

**ОБЪЕКТЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ
И ИХ ПРОМЫШЛЕННОЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

- Грубо процессы промышленной биотехнологии принято подразделять на 2 большие группы: *производство биомассы* и *получение продуктов метаболизма*.

ПРОИЗВОДСТВА, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛУЧЕНИИ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ

- Производство микробной биомассы – самое крупное микробиологическое производство.
- Микробные клетки сами по себе могут служить конечным продуктом производственного процесса.
- Помимо этого полученная микробная биомасса может использоваться:
 - а) в качестве белково-витаминных добавок к кормам;
 - б) как источник получения белков, липидов, ферментов, токсинов, витаминов, антибиотиков;

- в) для борьбы с возбудителями заболеваний животных и растений;
- г) в качестве носителя ферментативной активности в реакциях микробиологической (энзиматической) трансформации органических соединений.
- А также для получения накапливающихся вне микробной клетки метаболитов, в том числе ферментов, токсинов, антибиотиков, аминокислот, витаминов, нуклеотидов и т.п.

- При выборе микроорганизма помимо основных требований к качеству производимого продукта учитывают его *технологичность* – удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при проточном культивировании, величину клеток.

Промышленные технологии, основанные на получении и использовании микробной биомассы, принято подразделять на:

Производство препаратов для сельского хозяйства

Производство белка микроорганизмов

Производства, основанные на процессах жизнедеятельности биомассы микроорганизмов

• **Микробные препараты в сельском хозяйстве**

- Микробные препараты, применяющиеся в сельском хозяйстве, можно условно разделить на две группы. Первая – **бактериальные удобрения, препараты для оптимизации питания и активизации роста растений** (на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих микроорганизмов), вторая группа – **препараты для защиты растений от болезней, вредителей и сорняков** (биофунгициды, биоинсектициды, биогербициды).

- Собственно под микробными препаратами понимают препараты, содержащие живые клетки отобранных по полезным свойствам микроорганизмов, а также продукты их метаболизма, которые находятся или в культуральной жидкости, или адсорбированы на нейтральном носителе.

- Главные преимущества применения биопрепаратов:
- 1. *Влияние биопрепаратов на всхожесть семян и биомассу растений.*
- 2. *Улучшение структуры почвы и накопление в ней питательных веществ.*
- 3. *Улучшение минерального питания растений.*

- 4. *Подавление развития фитопатогенных микроорганизмов, обеспечивающее снижение поражаемости растений болезнями.*
- 5. *Повышение устойчивости растений к неблагоприятным условиям (засуха, заморозки).*
- 6. *Регуляция накопления в растениях тяжелых металлов, радионуклидов, нитратов и других вредных соединений.*

- Микробные культуры, являющиеся основой препаратов для сельского хозяйства, должны отвечать следующим требованиям:
- отсутствие патогенных и токсических свойств, опасных для человека, теплокровных животных, полезных насекомых, рыб, почвенных микроорганизмов;

- максимальное проявление полезных свойств: азотфиксации, фосфатмобилизации, антагонизма к патогенам и т.д.
- технологичность в производстве — высокая скорость роста в условиях производственного культивирования на недорогих питательных средах, устойчивость к лизогенным фагам; удобство товарных форм при транспортировании и использовании.

• БИОЛОГИЧЕСКИЕ УДОБРЕНИЯ

- В настоящее время выпускают такие микробиологические удобрения, как *нитрагин, ризоторфин, азотобактерин, фосфобактерин, экстрасол, бактофосфин, бисолби, бисолбиФит, агрिका, азофит, байкал М-1, восток М-1, ресойлинг, ризоагрин, ургаса, фосфатовит, экофит.*

- **Бактериальные удобрения на основе азотфиксирующих бактерий**
- Микроорганизмы-азотофиксаторы ежегодно фиксируют примерно $1,8 \times 10^8$ т молекулярного азота воздуха. Очевидно, что использование соответствующих «препаратов-удобрителей» является целесообразным и экономически оправданным.

- Задачей производства бактериальных удобрений на основе азотфиксирующих бактерий является максимальное накопление жизнеспособных клеток, сохранение их жизнеспособности на всех стадиях технологического процесса, приготовление на их основе готовых форм препарата с сохранением активности в течение гарантийного срока хранения.

- Первый коммерческий препарат «нитрагин» для инокуляции семян был запатентован в 1896 г. в Великобритании Ноббе и Хилтнером.
- Российская промышленность производит нитрагин, ризоторфин и др. препараты на основе активных жизнеспособных клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium*. Эти бактерии в симбиозе с бобовыми культурами способны фиксировать свободный азот атмосферы, превращая его в соединения, легкоусвояемые растением.

- **Азотобактерин** – бактериальное удобрение на основе свободноживущих почвенных бактерий вида *Azotobacter chroococcum*, способных фиксировать до 20 мг атмосферного азота на 1 г использованного углеродного субстрата. Внесенные в качестве удобрения в почву бактерии также выделяют биологически активные вещества:

- (никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гиббереллин и др.). Эти вещества стимулируют рост растений. Кроме того, продуцируемые *Azotobacter* фунгицидные вещества из группы анисомицина угнетают развитие в ризосфере растения некоторых фитопатогенных грибов.

- **Бактериальные удобрения на основе фосфатмобилизирующих бактерий**

- *Фосфобактерин* — бактериальное удобрение, содержащее споры микроорганизма *Bacillus megaterium var. phosphaticum*. Эти бактерии превращают трудно усвояемые минеральные фосфаты и сложные фосфорорганические соединения (нуклеиновые кислоты, нуклеопротеиды) в доступную для растений форму.

