанесен непосредственно на почву и растение и, следовательно, его антагонизм может продолжаться в течение длительного времени. Кроме того, поскольку природные биополимеры как и микроорганизмы происходят из окружающей среды, пестициды, полученные из них, в основном являются природными и не загрязняют окружающую среду. Более того, поскольку природный биополимер получают из очень дешевых материалов в соответствии с простым способом, настоящее изобретение является высокоэкономичным.

Следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не органичивают его область. Для специалиста должно быть очевидным, что могут быть сделаны определенные изменения в настоящем изобретении, не выходя за его пределы, как оно приведено здесь.

Пример 1. В колбу Эрленмейера емкостью 1 л вносят 200 мл стерилизованной среды (триптона 1%, дрожжевого экстракта 0,5%, NaCl 1%, глюкозы 1%, pH 7,0) и 5 мл посевой культуры (поглощение при 550 нм 0,4) *Bacillus subtilis* подвида *Krictiensis* ATCC 55079 инокулируют на ней, затем инкубируют при 37°C в течение 12 ч при встряхивании. После этого собирают клетки, используя высокоскоростную центрифугу (8000 об/мин, 10 мин, Sorvall™, GS-3 ротор) в стерильных условиях.

Каждый из природных биополимеров, приведенных в табл. 1, смешивают с водой; нагревают при температуре в интервале между 80 и 121°C в течение 10-60 мин до гелеобразного или пастообразного состояния, а затем охлаждают до комнатной температуры. На этой стадии карбоксиметилцеллюлозу и соли полигалактуроновой кислоты не подвергают термообработке, потому что они образуют гель без нагревания.

Гель или пасту, полученную выше, смешивают с шариком из микробных клеток при количестве клеток, указанном в табл. 1, и перемешивают до гомогенного состояния. Полученную в результате смесь формируют в виде гранул (диаметр 0,1-5,0 мм) и сушат на воздухе для получения целевого покрытия микробного пестицида.

Пестицид растворяют, разбавляют дистиллированной водой и распыляют на пластины с картофельным дестрозым агаром, которые затем инкубируют 24 ч при 30 °C. Подсчитывают число жизнеспособных клеток в целевом пестициде, исходя из числа

колоний, образовавшихся на агаровой пластине.

Определяют жизнеспособность (в %) из числа подсчитанных клеток до и после покрытия и сушки в соответствии со следующим уравнением, результаты приведены в табл. 1.

$$\text{Жизнеспособность, \%} = \frac{\text{Количество клеток после покрытия и сушки}}{\text{Количество клеток, инокулированных первоначально}} \times 100.$$

Как видно из табл. 1, достаточное количество *Bacillus* sp. клеток остается жизнеспособными после процесса покрытия и сушки, используемых в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 2. Готовят различные микробные пестициды с покрытием с применением *Pseudomonas fluorescence* ATCC 27663 в качестве антагонистического микроорганизма и материалов, приведенных в табл. 2 в качестве природного биополимера, работают по методике примера 1.

Количество жизнеспособных клеток подсчитывают после покрытия и сушки и определяют жизнеспособность (%) микроорганизмов в покрытом микробном пестициде, используя приведенную выше формулу. Результаты даны в табл. 2.

Как видно из табл. 2, достаточное количество клеток *Pseudomonas* sp. остается жизнеспособными после покрытия и сушки.

Пример 3. Повторяют процедуру примера 1 в стерилизованной УМ-среде (дрожжевой экстракт 3 г, солодовый экстракт 3 г, пептон 5 г, глюкоза 10 г, дистиллированная вода 1 л, pH 7,0), применяя 5 мл *Streptomyces sacaai* подвид *asoensis* ATCC 19093 (поглощение при 550 нм 0,4).

Данные по жизнеспособности клеток и количеству жизнеспособных клеток приведены в табл. 3.

