



(19) **KG** (11) **423** (13) **C2** (46) **30.06.2025**

(51) *A01N 63/04* (2025.01)
C12N 1/14 (2025.01)
C12R 1/645 (2025.01)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИННОВАЦИЙ
ПРИ КАБИНЕТЕ МИНИСТРОВ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(21) 20240015.1

(22) 10.05.2024

(46) 30.06.2025. Бюл. № 6

(76) Доолоткелдиева Тинатин

Доолоткелдиевна

Бобушова Сайкал Токтосуновна

Исмаилова Элита Эрнестовна

Конурбаева Махабат Уларбековна (KG)

(56) Гештовт Н. Ю. Энтомопатогенные
грибы. Биотехнологические аспекты.

- Алматы, 2002, с. 123-124

(54) **Штаммы энтомопатогенного гриба
Beauveria bassiana Lepid-2018 и BT-2020 для
создания промышленной формулы био-
пестицида и использования её в защите
сельскохозяйственных культур от сосущих
и корнегрызущих вредителей**

(57) Изобретение относится к сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии, касается биологических средств для защиты сельскохозяйственных растений от сосущих и корнегрызущих вредителей и представляет собой штаммы энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*, Lepid-2018 и BT-2020 из лабораторной коллекции Отделения защиты растений Кыргызско-Турецкого университета «Манас». Эти штаммы могут быть использованы для создания микробиологического инсектицида с широким спектром действия и пригодного для обработки различных видов сельскохозяйственных культур против опасных сосущих и корнегрызущих вредителей. Тем самым изобретение позволяет повысить урожайность сельскохозяйственных растений.

Использование энтомопатогенных микроорганизмов для борьбы с насекомыми-вредителями сельскохозяйственных растений представляется перспективной альтернативой химическим инсектицидам. В этом аспекте микроскопические грибы, по сравнению с бактериями и вирусами, интересны, главным образом по двум причинам: 1) отсутствие узкой специализации по отношению к насекомым-мишеням у большинства штаммов; 2) для запуска инфекционного процесса достаточно попадания споры гриба на наружные покровы насекомого. На первом этапе инфекционного процесса конидия гриба адгезируется на кутикулу насекомого гидрофобных неспецифических посредством электростатических взаимодействий. Затем конидия прорастает, формируя в большинстве случаев аппрессорий, который разрывает кутикулу. Как только гриб дорастает до гемолимфы, его клетки приобретают дрожжеподобную форму (так называемые гифальные тельца), которые поэтапно поражают ткани хозяина, приводя в итоге к мумификации насекомого. Эти клетки также могут продуцировать вторичные метаболиты с иммуносупрессивной активностью, усиливающие развитие грибной инфекции. Мумифицированное насекомое является источником инфекции для других насекомых, что в ряде случаев может приводить к возникновению эпизоотий.

1 н. п. ф., 1 диагр., 8 рис.

(19) **KG** (11) **423** (13) **C2** (46) **30.06.2025**

3

Изобретение относится к экологической биотехнологии и сельскохозяйственной микробиологической промышленности.

Наиболее близким техническим решением (прототипом) являются следующие патенты: Экспериментальные препаративные формы препарата *B. bassiana* производятся в США (под названием Биотрол), во Франции (Колеопе), в Чехии (Боверол, Боверосил) и в бывшем СССР (боверин зерновой). Среди коммерческих микоинсектицидных препаратов следует упомянуть Botano Gard®, Mycotrol™-GH-OF, Mycotrol™-GHES, Mycotol®, Cornelia® Naturales-I™, Bio-2561, AFSEF-201, BB-1200 (<http://www.DiperDat.co.nz/biotech.html>).

Известен штамм *Beauveria bassiana* ЦК МК "Б" N ЦКМ Б-54Ц, (патент РФ 2034469) для получения энтомопатогенного препарата, обладающий повышенной продуктивностью и терморезистентностью. Среди чувствительных к нему пять видов насекомых указаны трипе, оранжерейная белокрылка и паутинный клещ. Препарат получали в жидкой форме содержащую 1 % технической глюкозы, 3 % глицерина и 7 % гидролизата БВК. Недостатком является способ культивирования на дорогих питательных средах.