- Положительный эффект от применения фосфобактерина не только связан с доставкой усвояемых фосфатов к растениям, но также обусловлен действием биологически активных веществ (тиамина, пиридоксина, биотина, никотиновой и пантотеновой кислот, витамина В₁₂ и др.), которые, стимулируют фосфорное и азотное питание, благоприятно действуя на развитие растений на первых этапах. Т.е. фосфобактерин относится к числу биоудобрений со стимулирующим эффектом.

- **Фосфоэнтерин** - жидкий препарат, создан на основе эффективного штамма фосфатмобилизующих бактерий *Enterobacter nimipressuralis*.

- Препарат комплексного действия. Применяется на зерновых и бобовых культурах, хорошо влияет на рост овощных растений, повышает их урожайность за счет продуцирования штаммом физиологически активных веществ и органических кислот.

- **Препараты для защиты растений от болезней, вредителей и сорняков (биофунгициды, биоинсектициды, биогербициды)**

- Только небольшая часть (около 10 %) применяемых и вносимых в окружающую среду химических пестицидов достигает цели; основная же масса этих веществ вызывает гибель полезных организмов, аккумулируется в биологических объектах, нарушает равновесие в природных экосистемах и биоценозах, загрязняет почвы, водоемы, воздух.

- *Ключевыми вопросами* биотехнологии микробных средств защиты растений от вредителей и болезней являются: **выбор наиболее пригодных агентов биологической регуляции численности фитофагов и фитопатогенов, способы производства и форма препаратов, повышение эффективности использования в сельском и лесном хозяйстве.**

- В настоящее время выделяются две основные категории средств биоконтроля вредителей и болезней – *биопестициды, рецептуры которых основаны на вирусах, бактериях, грибах, протистах и нематодах, и биоконтролирующие средства, основанные на жуках, мухах, галлицах, златоглазках, клопах, клещах и паразитических осах.*
- Можно отметить некоторую мировую специализацию: в США преимущественно производятся биопестициды, а в странах ЕС (Бельгия, Франция, Испания) – биоконтролирующие виды членистоногих.

- Средства биологической защиты, основанные на биоагентах, объединяет то, что они не включают искусственные химические соединения, но могут включать соединения, полученные из экстрактов растений.
- **Биопестициды** (биоинсектициды, биофунгициды, биогербициды и др.) вызывают заболевания и гибель объектов контроля.
- **Биологические контролирующие агенты** поедают целевые объекты или используют их в качестве пищи для своего потомства.

- Компании по производству биоконтролирующих агентов, биопестицидов и феромонов существуют в США, Швейцарии, Японии, Индии, Китае, Швеции, Бельгии, Нидерландах, Англии, Италии, Германии, Канаде, Финляндии. Россия в этот перечень не входит, т.к. соответствующей промышленности не имеет.

- Источником получения исходных штаммов микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности служит, как правило, природная среда: активное начало биопрепаратов выделяют из почвы, с поверхности растений, из больных и погибших насекомых. Природные штаммы селекционируют для отбора наиболее активных.

- Суммарный экологический эффект применения микробных биопестицидов складывается из 2-х главных составляющих:
 - Во-первых, это снижение химической нагрузки непосредственно на агроценоз сельхозугодий,
 - Во-вторых, применение МБП способствует восстановлению нормальной структуры микробоценоза почвы.

- По сравнению с химическими средствами защиты растений (пестицидами) биопрепараты безопасны или малотоксичны для человека и окружающей среды, не нарушают природных связей в биоценозе, обладают избирательным действием и не способствуют возникновению устойчивости у насекомых-вредителей.

- Биопестициды представлены двумя группами – *микробными* и *биохимическими пестицидами*. Микробные пестициды в качестве активного ингредиента содержат бактерии, вирусы, грибы.
- **Биохимические пестициды** – это субстанции естественного происхождения (феромоны, регуляторы роста, регуляторы репродуктивных функций), контролирующие рост и распространение возбудителей болезней и вредителей растений без токсического воздействия на окружающую среду.

• БИОИНСЕКТИЦИДЫ

- Технология производства этих препаратов весьма различна и, как правило определяется природой и физиологическими особенностями микроорганизмов-продуцентов (бактерий, грибов, вирусов). Однако имеется ряд универсальных требований, предъявляемых к биоинсектицидам, основными среди которых являются:

- селективность и высокая эффективность действия, безопасность для человека и полезных представителей флоры и фауны,
- длительная сохранность и удобство применения,
- хорошая смачиваемость и прилипаемость.

- **Бактериальные и вирусные препараты** действуют после попадания в организм насекомого в процессе его питания. Чем больше попадает препарата вместе с кормом, тем выше гарантия заболевания и гибели фитофага, поэтому эти биопрепараты применяют, в основном, в период наиболее активного питания личинок.
- **Препараты, созданные на основе грибных энтомопатогенов**, поражают вредителей преимущественно контактно, через наружные покровы, поэтому могут действовать на любой стадии развития насекомых.

- Биологические препараты не вызывают столь быстрой гибели вредителей, как химические инсектициды. Массовая смертность насекомых наблюдается, как правило, через 5-15 суток после внесения препарата в зависимости от его дозы, вида вредителя и метеорологических условий.
- При обработке вирусными препаратами вирус долгие годы может находиться в биотопе, включаться в циркуляцию внутри популяции хозяина и становиться одним из основных факторов смертности вредителя.