Пример 4. Готовят покрытый микробный пестицид по методике примера 1 с тем исключением, что применяют *Bacillus subtilis* подвид *Krictiensis* ATCC 55078 в качестве антагонистического микроорганизма и гелевую смесь, приготовленную из картофельного крахмала, рисового порошка и агарового порошка в соотношении 6:3:1 (м/м) в качестве природного биополимера.

Количество жизнеспособных клеток в покрытом микробном пестициде, приготовленном выше, подсчитывают после процесса покрытия и сушки и измеряют жизнеспособность (%). Данные приведены в табл. 4.

Другой покрытый микробный пестицид готовят по той же методике, но с тем исключением, что используют один картофельный крахмал в качестве природного биополимера и сравнивают эти данные в табл. 4.

Как можно видеть из результатов табл. 4, жизнеспособность клеток при использовании смешанного геля будет намного выше, чем при использовании одного картофельного крахмала в качестве природного биополимера.

Пример 5. Влияние стабилизатора микроорганизма на жизнеспособность

микроорганизмов в покрытом микробном пестициде исследовалось с помощью повтора двух серий экспериментов, в одной серии было использовано снятое молоко, а в другой нет. Работали по методике примера 1, используя *Bacillus subtilis* подвид *Krietiensis* ATCC 55078. Во всех экспериментах в качестве природного биополимера используют картофельный крахмал.

Сравнительные результаты приведены в табл.5.

Как можно видеть из табл. 5, при использовании стабилизатора из микроорганизма жизнеспособность микроорганизма повышается.

Пример 6. Исследуется влияние питательных добавок на жизнеспособность микроорганизмов в покрытом микробном пестициде.

Инокулируют *Bacillus subtilis* подвид *Krietiensis* ATCC 55079 на жидкую среду (соевый порошок 1%, дрожжевой экстракт 0,5%, сахар 3%, K_2HPO_4 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05%, pH 7,0), инкубируют при 30°C в течение 18 ч и собирают клетки центрифугированием.

Для приготовления гелеобразной или пастообразной матрицы тщательно смешивают и перемешивают 1000 г кипящего картофеля и 500 г кипящего риса. В одном эксперименте к полученной смеси добавляют 200 г порошка соевой муки, 50 г снятого молока и 15 г сахара в качестве источника питания и снова перемешивают, в то время как в другом эксперименте добавки не вносят.

После этого охлаждают до комнатной температуры полученную матрицу, смешивают с 300 г влажных клеток, полученных выше, а затем формируют в гранулы диаметром от 0,1 до 5,0 мм. Полученные гранулы сушат на воздухе при комнатной температуре, чтобы получить целевой покрытый микробный пестицид.

Подсчитывают количество выживших клеток в покрытом микробном пестициде, приготовленном выше, а затем пестицид хранят при 30 °C при относительной влажности выше 90% в течение 24 ч. Затем подсчитывают количество выживших клеток для оценки влияния питательных добавок на пролиферацию покрытого микроорганизма.

Кроме того, покрытый микробный пестицид, полученный выше, инкубируют при 30°C и при относительной влажности выше 90% в течение 24 ч и стерилизуют. Затем оценивают влияние питательных добавок на продукцию биоактивного материала, т. е. антибиотиков, измеряя диаметр зоны ингибирования на картофельно-декстрозо-агаровой пластине, применяя *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* в качестве соответствующих тест-организмов.

Результаты приведены в табл. 6.

Пример 7. Определяют скорость прорастания семян, обработанных покрытым микробным пестицидом, по следующей методике.

В колбу Эрленмейера емкостью 1 л вносят 200 мл стерилизованной среды (триптон 1%, дрожжевой экстракт 0,5%, NaCl 1%, глюкоза 1%, pH 7,0) и смешивают с $1 \cdot 10^9$ клеток/мл *Bacillus subtilis* подвид *Krietiensis* ATCC

55078, затем инкубируют при 30°C в течение примерно 18 ч. После этого собирают клетки центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин, используя высокоскоростную центрифугу Sorvall (GS-3 ротор) и суспендируют в 10%-ном растворе снятого молока (объем/объем).