Известна биопестицидная композиция для борьбы с муравьями рода *Solenopsis* (Патент США 4925663), которая содержит гриб *Beauveria bassiana* № 447, АТСС 20872, и носитель (рис или измельченный рис). Используется в жидкой, порошкообразной, гранулированной формах внесением как приманка с порошком или гранулированным носителем вместе с маслом (нефтепродуктом) или любым другим аттрактантом в почву, окружающее гнездо. Недостатком является низкопроизводительный поверхностный способ культивирования на сложных и дорогих питательных средах.

Известен способ получения энтомопатогенного препарата (RU 2035144 C1, 1995) путем глубинного культивирования микроскопических грибов (*Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* или *Metarhizium anisopliae*) на питательной среде, содержащей глюкозу, глицерин, гидролизат белково-витаминного концентрата, мел и воду. Культуральную жидкость концентрируют и получают препарат в жидком или сухом виде, при этом для получения препарата в жидком виде в кон-

4

центрат вводят глицерин и поливинилпирролидин или полиэтиленоксид, а для получения сухого препарата в концентрат вводят смесь цеолита типа NaX и монтмориллонита или палыгорскита, затем гранулируют и сушат. Недостатками этих препаратов и способов их получения являются снижение жизнеспособности спор, короткий срок хранения этих препаратов в жидком виде или дороговизна сухих препаратов, а также необходимость длительного культивирования грибов и многостадийность способов получения.

Известна композиция для борьбы с личинками жуков-щелкунов (патент РФ 2311778), содержащая твердый носитель и микробиологический источник лизина, а также маточную культуру энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* P-65 и янтарную кислоту. Известна микробная композиция для борьбы с личинками жуков-щелкунов (патент РФ 2311768), содержащая твердый носитель и микробиологический источник лизина, а также равнообъемную смесь маточных культур энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* F-65 и *Metarhizium anisopliae* var, *anisopliae* F-596 и янтарную кислоту. Недостатками этих препаратов и способов их получения являются снижение жизнеспособности спор, дороговизна препаратов.

Известен штамм гриба *Beauveria bassiana* В-2I (Гештовт Н. Ю. Энтомопатогенные Грибы. Биотехнологические аспекты. - Алматы, 2002, с. 123-124). Основным недостатком указанного штамма является проявление им активности при умеренных температурах (20-25°) и высокой влажности (более 80 %), что существенно снижает эффективность использования препарата в условиях континентального Казахстана. Задачей изобретения является получение нового штамма, обладающего более высокой активностью в условиях Казахстана в отношении насекомых-листоедов, в частности, колорадского жука.

Общим недостатком перечисленных изобретений является ограниченность или неопределенность спектра насекомых-вредителей, против которых эффективно применение указанных штаммов *Beauveria bassiana* в условиях Кыргызстана, так как характеризуются с несовпадением оптимума развития штаммов с климатическими условиями Республики.

5

Предлагаемые нами штаммы *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 отличаются от существующих прототипов, тем, что они обладают высокой биологической активностью по отношению к сосущим и корнегрызущим вредителям и его производство не предусматривает использования дефицитного и дорогостоящего сырья и материалов, так как данный биопрепарат будет производиться на растительных отходах (кукурузная крупа, ячменная крупа, пшеничные отруби, овсяная хлопья, и т. д.). При выращивании гифы и мицелий гриба полностью покрывают вышеуказанные питательные субстраты и образуют высокое содержание спор в течение 14-18 дней.

А также, обладает двойным эффектом на растения: против вредителей как биоинсектицид и как биостимулятор для повышения всхожести семян, ускоряет рост и развития всходов сельхоз растений.

При создании данного изобретения ставилась задача выделение и отбор природного энтомопатогенного штамма гриба, поражающего широкий спектр насекомых-вредителей в открытом и закрытом грунте.

Задача решается получением новых штаммов *Beauveria bassiana* обладающие высокоактивными биоинсектицидными и биостимуляторными свойствами из природных источников Кыргызстана.