- Споры и клетки бактерий и грибов после внесения в биоценоз препаратов в отличие от вирусов не передаются от родительских организмов потомству и поэтому не способны вызывать естественно возникающие микробные эпизоотии в популяциях насекомых.

• Бактериальные биоинсектициды

- К настоящему времени описано свыше 90 видов бактерий, инфицирующих насекомых. Большая их часть принадлежит к семействам *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae*.

- Наиболее распространенные инсектопатогенные бактерии и инфицируемые ими насекомые
 - *Pseudomonas aeruginosa* – Саранча
 - *Pseudomonas septica* – Жук-навозник, жук-древесинник
 - *Vibrio leonardia* – Огневка пчелиная большая, мотылек кукурузный
 - *Enterobacter aerogenes* – Бабочка-голубянка, бабочка-толстоголовка

- *Proteus vulgaris* – Саранча
- *Salmonella enteritidis* – Огневка пчелиная
большая
 - *Streptococcus spp.* – Майский хрущ,
шелкопряд тутовый, шелкопряд непарный,
шелкопряд дубовый походный
- *Bacillus thuringiensis* – Различные бабочки,
моли, жуки
 - *B. popilliae* – Жук-навозник
 - *B. sphaericus* – Комары
 - *B. moritai* – Мухи

- Обработку вегетирующих растений *бактериальными препаратами* против личиночных стадий насекомых проводят способом авиационного или наземного аэрозольного опрыскивания.
- Эффективность применения этих препаратов во многом зависит от погодных условий в период обработок, состояния популяции вредителя и особенностей растений.

- Наибольший эффект достигается при обработке в период питания гусениц младших возрастов, когда дневная температура воздуха достигает 18 °С.
- В лиственных насаждениях обработку проводят при наличии достаточно развитой листвы.
- Бактериальные препараты не обладают токсичностью, не влияют на запах или вкус обрабатываемых растений, их можно применять в любую фазу вегетации растений и даже за сутки перед сбором урожая.

- Бактериальные препараты практически нетоксичны для человека, однако не исключается возможность их аллергенного и раздражающего действия, кроме того, среди них могут быть условно-патогенные для человека виды.

- Благодаря своему биологическому происхождению бактериальные препараты легко разлагаются в природных условиях, быстро инактивируются в почве.
- Солнечная радиация и фитонциды листвы могут быстро вызывать потерю активности препаратов, поэтому в зависимости от погодных условий они могут быть активными в течение 3-4 недель или потерять свою активность за 24 ч.

- Бактериальные препараты обладают замедленным действием, однако после использования биопрепаратов насекомые очень быстро прекращают питаться, и вред, наносимый ими растениям, даже при наличии живых вредителей, значительно снижается уже через несколько часов после обработок.

- Большинство промышленных штаммов принадлежит к роду *Bacillus*. Наиболее распространены (свыше 90 %) препараты на основе спор и токсинов энтомопатогенных бактерий *Bac. thuringiensis* (*Bt*), имеющих свыше 25 серотипов и при попадании внутрь насекомого вызывающих септицемию или воздействующих на насекомое экзо- и эндотоксинами.

- Среди этих токсичных продуктов выделяют 4 компонента:
- - α -ЭКЗОТОКСИН, или фосфолипаза C, - продукт растущих клеток бактерий. Токсическое действие фермента связывают с индуцируемым им распадом незаменимых фосфолипидов в ткани насекомого, что приводит к его гибели.
- - γ -ЭКЗОТОКСИН - малоизученный компонент, неидентифицированный фермент (или группа ферментов).

- - β -экзотоксин (fly-фактор) – термостабильный продукт растущих клеток. Считают, что молекула β -токсина – атипичный нуклеотид, состоящий из аденина, глюкозы и рибозы и сложно связанный через рибозу и глюкозу с аллослизевой и ортофосфорной кислотами. Его действие, видимо, обусловлено ингибированием ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что приводит к прекращению синтеза РНК. Может влиять на геном насекомого, приводя к появлению уродливых особей у потомства. По сравнению с другими токсинами действует медленнее, в основном при переходе от одного цикла развития к другому.

- - δ -эндотоксин – параспоральный кристаллический эндотоксин. Образуется в процессе споруляции бактерии в противоположной от формирующейся споры части клетки. На завершающей стадии спорообразования токсин приобретает форму 8-гранного кристалла. Интактные кристаллы нетоксичны и состоят из белка, аминокислотный состав которого близок для различных штаммов. Кристаллический белок в кишечнике восприимчивых насекомых распадается на молекулы протоксина, которые под действием щелочных протеаз распадается на активные токсические фрагменты.

- Кристаллические эндотоксины классифицированы в 4 группы: токсины, активные в отношении чешуекрылых (молекулярная масса 130–160 кД); активные в отношении чешуекрылых и двукрылых (70 кД); активные в отношении жесткокрылых (72 кД) и активные по отношению к личинкам двукрылых (состоят из нескольких активных белков молекулярной массой от 27 до 130 кД).

- В зависимости от реакции на кристаллы насекомые делятся на три группы:
- - характерен общий паралич;
- - паралич среднего отдела кишечника;
- - реакция на препарат в целом: гибель в результате прорастания спор и последующего размножения бактерий.
- Бактерии *Bac. thuringiensis* антагонистичны к 400 видам насекомых. Наибольший эффект достигается при применении препаратов этой группы против листогрызущих вредителей.

- Наиболее распространенные в мировом производстве препараты на основе различных вариаций *Bac. thuringiensis*: энтобактерин, дипел, инсектин, алестин, токсобактерин, дендробациллин, битоксибациллин, гомелин, бактокулицид, текнар, бактимос, вектобак, москитур, бактоспеин.