Замешивают крахмал с водой, нагревают при 100°C в течение 30 мин до гелеобразного состояния, а затем охлаждают до комнатной температуры.

Полученный таким образом гель смешивают с примерно 10^8 клеток/г указанным раствором снятого молока до гомогенного состояния. Затем смесь формируют в гранулы с диаметром от 0,1 до 5,0 мм и сушат на воздухе при комнатной температуре, чтобы получить целевой покрытый микробный пестицид.

Обработывают 100 семян риса покрытым микробным пестицидом, полученным выше, а затем высевает в стерилизованную, обогащенную питательными веществами почву наряду со 100 необработанными семенами; все они были инкубированы в течение 15 дн при температуре 25-28°C. После этого подсчитывают число проросших семян, а всхожесть рассчитывают как процент проросших семян к общему количеству посеянных семян. Результаты приведены в табл. 7.

Пример 8. Исследуют защитное действие покрытого микробного пестицида плавающего типа на пирикулярноз риса и загнивание оболочки по следующей методике.

Загружают 8 л жидкой среды (соевая мука 2%, глюкоза 1%, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,005%, NaCl 0,05%, pH 7,0) в ферментер емкостью 15 л и инокулируют туда 200 мл *Bacillus subtilis* подвид *Krietiensis* ATCC 55079 (поглощение при 550 нм 0,4), затем инкубируют при 30°C в течение 48 ч. Затем концентрируют шарик клеток центрифугированием в стерильных условиях и суспендируют в 500 мл 10%-ного (объем/объем) стерилизованного раствора снятого молока.

Прибавляют 7,5 л полученной надосадочной жидкости, из которой были выделены клетки указанного микроорганизма, к 800 г картофельного крахмала, 200 г муки индийского проса, 200 г порошка муки семян хлопчатника и 15 г глюкозы; нагревают до 100 °C при перемешивании до пастообразного состояния и охлаждают до комнатной температуры.

Полученную пасту смешивают с 500 мл раствора, где клетки суспендируют до гомогенного состояния. После этого смесь формируют в виде гранул размером от 0,1 до 5,0 мм и покрывают сухие измельченные листья травы при комнатной температуре для получения желаемого покрытого микробного пестицида плавающего типа.

Определяют количество жизнеспособных клеток в покрытом микробном пестициде, полученном выше, равном $8 \cdot 10^{11}$ клеток/г.

Приведенный выше пестицид подвергают следующему эксперименту, предназначенному для измерения его превентивной эффективности от болезней.

Рис культивируют в горшках с достаточной подачей воды и, когда он вырастает до высоты 150 см, инокулируют листья растений риса *Pyricularia oryzae*, чтобы вызвать у

риса пирикулярноз. Затем распыляют на поверхность воды покрытый микробный пестицид плавающего типа в количестве 2 г на горшок, каждый горшок помещают в условия влажного насыщения при температуре в интервале от примерно 25 до 27°C, а необработанные растения риса также помещают в такие же условия. Через две недели измеряют большую поверхность на листьях риса как в обработанной, так и в необработанной группе, используя стандартную шкалу, определенную в табл. 8. Из измерения вычисляют защищающую дозу (%) при использовании следующего уравнения, результаты приведены в табл. 9.

$$\text{Защищающая доза (\%)} = \left[1 - \frac{\text{площадь заболевания (\%)} \text{ в обработанной группе}}{\text{площадь заболевания (\%)} \text{ в необработанной группе}} \right] \times 100.$$

Пример 9. Пестицидную активность покрытого микробного пестицида сравнивают с таковой для промышленного продукта, в частности процимидона.

Готовят покрытый микробный пестицид ($8 \cdot 10^{11}$ *Bacillus subtilis* жизнеспособных клеток на 1 г пестицида) в соответствии с методикой примера 8.