Заявленные штаммы имеют культурально-морфологические признаки. При температуре 25 °С на картофельно-декстрозном агаре и среде Сабуро при расसेве суспензии конидий видимые невооруженным глазом колонии появляются на третьи сутки роста и имеют диаметр не более 3 мм. Колонии растут достаточно медленно, достигая диаметра 38-42 мм к 14 суткам роста. Колонии белого цвета, бархатистые, довольно плотные, прилегают к поверхности среды, мицелий врастает в агар на небольшую глубину; с возрастом колонии становятся мучнистыми. Колонии белого цвета независимо от возраста культуры, обратная сторона - желтоватая. Штамм не продуцирует растворимых пигментов; выделение экссудата также не характерно.

Микроморфология у штаммов *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 имеет вегетативные гифы септированные, разветвленные, бесцветные, с гладкими стенками, 1-2 мкм шириной. Конидиеносцы одиночные, но собраны в плотные мутовки из 4-5 и более

6

штук, с расширенным основанием и тонкой вытянутой вершиной с зигзагообразным недетерминированным рахисом, образуются латерально на воздушных гифах. Конидии бесцветные, несептированные, с тонкими гладкими стенками, имеют размер 2-3 мкм, форму, близкую к сферической, иногда со слабо заметной выемкой у основания. При поверхностном росте воздушные конидии агрегированы в сферические кластеры среди воздушного мицелия и имеют высокогидрофобную оболочку. При глубинном культивировании штамма происходит образование бластоспор, форма которых зависит от состава питательной среды и возраста культуры и может быть вытянутой (почти палочковидной), овальной, лимоновидной, округлой, подобной кофейным зернам (рис. 1).

Макроморфология на плотных питательных средах, колонии на агаризованной среде Чапека округлые, ватообразные, слегка приподнятые, белого цвета, толщиной 1,5-6 мкм, диаметром 15-19 мм на 10-е сутки культивирования. Агар не окрашивают.

Колонии на среде Сабуро белого цвета, позднее слегка желтеют, агар не окрашивают, пушистые, синнем не образуют. Состав среды Сабуро (г/л): глюкоза - 40, пептон - 10, агар-агар - 18, вода водопроводная - 1000 мл.

Хранение на скошенной агаризованной среде, при температуре +4 °С. Пересев два раза в год. Используется модифицированная среда Сабуро.

Физиолого-биохимические признаки штамма является аэробом, сапротрофом, при контакте с насекомыми - активным энтомопатогеном.

Для роста оптимальной является температура 25-27 °С, при этом на питательных средах штамм может расти в диапазоне температур от +12 до +35 °С. Оптимальные значения pH среды находятся в пределах 6,7-7,5, рост отмечается при значениях pH среды от 3,0 до 9,0.

В качестве источника углерода и энергии утилизирует глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, гликоген, крахмал, глицерин, полисорбаты 20-80, природные жиры растительного и животного происхождения.

В качестве источника азота *Beauveria bassiana* может использовать соли аммония, нитраты, мочевины, органический азот в виде аминокислот и пептидов.

7

Изобретение иллюстрируется следующими конкретными примерами:

Пример 1. Использование заявляемых штаммов для получения энтомопатогенного препарата (рис. 1).

Твердый субстрат (сечки зерен пшеницы, ячменя, риса и кукурузы) подвергают стерилизации в течение 40 мин перегретым паром при 121 °С 2 ат.м. Затем охлаждают и проводят засев спорами боверии, укрывают пленкой. Экспозиция культуры составляет 14-20 суток. После получения обильного белого конидиального налета (спороношения) высушивают культуру с остатками субстрата и размалывают до мелкодисперсного порошка. Готовая продукция препарата содержит $25 \cdot 10^9$ спор на 1 гр среды. Хранится в холодильнике при температуре 4 °С, 6 месяцев.