• Грибные биоинсектициды

- Многочисленные виды энтомопатогенных грибов широко распространены в природе; они поражают широкий круг насекомых, обладая для этого различными механизмами, включая контактный, что облегчает их применение. Грибы хорошо сохраняются в виде спор и продуцируют разнообразные биологически активные вещества, усиливающие их патогенность.

- Однако грибные препараты не применяются пока достаточно широко. Это связано, во-первых, с определенными технологическими трудностями, возникающими при их выращивании и, во-вторых, — обусловлено жесткими требованиями к факторам окружающей среды (высокая активность грибных препаратов проявляется только в условиях повышенной и стабильной влажности).

- Грибные биопрепараты обладают рядом особенностей:
- - проникают в тело насекомого не через пищеварительный тракт, а через кутикулу;
- - насекомые поражаются в фазе развития куколки и имаго;
- - большая скорость роста и огромная репродуктивная способность;
- - в виде спор могут длительное время находиться в природе без снижения энтомопатогенной активности;
- - специфичность и вирулентность значительно зависят от штамма гриба.

- Действие грибного препарата на насекомое начинается с проникновения споры (конидии) в полость тела через наружные покровы. Попав в тело, спора прорастает гифой, затем разрастается мицелий, на котором формируются конидиеносцы с конидиями. Уже на этой стадии возможно поражение насекомого вследствие выделения некоторыми штаммами значительного количества токсинов. Рост гриба продолжается до тех пор, пока все ткани не будут разрушены.

- Первый грибной биоинсектицид, положивший начало развитию биотехнологии микробных средств защиты растений, был создан **И.И. Мечниковым** на основе выделенного им из природы энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae*.

- В промышленной биотехнологии наиболее часто используются отдельные штаммы в основном трех родов: *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Entomophthora*.

- *Metarhizium anisopliae* – наиболее известный энтомопатогенный гриб, описанный более 100 лет назад как зеленый мускаридный гриб. На его основе были получены первые препараты биопестицидов в промышленных масштабах. Этот гриб поражает многие группы насекомых, включая слюнного пастбищного клопа и вредителей сахарного тростника. В сочетании с вирусом препарат данного гриба используют для контроля численности жука-носорога, являющегося главным вредителем пальм на островах в южной части Тихого океана. С его помощью можно бороться с коричневой цикадой – вредителем риса.

Melanconium arbusculum

Phenol: 1% (100%)





- В США, Чехии, Австралии, на Кубе разработаны эффективные препараты на основе мускаридного гриба *Beauveria bassiana* для борьбы с вредителями различных сельскохозяйственных растений и для контроля популяции насекомых в почве.





- Для инфицирования саранчи в США используют австралийский микроскопический гриб *Entomophthora praxibuli*. Саранча погибает в течение 7–10 дней после применения препарата. Споры гриба, сохраняясь в почве, способны поражать следующие поколения насекомых.



- В Японии производится инсектицид на основе грибов рода *Aspergillus* для защиты лесов от вредителей. Препарат вносят в почву, он поглощается корнями деревьев, распространяясь по сосудистой системе дерева, защищает его от насекомых.
- *Verticilium lecanii* – вид, на основе которого в западных странах успешно выпускают препараты в промышленных масштабах. Этот гриб способен контролировать в оранжереях численность тлей в течение нескольких месяцев.



- *Hirsutella thompsonii* использовали некоторое время в США для производства препарата «Микар» с целью контроля численности цитрусовых клещей. Выпуск препарата, однако, был прекращен, так как не оправдал надежд.
- Также созданы препараты на основе облигатных энтомопатогенных грибов *Entomophthora thaxteriana* (энтомофторин), *Aschersonia aleuroides* (верталек, майкотал) и др.

- Перспективы грибных препаратов очевидны. Однако необходимы серьезные исследования для понимания возможных последствий взаимодействия между растением, вредителем и биоинсектицидом.

• Вирусные биоинсектициды

- Вирусы перспективны для защиты растений поскольку *чрезвычайно вирулентны, высоко специфичны* (обычно к ним восприимчивы один, реже – два-три близкородственных вида, т.е. они полностью безопасны для человека и всей биоты), хорошо *сохраняются в природе* вне организма-хозяина (активны вне насекомого в течение 10-15 лет), *высоко устойчивы* к неблагоприятным факторам окружающей среды.

- Вирусные препараты оказывают только кишечное воздействие. В качестве активного начала они содержат особые белковые образования (тельца-включения) – полиэдры, имеющие форму многогранников, или гранулы, имеющие овальную форму, внутри которых заключены вирусные частицы (вирионы). Заглатываемые с кормом они растворяются в щелочной среде кишечника насекомого, и освободившиеся вирусы проникают в ткани и поражают ядра или цитоплазму живых клеток.

- Вирусными заболеваниями (*вирусами*) поражаются личинки (гусеницы). По мере развития болезни у личинок снижается активность передвижения и питания, цвет тела меняется (светлеет или темнеет), ткани разжижаются, они часто повисают, прикрепившись к веткам и листьям. Покровы тела разрываются, при этом вытекает бурая жидкость без запаха, насыщенная вирионами.

- Эта жидкость, попав на листья (хвою), становится источником заражения других насекомых в популяции вредителя. От заражения до гибели личинок проходит 10-15 суток или больше в зависимости от погодных условий и активности их питания.
- Вирусные препараты в виде водных суспензий применяют путем опрыскивания наземным или авиационным способом. Патогенная активность препаратов для насекомых выражается количеством активных частиц, содержащихся в 1 г препарата.