Для того чтобы оценить контролирующее действие указанного пестицида на серую гниль у клубники, распыляют 50 г указанного пестицида на грядку (500 см $\cdot$ 60 см), где выращивают клубнику (сорт Хоковаз) до зрелости, два раза с интервалом 7 дн. Затем определяют дозу воздействия через 1 и 2 недели после распыления. Дозу воздействия вычисляют как процент количества сгнивших ягод к общему количеству ягод. Результаты приведены в табл. 10.

Для сравнения распыляют 2,5 г процимидона, затем определяют дозу воздействия таким же образом. Результаты приведены в табл. 10.

Формула изобретения:

1. Способ получения микробного пестицида с биополимерным покрытием, предусматривающий смешивание с водой и нагревание биополимера для получения геля или пасты, охлаждение геля или пасты и смешивание с микроорганизмом, отличающийся тем, что нагревание смеси биополимера с водой осуществляют до температуры 80-121°C, а охлаждение - от комнатной температуры до 60°C, из микроорганизмов используют один из нижеперечисленных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Kriciensis ATCC 55078 или 55079, *Pseudomonas fluorescense* ATCC 27663, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, штаммов микромицетов *Glocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, *Beauveria bassiana* ATCC 48585, *Beauveria bassiana* 48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussialas* ATCC 52634 или штамм актиномицета *Streptomyces cacaio* asoensis ATCC 19093 в количестве

10^4 - 10^{14} клеток на 1 г пестицида, а в качестве биополимера используют зерна, или клубни, или корнеплоды, или крахмал, экстрагированный из них, или гельрит, или природные воск и смолы, или их производные, полученную смесь геля или пасты полимера с микроорганизмом формируют и сушат, получая при этом целевой продукт - микробный пестицид.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно вводят стабилизатор и питательную добавку для микроорганизмов, при этом в качестве стабилизатора используют глицерин, молоко, снятое молоко, сухое молоко, масло растительного или животного происхождения, а в качестве питательной добавки - соевую муку, муку из семян хлопчатника, пептоны из животного и растительного сырья, молоко, снятое молоко, порошкообразные хитин и компост, пшеничные отруби, дрожжевой экстракт, мелассу, глюкозу, сахарозу, декстрин, кукурузный экстракт, железо, марганец, цинк, кобальт, почву, экстракт почвы, при этом стабилизатор и добавку вводят перед стадией смешивания охлажденного геле- или пастообразного биополимера с микроорганизмом или во время указанной стадии смешивания.

3. Микробный пестицид с биополимерным покрытием, содержащий микроорганизм и гель биополимера, отличающийся тем, что из микроорганизмов пестицид содержит один из нижеуказанных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Kriciensis ATCC 55078 или 55079, *Pseudomonas fluorescense* ATCC 27663, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367, штаммов микромицетов *Glocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, *Beauveria bassiana* ATCC 48585, *Beauveria bassiana* 48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaeeas* ATCC 52634 или штамм актиномицета *Streptomyces cacaio* asoensis ATCC 19093 в количестве 10^4 - 10^{14} клеток на 1 г пестицида, а в качестве биополимера-зерна, или клубни, или корнеплоды, или крахмал, экстрагированный из них, или гельрит или природный воск и смолы, или их производные.

4. Способ получения микробного пестицида плавающего типа путем обработки микробного пестицида материалом, обладающим плавучестью, отличающийся тем, перед обработкой микробного пестицида материалом, обладающим плавучестью, осуществляют смешивание с водой биополимера, в качестве которого используют зерновые, или клубни, или корнеплоды, или крахмал, экстрагированный из них, или гельрит, или природные воск и смолу, или их производные, нагревание смеси до температуры 80-121°C для образования геля или пасты, охлаждение полученного геля или пасты до температуры в интервале от комнатной до 60°C, смешивание охлажденного геля или пасты с одним из нижеперечисленных микроорганизмов штаммов бактерий *Bacillus subtilis* kriciensis ATCC 55078 или 55079,