В процессе культивирования использовали следующее технологическое оборудование и материалы:

1. Автоклав JSAC-60.
2. Ламинар-бокс JSCB-I800SL.
3. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г и пределом допускаемой погрешности ± 2 мг для взвешивания реактивов.
4. Шкаф сушильный. NE9-112S.
5. Термостаты электрические для выращивания культур грибов с автоматическим терморегулятором до температуры 35 °С и с ценой деления 0,2 °С. NB-205VQ.
6. Холодильник бытовой электрический.
7. Вортекс.
8. Микроскоп световой биологический с увеличением в 900х - 1000х раз.
9. Счетная камера - Тош chamber, Neubauer chamber.
10. Блендер.
11. pH-метр с пределом допускаемой погрешности не более 0,05 ед. pH. pH метр pH - 410 № ND 12256.
12. Дистиллятор. ELGA Lab Water PURELAB UNQ II.
13. Potter Precision laboratory Spray Tower.

Пример 2. Производство биомассы конидий штаммов *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 на дешевых питательных средах. Изучаемые штаммы показали разную способность продуцирования конидий на разных составах, что свидетельствует о разной фи-

8

зиологической потребности к питанию в зависимости от питательных веществ, имеющихся в составе пищевых отходов. Было обнаружено, что штаммы *Beauveria bassiana* хорошо растут на кукурузной крупе и на рисе, полностью покрывая данную среду и образуя плотный ватообразный мицелий с обильными конидиями.

Наилучшее спорообразование отмечено на кукурузной крупе, штамм BT-2020 образовал $25 \cdot 10^9$ спор/мл, а штамм Lepid-2018 образовал $23 \cdot 10^9$ спор/мл, тогда как на рисовой среде Lepid-2018 смог продуцировать $24 \cdot 10^9$ спор/мл, штамм BT-2020 $23 \cdot 10^9$ спор/мл. Количество спор гриба *Beauveria bassiana* в 1 мл препарата подсчитывали с помощью камеры Neubauer. Полученные биомассы содержащие конидии упаковали в бумажные пакеты и хорошо просушили в сушильном шкафу при температуре 30-31 °С (1-1,5 часа). После высыхания биомассу размельчали и превратили в порошок. Готовый биопрепарат хранили в холодильнике при температуре 4 °С (рис. 3-5).

Пример 3. Тестирование биологической активности биопрепарата на основе штаммов *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 против тлей в тепличных условиях. Эффективность биологического агента - *Beauveria bassiana* (B.b) в лабораторных условиях проводилась на популяциях яблоневой тли (*Aphis pomi*) и персиковой тли (*Myzus persicae*). Испытания проводились методом опрыскивания листьев растений, где вышеуказанные вредители были локализованы. Особи в возрасте нимфы оказались более восприимчивы к действию (B.b) (рабочий препарат 1×10^8 КОЕ/мл), их гибель начиналась на вторые-третьи сутки, на седьмые сутки достигала от 82 до 90 ± 0.95 %ной гибели (диаграмма 1).

При испытании суспензии биопрепаратов штаммов *Beauveria bassiana* в дозе 1×10^9 конидий/мл при трехкратной повторности опыта на личиночной и взрослой стадиях тли (*Aphis pomi*) проверяли количество погибших и ослабленных особей под микроскопом в течение семи суток. Поддержание влажности до 80 % позволило повысить эффективность грибковых препаратов. Микоз, покрывающий тело насекомых мицелием, начался через 48 часов. Летальность через 72 часа составила $50-55 \pm 1,01$ % при использовании штаммов. На седьмой день смертность от обработки

9

штаммами ВТ-2020 составила $90 \pm 1,27 \%$, ($P < 0,05$) у тестируемых вредителей. Погибшие особи были покрыты белым пушистым мицелием гриба, явно свидетельствующий об микозе вредителя при заражении контактным способом (рис. 6).

При наличии вредителей на растениях до обработки как в опытном, так и в контрольном вариантах использовали формулу:

$$\text{БЭ} = \frac{\text{Ои} \times \text{К} - \text{О} \times \text{Ки}}{\text{ОиКи}} \times 100 \%$$

где БЭ - биологическая эффективность, %; Ои, О - плотность вредителей на опытном участке (исходная и на дату учета), экз/м², Ки, К - плотность вредителей на контрольном участке (исходная и на дату учета), экз/м², экз/растение.