- **Существуют два принципа применения вирусных препаратов:**
- - интродукция вирусов в плотные популяции насекомых на сравнительно небольших площадях с целью возникновения в них эпизоотий. Данный способ обработки предполагает внесение небольших количеств препарата;
- - обработка зараженных участков путем опрыскивания или опыления на ранних стадиях развития личинок.

- В соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения (1973 г.) особое внимание при изучении вирусов было обращено на одну группу (**бакуловirusы**), поскольку в ней отсутствуют вирусы, патогенные для позвоночных.

- **Бакуловirusы** – это двуцепочечные ДНК-вирусы, в трех группах которых имеются биопестициды: *вирусы ядерного полиэдроза (ВЯП), вирусы гранулеза (ВГ), фильтрующиеся вирусы (ФВ).*

- Однако другие группы – *вирусы цитоплазматического полиэдроза* (ВЦП), *энтомонатогенные вирусы* (ЭВ) и *иридовирусы* – также содержат потенциальные биопестициды против насекомых, поэтому сейчас также рассматриваются как перспективные биопестициды.

- В зависимости от времени пребывания вируса в организме насекомого и в популяции выделяют:
- вирус недолго находится в организме, вызывая, как правило, острый инфекционный процесс с коротким инкубационным периодом, сопровождающийся гибелью насекомого. Из погибших особей вирус, надежно защищенный полиэдрами или гранулами, попадает в окружающую среду, распространяется в популяции хозяина и заражает других восприимчивых особей;
- долгое пребывание в организме и в популяции (персистенция). Вирус неактивен, находится в так называемой латентной форме, в популяции передается от родителей к потомству.

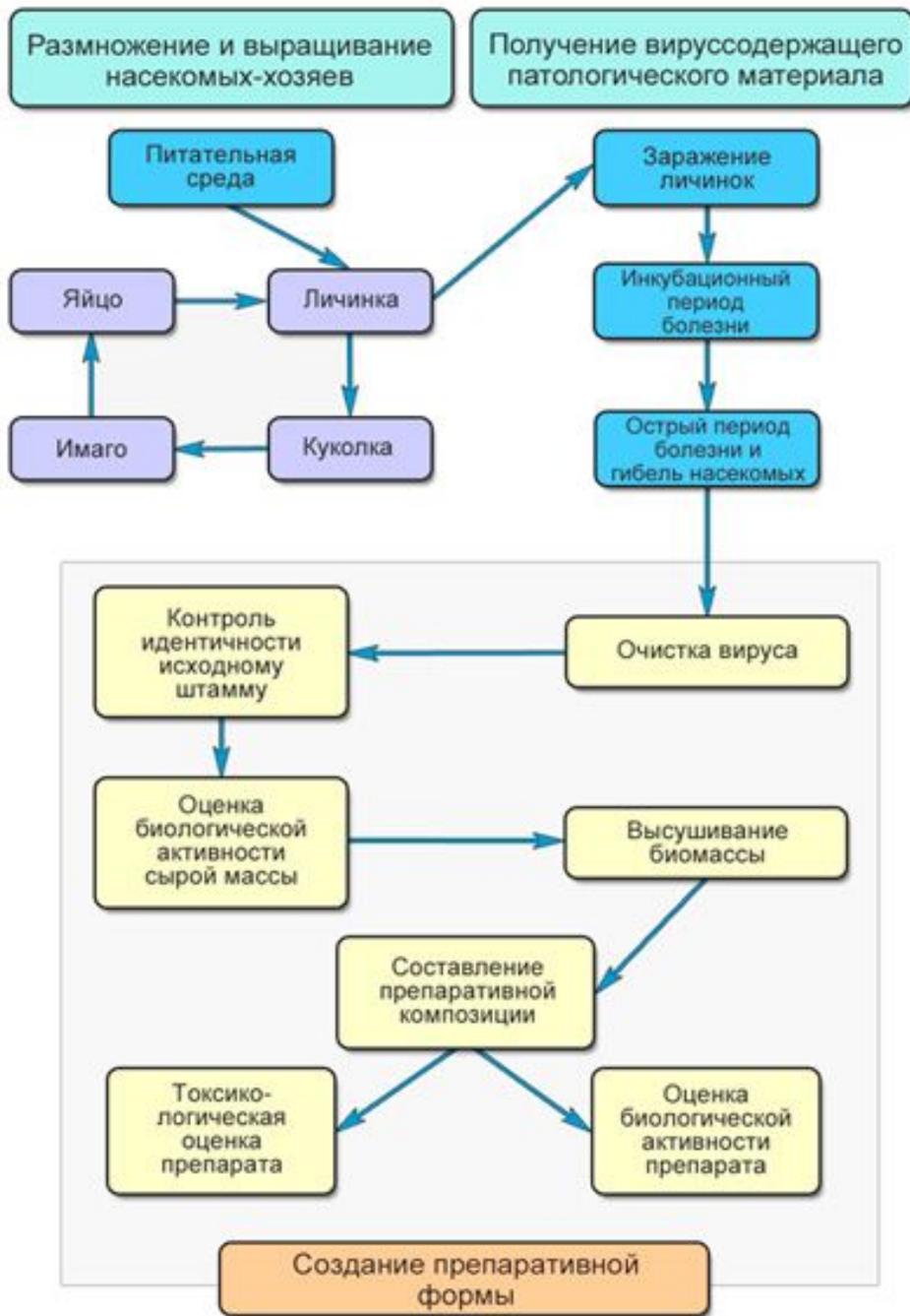
- Первый вирусный инсектицид был выпущен компанией «Сандоз» в 70-е гг. прошлого века для борьбы с коробочным червем хлопчатника.
- Производство вирусных препаратов основано на массовом размножении насекомого-хозяина на искусственных средах, обеспечивающих его физиологически здоровое состояние.