Pseudomonas fluorescence ATCC 27663, *Bacillus thuringiensis* ATCC 13367 или микромицетов *Gliocladium virens* ATCC 52045, *Trichoderma reesei* ATCC 28217, *Trichoderma harzianum* ATCC 52445, *Trichoderma hamatum* ATCC 52198, *Trichoderma viride* ATCC 52440, *Beauveria bassiana* ATCC 26851, 48585, 48023, *Hirsutella thomsonii* ATCC 24874, *Metarhizium flavoviride* ATCC 32969, *Verticillium lencanii* ATCC 46578, *Collectotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussialas* ATCC 52634, или актиномицета *Streptomyces cacaoi* *ascoensis* ATCC 19093 в количестве

10^4 - 10^{14} клеток на 1 г пестицида, затем полученную смесь формуют и сушат, получая при этом микробный пестицид с биополимерным покрытием, а обработке материалом, обладающим плавучестью, подвергают пестицид с биополимерным покрытием, при этом в качестве материала, обладающего плавучестью, используют разбухшие зерна, рисовые отруби, ореховую скорлупу, ячменные отруби, оберточный лист кукурузного початка, ячменную смолу, кукурузные стебли, стебли проса, листья, опилки, рисовую или пшеничную солому.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Жизнеспособность микробных пестицидов с покрытием, применяющих *Bacillus* SP.

Природный биополимер	Количество клеток, введенных первоначально (клетки/г)	Количество клеток после покрытия/сушки (клетки/г)	Жизнеспособность (%)
1	2	3	4
Фасоль	2×10^{10}	1×10^9	5
Просо итальянское	2×10^{10}	8×10^6	0,04
Сорго	2×10^{10}	2×10^9	10
Кукурузный крахмал	1×10^{10}	1×10^6	0,01
Пшеница	1×10^{10}	5×10^7	0,5
Ячмень	2×10^{10}	1×10^7	0,05
Рис	2×10^{10}	1×10^7	0,05
Картофельный крахмал	1×10^{10}	4×10^6	0,04
Батат	2×10^{10}	$1,5 \times 10^8$	0,80
КМЦ ^{а)}	2×10^{10}	7×10^7	0,4
Полигалактуроновая кислота	2×10^{10}	1×10^5	0,0005
Желатин	2×10^{10}	1×10^5	0,0005
Агар	1×10^{10}	$1,3 \times 10^6$	0,01
Гуммиарабик	2×10^{10}	7×10^8	3,5
Гельрит	2×10^{10}	2×10^7	0,10
Хитозан + КМЦ ^{а)} (1:1, м/м)	2×10^{10}	5×10^8	2,5
Гречиха	2×10^{10}	9×10^8	4,5
Касабе	2×10^{10}	9×10^8	4,5

Примечание: а) карбоксиметилцеллюлоза.

Таблица 2

Жизнеспособность покрытых микробных пестицидов с применением *Pseudomonas* SP.

Природный биополимер	Количество клеток, добавленных первоначально (клетки/г)	Количество клеток после процесса покрытия/сушки (клетки/г)	Жизнеспособность (%)
Сорго	1×10^9	8×10^6	0,8
Картофельный крахмал	1×10^9	9×10^6	0,9
Крахмал батата	1×10^9	2×10^8	20
Касабе	1×10^9	6×10^6	60

Таблица 3

Жизнеспособность покрытых микробных пестицидов с применением *Streptomyces* SP.