Пример 4. Биологическая эффективность биопрепарата на основе штаммов Lepid-2018 и ВТ-2020 *Beauveria bassiana* против белокрылки в лабораторных условиях. Эффективность биологического агента - *Beauveria bassiana* в лабораторных условиях проводилась против белокрылки. Из сухой биомассы штаммов готовили суспензии в теплой (25 °С) стерильной воде с добавлением 0.01 % Twin 80 и суспензии разбавляли до концентрации 1×10^9 конидий/мл с помощью гемоцитометра.

При однократном опрыскивании гибель насекомых доходила до $45-50 \pm 1,35 \%$ при влажности 60 % внутри теплицы. Для повышения эффективности энтомопатогенного гриба необходимо поддерживать влажности до 80 %. Через 10 дней проводили второе обильное опрыскивание, содержащее 4.2×10^9 кони-

10

дий в/мл. Через трое суток после второй обработки гибель личинок доходила до $80 \pm 1,41 \%$, а имаго до $71 \pm 1,13 \%$ при использовании биопродукта на основе штамма Lepid-2018. При опрыскивании суспензией биопродукта на основе штамма ВТ-2020 смертность личинок составила $76 \pm 1,27 \%$, имаго - $65 \pm 1,15 \%$; $77 \pm 1,17 \%$ личинок и $67 \pm 1,23 \%$ имаго соответственно ($P < 0,05$) (рис. 7).

Пример 5. Тестирование биопрепарата на основе штаммов Lepid-2018 и ВТ-2020 *Beauveria bassiana* на рост стимулирующий эффект овощных культур. При применении штаммов *B. bassiana* поливом вокруг корневой системы молодых растений по 20 мл суспензии препарата три раза во вегетационном периоде многообещающие результаты были получены для томатов, фасоли и огурцов: два протестированных штамма оказали влияние на рост растений. Сильный рост стимулирующий эффект показал штамм ВТ-2020, а штамм Lepid-2018 показал умеренный эффект. Получившие суспензии препарата *Beauveria bassiana* через подпитки почвы вокруг корневой системы растения опережали на 10-12 см по росту побегов, чем контрольные (рис. 8). Эти результаты указывают на возможность применения этого препарата через почву для получения двойного эффекта: против корнегрызущих вредителей и как ростостимулирующий биоинокулянт.

Таким образом, биопрепарат, созданный на основе энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и ВТ-2020 и предназначен для защиты сельскохозяйственных культур от сосущих и корнегрызущих насекомых-вредителей.

11

Формула изобретения

Штаммы энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 для создания промышленной формулы биопестицида и использования её в защите сельскохозяйственных культур от сосущих и корнегрызущих вредителей отличаются тем, что обладают высокой биологической активно-

12

стью по отношению к сосущим и корнегрызущим вредителям, его производство не предусматривает использования дефицитного сырья, и применяются для эффективной борьбы из расчета 1×10^9 конидий/мл, путем опрыскивания 2-3 раза в течение вегетации растений.

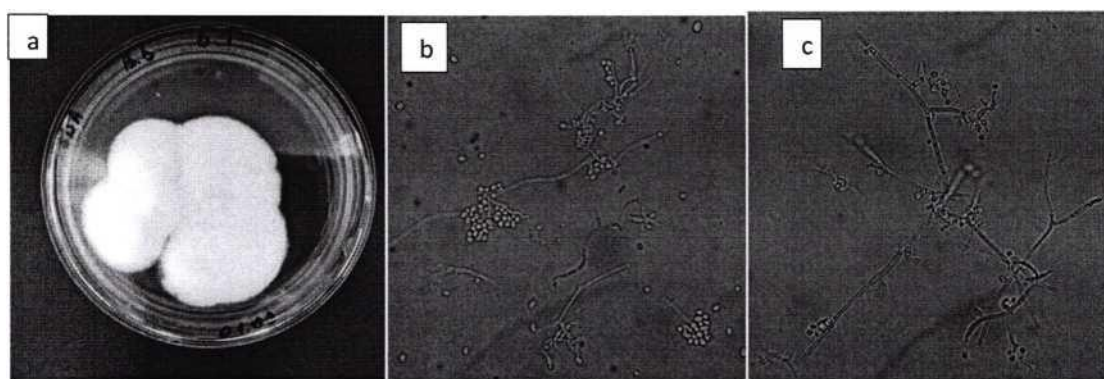
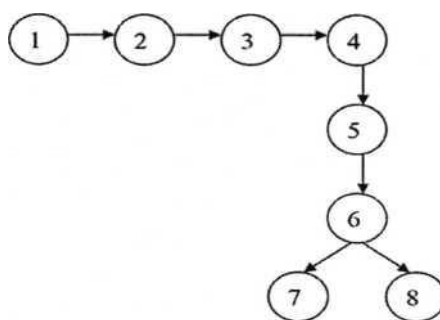