- На определенной стадии развития (обычно на стадии личинки) насекомое заражают, добавляя в корм суспензию вирусов, предварительно полученных от больных личинок. После заражения насекомых выдерживают в строго определенных условиях, обеспечивающих максимальное накопление вируса в тканях. Через 7-9 суток собирают мертвые и отмирающие личинки, подсушивают при температуре 33-35 оС и измельчают механическим способом для вывода телец-включений из тканей.

- К полученной массе добавляют физиологический раствор или дистиллированную воду из расчета 1 мл на гусеницу, и взвесь полученных тканей фильтруют. Полиэдры осаждают из фильтрата центрифугированием. Осадок суспендируют в минимальном количестве дистиллированной воды и добавляют стерильный глицерин, стандартизуют (титр 1 млрд. полиэдров/мл) и разливают во флаконы.

- Одна зрелая гусеница способна дать до 36 млрд. телец-включений, что составляет до 30 % ее массы.
- Препараты помимо *суспензий* готовят в виде *дустов* и *масляных форм*.
- Если препарат планируется выпускать в виде порошка, то сухой осадок смешивают с мелкодисперсным наполнителем (каолином) до получения титра полиэдров 1 млрд. полиэдров в 1 г.

- Масляную форму препарата получают путем диспергирования осадка в стерильном 50% растворе глицерина (стабилизатор) до титра 2 млрд. полиэдров в 1 мл, а затем добавляют равный объем солярового масла или жидких парафинов нефти (суспергатор), перемешивают и разливают по флаконам.



- Российской промышленностью выпускается несколько вирусных препаратов; в том числе «**вирина-ГЯП**» (против гусеницы яблоневого плодового жоржика), «**вирина-КШ**» (против кольчатого шелкопряда), «**вирина-ЭНШ**» (против непарного шелкопряда), «**вирина-ЭКС**» (против капустной совки), «**вирина-АББ**» (против американской белой бабочки).
- В США производят несколько вирусных препаратов для защиты лесов («ТМ-Биоконтроль», «Циптек» и др.).

- В настоящее время на территории РФ разрешены для применения следующие препараты на основе вирусов насекомых:
- препарат **ФермоВирин ЯП** в виде смачивающегося порошка (высокоэффективный вирусный биопрепарат против яблонной плодожорки);
- препарат **Мадекс Твин** в виде суспензионного концентрата (грануло-вирусный препарат для биологического контроля яблонной плодожорки).

- Начинается применение техники рекомбинатных ДНК для введения новых последовательностей в ген оболочечных белков вирусов, который далее используется для синтеза новых белков – токсинов *Bacillus thuringiensis*, значительно усиливая токсические эффекты вируса.

- В настоящее время большинство вирусов размножаются только в тканях насекомых. В этом отношении весьма перспективна разработка техники клеточных культур насекомых для размножения вирусов. Для этого необходимо получение высокопродуктивных линий клеток, оптимизация питательных сред, выбор эффективных систем вирус-клетка. По этой технологии в США получают коммерческий препарат «Элькар».

- Успешно проводятся разработки по созданию рекомбинантных бакуловирусов с генами, кодирующими водный обмен насекомых. После применения такого препарата насекомые погибают в течение 5 дней от обезвоживания либо перенасыщения водой.

• БИОФУНГИЦИДЫ

- Биологические фунгициды - биологически активные вещества органического происхождения, подавляющие жизнеспособность или вызывающие гибель микроорганизмов.
- Биологические фунгициды проникают в корни и листья, распространяются по тканям и обеспечивают биологическую защиту растений.

- В тканях находятся в неизменном виде или превращаются в более активные вещества, которые воздействуют на обмен веществ растений, повышая их устойчивость к патогенным микроорганизмам.
- Биологические фунгициды могут повышать всхожесть семян, ускорять рост растений, стимулировать образование корней. «Каталогом» для сельского хозяйства рекомендован ряд микробиологических препаратов против болезней растений (бактофит, агат-25К, бинорам, планриз, фитолавин и др.).

- Среди биопрепаратов, используемых в сельском хозяйстве, можно выделить большую группу биофунгицидов, основу которых составляют бактерии *Bacillus subtilis*, например: *фитоспорин*, *баксис*, *алирин*, *бактофит*, *гамаир* и др. Биопрепараты применяются для защиты растений от фитопатогенов в течение всего вегетационного периода и для обработки плодов перед закладкой на хранение.

- Биопрепараты на основе *Bacillus subtilis* помимо защитной функции растений от фитопатогенов, обладают дополнительно свойствами пробиотиков для сельскохозяйственных животных и птицы, что позволяет расширить сферу их практического применения и включать в корма на стадии заготовки в качестве кормовых добавок, препятствующих их заражению фитопатогенами и накоплению фитотоксинов.

- **Триходермин** - препарат, содержащий споры и мицелий гриба-антагониста *Trichoderma lignorum*, а также продуцируемые грибом в процессе производственного культивирования биологически активные вещества. Гриб *Trichoderma lignorum* подавляет развитие фитопатогенных микроорганизмов путем воздействия на них прямым паразитированием,

- конкуренцией за субстрат, выделением ферментов, антибиотиков (глиотоксин, виридин, триходермин и др.) и других биологически активных веществ.
- Защита многих овощных культур от заболеваний, вызываемых некоторыми видами микроскопических грибов, обеспечивается применением препарата на основе культур *Trichoderma polysporum*, *T. viride*.