Природный биополимер	Количество клеток, добавленных первоначально (клетки/г)	Количество клеток после процесса покрытия/сушки (клетки/г)	Жизнеспособность (%)
Фасоль	6×10^9	$2,2 \times 10^7$	0,4
Картофельный крахмал	5×10^9	$1,2 \times 10^7$	0,2
Рис	6×10^9	$5,8 \times 10^6$	0,1
Гельрит	6×10^9	1×10^5	0,002
Почва	6×10^9	$1,4 \times 10^8$	2,0
Хитозан + СМС ^а (1:1, м/м)	6×10^9	3×10^8	5,0
Касабе	6×10^9	$1,8 \times 10^5$	3,0

Таблица 4

Жизнеспособность микробных пестицидов с покрытием с применением смешанного природного биополимера (картофельный крахмал + рисовый порошок + агаровый порошок) и одного природного биополимера

Природный биополимер	Количество клеток, добавленных первоначально (клетки/г)	Количество клеток после процесса покрытия/сушки (клетки/г)	Жизнеспособность (%)
Картофельный крахмал + рис + агаровый порошок (6:3:1, масс/масс)	$2,0 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^9$	0,2
Один картофельный крахмал	$1,1 \times 10^{10}$	4×10^8	0,04

Таблица 5

Влияние стабилизатора на основе микроорганизма на жизнеспособность микроорганизмов

Микроорганизм	Стабилизатор (снятое молоко)	Количество клеток, добавленных первоначально (клетки/г)	Количество клеток после процесса покрытия/сушки (кл./г)	Жизнеспособность (%)
<i>Bacillus subtilis</i> подвид <i>Krietiensis</i>	добавлен	$4,0 \times 10^{14}$	$2,5 \times 10^{14}$	63
ATCC 55078	не добавлен	$5,7 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^8$	0,006

Таблица 6

Влияние питательных добавок на пролиферацию клеток
и продукцию биоактивного материала

Питательные добавки	Пролиферация клеток		Продукция антибиотика (через 24 часа)		
	Во время 0	После 24 ч ингибирования	Зона ингибирования (мм)		
			P _a	R ^a	B ^c
Не добавлены	4 · 10 ⁸	5 · 10 ⁵	10	13	0
добавлены	9 · 10 ⁷	4 · 10 ⁸	17	20	19

Примечание: P_a: *Pyricularia oryzae*
R^a: *Rhizoctonia solani*
B^c: *Botrytis cinerea*

Таблица 7

Сравнение степени прорастания обработанных и необработанных семян

Степень прорастания обработанных семян (%)	Степень прорастания необработанных семян (%)
91	73

Таблица 8

Стандартная шкала оценки заболевания

Процент площади заболевания листа	Состояние болезни
0,0%	Не наблюдается площади заболевания
0,2%	Изредка наблюдаются небольшие заболевшие участки на старых листьях
0,5%	Изредка наблюдаются небольшие заболевшие участки как на старых, так и на новых листьях
1,0%	В среднем наблюдается один больной участок на двух или трех листьях
2,0%	В среднем наблюдается один больной участок на одном листе
5,0%	Наблюдаются два или три больных участка на одном листе или полное распространение больных участков
11,0%	Новые листья очень сильно скручены
25,0%	Тело растения скручено
55,0%	Растения сильно скручены или усохли, или верхние листья заметно повреждены
100%	Растения полностью высохли или погибли

Таблица 9

Защитное действие микробного пестицида с покрытием
на пилюляриоз риса и гниль оболочки риса

Заболевание	Обработка	Площадь заболевания листа или оболочки (%)	Защищающая доза (%)
Пилюляриоз риса	Обработанная группа	4,0	87
	Контрольная группа (необработанная)	30,0	0
Загнивание оболочки риса	Обработанная группа	1,7	81
	Контрольная группа (необработанная)	9,0	0

Таблица 10

Сравнения степени воздействия микробного пестицида с покрытием и процимидона

	Воздействие через 1 неделю после опыления (%)	Воздействие через 2 недели после опыления (%)
Покрытый микробный пестицид - обработанная группа	10	24
Процимидон - обработанная группа	13	32
Контрольная группа (необработанная группа)	20	61

RU 2113794 C1

RU 2113794 C1