Рис. 1. *Beauveria bassiana* Lepid-2018 и BT-2020 на среде КДА (картофельно-декстрозный агар): а - чистая культура гриба, б - споры, с - гифы и фиаиды



1 - приготовление питательной среды; 2 - стерилизация искусственной питательной среды (ИПС); 3 - засев ИПС спорами боверии; 4 - экспозиция культуры; 5 - высушивание среды с конидиями; 6 - разведение высушенного субстрата с конидиями; 7 - хранение сухого препарата; 8 - применение

Рис. 2. Блок-схема получения препарата на твердых питательных средах методом поверхностного культивирования

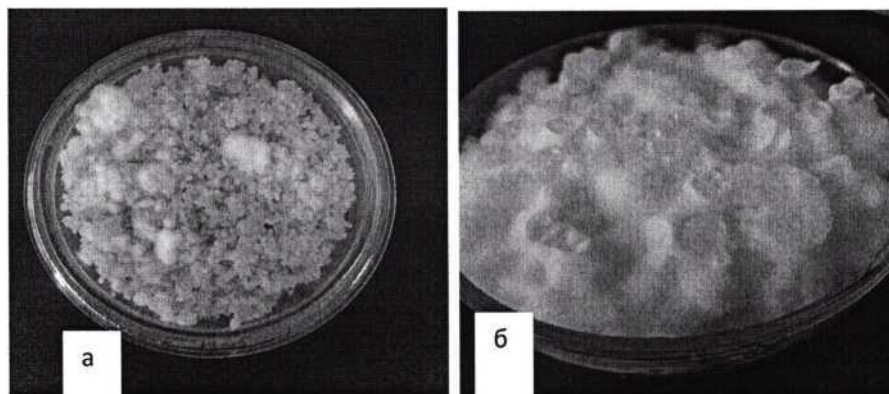


Рис. 3. Получение биомассы конидий гриба на кукурузной крупе: а - 3 дня, б - 14 дней