- Гаупсин - препарат инсектицидного и фунгицидного действия, содержащий два штамма бактерий *Pseudomonas aureofaciens*, а также продуцируемые ими в процессе производственного культивирования биологически активные вещества. Рекомендуется для защиты растений от болезней листового аппарата и плодовых гнилей. Обладает инсектицидной активностью в отношении личинок младших возрастов плодожорок, повреждающих плодовые культуры.

Планриз - препарат, содержащий ризосферные бактерии *Pseudomonas fluorescens AP-33*, а также продуцируемые ими в процессе производственного культивирования биологически активные вещества. Бактерии *Pseudomonas fluorescens*, кроме прямого подавления вредной микробиоты, способствуют выделению растениями фитоалексинов, которые повышают иммунитет вегетирующих культур.

На основе бактерий *Pseudomonas fluorescens* получен препарат Р-2-79, подавляющий развитие свыше 40 видов микроорганизмов, поражающих пшеницу, ячмень, рожь.

Для борьбы с фитофторозом яблонь предложен способ применения почвенных бактерий *Enterobacter aerogenes*.

- **Пентафаг-«С»** - биологический фунгицид, содержащий вирионы пяти штаммов бактериальных вирусов, а также биологически активные вещества. Пентафаг-«С» обладает профилактическим и лечебным действием против широкого спектра бактериозов плодовых и овощных культур: бактериального рака плодовых, дырчатой пятнистости косточковых, угловатой пятнистости огурцов и других тыквенных, черной бактериальной пятнистости и бактериального рака томатов, мучнистой росы и парши.

• БИОГЕРБИЦИДЫ

- К биогербицидам относятся микроорганизмы-патогены сорных растений, ферменты, а также полупродукты, получаемые биоконверсией.
- Для борьбы с отдельными видами сорняков, устойчивых к химическим препаратам, применяют специфические и токсичные для них микроорганизмы. Наиболее часто используют грибные фитопатогены и грибные фитотоксины.

- Для расширения сферы их применения необходимо получение грибных форм, более устойчивых по отношению к изменяющимся условиям внешней среды.
- Бактериальные фитопатогены менее чувствительны к факторам внешней среды, но в меньшей степени поражают сорные растения.

- США и Япония совместно разрабатывают получение биогербицидов на основе природных микроорганизмов для борьбы с сорняками сои, арахиса, риса. В США получен препарат на основе штамма *Phytophthora palmivora* для борьбы с повиликой. Япония начала производит биогербицид на основе билафоса, продуцируемого штаммом *Streptomyces hydroscopicus*. Препарат нарушает азотный обмен в листьях и стеблях сорняков.

Производство белка микроорганизмов

- Области применения микробного белка:
- 1) техническая (компоненты питательных сред, различного рода наполнители, загустители-эмульгаторы, стабилизаторы и т.д.),
- 2) кормовая (для хозяйственно ценных животных),
- 3) пищевая.

- В современных промышленных технологиях, основанных на использовании микроорганизмов, продуцентами белка служат дрожжи, другие грибы (аспергиллы и фузарии), бактерии и микроскопические водоросли. При этом на микробную биомассу, предназначенную для использования в качестве компонента корма или пищи, полностью распространяются ограничения, налагаемые на другие кормовые или пищевые добавки и касающиеся содержания патогенов, канцерогенов, токсинов, тяжелых металлов и т.п.

- С технологической точки зрения наилучшими из продуцентов являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Их преимущество заключается, прежде всего, в «технологичности»: дрожжи легко выращивать в условиях производства. Они характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами.

- Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма, в том числе и рыбную муку. Кроме того, дрожжевые клетки содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты.

- Изначально (и в настоящее время) для выращивания кормовых дрожжей использовали преимущественно дешевое углеводное сырье - гидролизаты отходов деревообрабатывающей промышленности, непищевых растительных материалов (подсолнечная и рисовая лузга, стержни кукурузных початков, стебли хлопчатника, богасса – жом сахарного тростника и т.п.). На таких средах выращивают дрожжи *Candida*, *Trichosporon*, *Hansenula*, *Zygoascus*.

- В 60-е годы в крупных промышленных масштабах осуществлялось производство дрожжей на углеводородах (нормальные (неразветвленные) парафины нефти и др.). Выход биомассы может достигать при их использовании до 100% от массы субстрата. Качество продукта зависит от степени чистоты парафинов.

- Помимо дрожжей *Candida* (*Candida maltosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*) на углеводородах возможно выращивать мицелиальные грибы аспергиллы и фузарии, многие мукоровые грибы и бактерии.
- В непереработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды и нуклеиновые кислоты, а их влияние на организм человека пока еще недостаточно изучено. Поэтому и предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде при промышленном получении пищевого белка.

- В последнее время в качестве продуцентов белка наряду с дрожжевыми и мицелиальными грибами стали использовать бактерии, которые отличаются высокой скоростью роста и содержат в биомассе до 80% белка. Бактерии хорошо поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Однако в настоящее время известно незначительное число видов бактерий, которым присущи свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства, поскольку их недостатками являются:

- трудная осаждаемость, обусловленная малыми размерами клеток,
- значительная чувствительность к фаговым инфекциям,
- высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот.
- Последнее обстоятельство неблагоприятно в том случае, если предусматривается пищевое использование продукта.