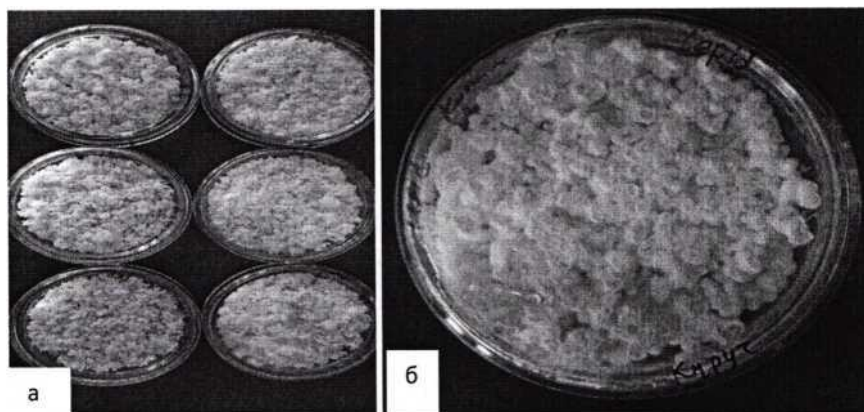


Рис. 4. Получение биомассы конидий гриба на рисе: а - 5 дней, б - 14 дней

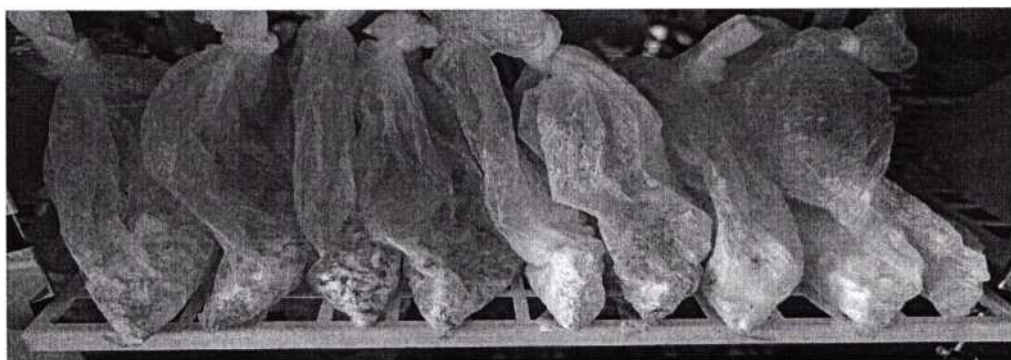


Рис. 5. Массовое производство в полиэтиленовых пакетах на растительных зернах

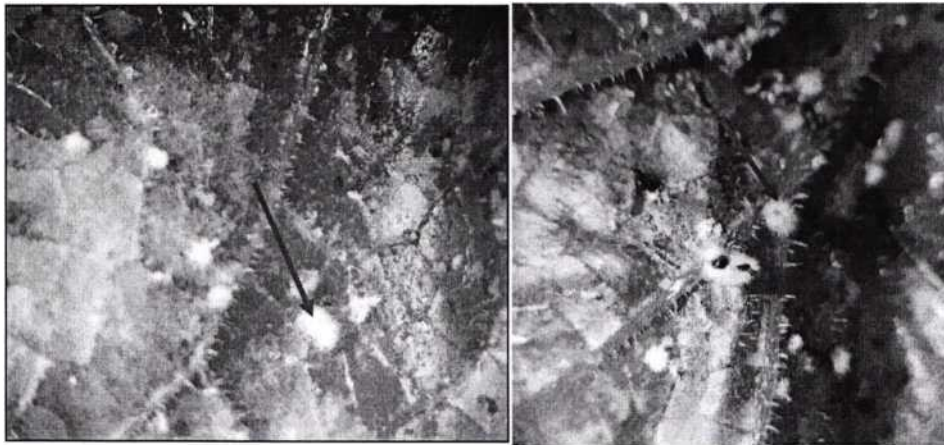
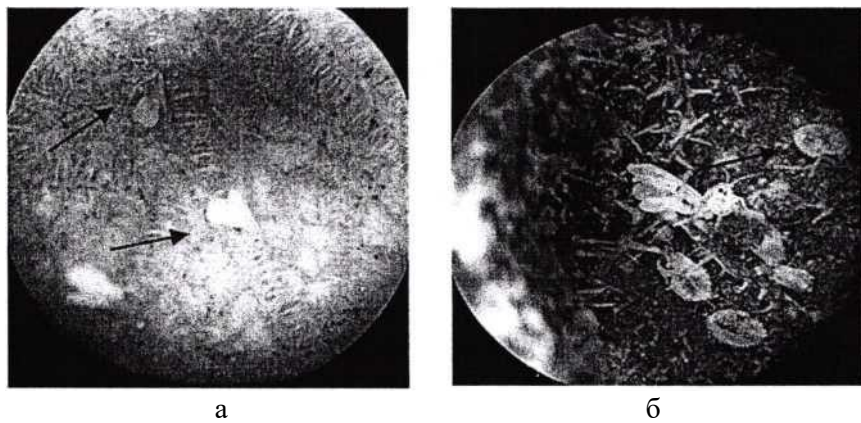


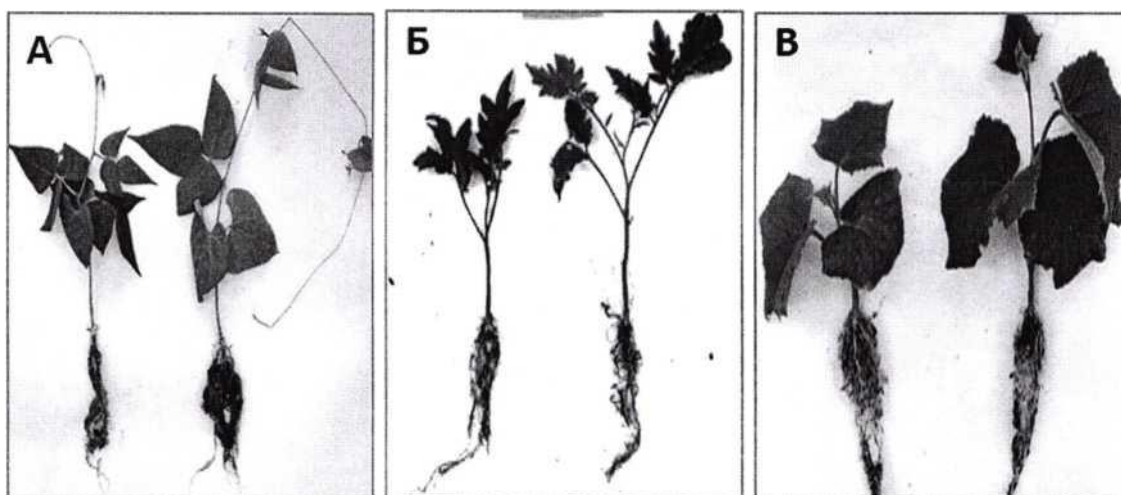
Рис. 6. Погибшие особи тлей, покрытые белым мицелием штамма Lepid-2018 *Beauveria bassiana* через 72 часа



а

б

Рис. 7. Микоз, наблюдаемый у нимф белокрылки и взрослых особей, подвергшихся воздействию штаммов *Beauveria bassiana*: (а) - через 48 ч; (б) - через 7 дней



Контроль. Обработанные
с суспензией *Bb*

Контроль. Обработанные
с суспензией *Bb*

Контроль. Обработанные
с суспензией *Bb*

Рис. 8. Всходы фасоли (А), томата (Б) и огурца (В) в контроле и опытном варианте получившие суспензии *Beauveria bassiana* путем полива через 5 дней после появления побега с листьями

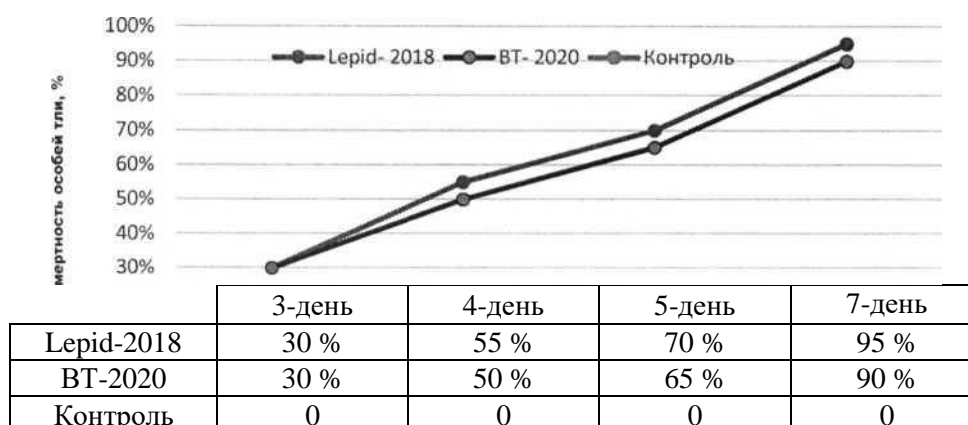


Диаграмма 1. Биологическая эффективность биопрепарата на основе штаммов Lepid-2018 и BT-2020 *Beauveria bassiana* по отношению к тли (*Aphis pomi*)

Выпущено отделом подготовки официальных изданий