- Перспективными видами сырья для крупнотоннажного получения микробного белка принято считать *спирты, природный газ, водород*.
- Масштабы производства, технологичность низших спиртов и качество получаемого микробного белка выдвинули *метанол и этанол* в разряд наиболее перспективных субстратов. Исследование процессов микробного синтеза на спиртах с середины 70-х годов были развернуты всеми развитыми странами.

- На метаноле как на единственном источнике углерода и энергии способны расти около 25 видов дрожжей, в том числе представители родов *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*. Наилучшими продуцентами на этом субстрате считаются бактерии (*Pseudomonas*, *Methylobionas*), потому что они могут расти на метаноле с добавлением минеральных солей и используют одноуглеродные соединения более эффективно. При росте на метаноле бактерии дают больше биомассы, чем дрожжи.

- Процессы получения белка на метаноле достаточно экономичны, себестоимость производимого продукта на 10-15% ниже, чем при аналогичном производстве, базирующемся на основе высокоочищенных n-парафинов. Высокобелковые продукты из метанола получают фирмы Великобритании, Швеции, Германии, США, Италии.

- Преимущества метанола по сравнению с жидкими углеводородами состоят в прекрасной растворимости в воде, высокой химической чистоте и отсутствии канцерогенных примесей, высокой летучести. Последнее позволяет легко удалять его остатки из готового продукта на стадии термообработки и высушивания.

- Дополнительным фактором, обеспечивающим доминирование в культуре производственных штаммов-продуцентов, является биологическая активность спиртов по отношению к посторонней микробиоте.
- Однако горючесть спиртов и возможность образования с воздухом взрывоопасных смесей, а также их токсичность требуют специальных мер, обеспечивающих безопасный режим работы.

- Использование этанола в качестве субстрата снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена и не вызывает возражений, как в случае применения углеводов и метанола. Однако себестоимость такого производства существенно выше. На этаноле выращивают разные виды дрожжей, имеющих алкогольдегидрогеназу.
- Биомассу на основе этанола производят в Чехии, Испании, Германии, Японии, США.

- К настоящему времени разработаны технологические процессы получения белка на природном газе (США, Япония, Канада, Германия, Великобритания). Выход биомассы в этом случае может составлять более 60% от массы субстрата. В этом случае предполагается использование смешанной культуры: бактерии *Methylobionas*, усваивающие метан, *Hydrogrobium* и *Pseudomonas*, усваивающие метанол, и некоторые виды неметилотрофных бактерий.

- Продуцентами микробного белка на метане также являются бактерии родов *Methylococcus*, *Mycobacterium* и др.
- Главные достоинства метана – основного компонента природного газа – доступность, относительно низкая стоимость, высокая эффективность преобразования в биомассу метаноокисляющими микроорганизмами, значительное содержание в биомассе белка, сбалансированного по аминокислотному составу.

- Очень перспективно получение белка с помощью *водородокисляющих бактерий*, которые получают энергию за счет окисления водорода в присутствии кислорода воздуха и используют в качестве источника углерода углекислоту.
- Для получения биомассы используются, как правило, бактерии рода *Hydrogenomonas*. В Германии разработан способ культивирования водородокисляющих бактерий, при котором можно получать 20 г сухого вещества на 1 литр суспензии клеток. Возможно, в будущем эти бактерии станут основным источником пищевых микробных белков.

- Перспективность водородокисляющих бактерий определяется их автотрофией и независимостью от источников органического сырья, быстрым ростом, высоким содержанием полноценного по аминокислотному составу белка, отсутствием внеклеточных промежуточных продуктов обмена органической природы (единственным побочным продуктом процесса окисления водорода является вода), высокой экологической чистотой процесса производства и получаемого продукта.

- **Лактоза молочной сыворотки** может служить источником энергии для микроорганизмов, а также сырьем для производства продуктов микробного синтеза (органических кислот, ферментов, спиртов, витаминов) и белковой биомассы. Самым высоким коэффициентом конверсии белка сыворотки в микробный белок обладают *дрожжи*.
- Активный катаболизм лактозы особенно характерен для дрожжей из рода *Kluyveromyces*. Эти дрожжи можно использовать для получения на молочной сыворотке кормового белка, этанола, препаратов β -глюкозидазы.

- Впервые дрожжи на молочной сыворотке стали выращивать в Германии. В качестве продуцентов применяли различные штаммы сахаромицетов.
- Разработаны технологии получения микробных продуктов, основанные на использовании лактозы как монокультурой, так и смесью дрожжей и бактерий. В настоящее время в качестве продуцентов используют дрожжи родов *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*. Молочная сыворотка с выросшими в ней дрожжами может использоваться в качестве заменителя молока.

- Эффективным продуцентом являются цианобактерии рода *Spirulina*, биомасса которых содержит до 70% белков. Клеточная стенка в отличие от микроводорослей легко переваривается. *Низкий уровень нуклеиновых кислот в биомассе, нетоксичность пигментов фикоцианинов, высокий уровень переваримого белка* определяют биомассу цианобактерий как полноценный белковый продукт пищевого назначения. При метаболизме белков спирулины в организме человека не образуется холестерин, поэтому данный белок стали рассматривать в качестве компонента диетического питания.

- В общем в качестве источников углерода и энергии микроорганизмы используют самые разнообразные субстраты – нормальные (неразветвленные) парафины и дистилляты нефти, природный газ, спирты, растительные гидролизаты, метан, водород, метанол, этанол, уксусную кислоту, углекислый газ, молочную сыворотку, мелассу, крахмал и целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства.

- Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение, инактивацию и сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта.

Спасибо за внимание!