

УДК 576.8: 632.9

О. А. Дрегваль, О. Г. Власенко, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

ВИЖИВАННЯ *BACILLUS THURINGIENSIS* ТА *BEAUVERIA BASSIANA* НА ХВОЇ ЯЛИНИ *PICEA ABIES*

Визначено терміни виживання ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* і грибів *B. bassiana* на поверхні хвої ялин після обробки рідким комплексним мікробним інсектицидним препаратом «Бактофунгін-LS» у весняний та осінній періоди. Рекомендовано проводити обробку хвойних рослин біопрепаратом восени проти зимуючих фаз розвитку шкідників і 1–2 обробки навесні та літом проти активних фаз.

Ключові слова: Beauveria bassiana, Bacillus thuringiensis, виживання мікроорганізмів, хвойні дерева.

О. А. Дрегваль, О. Г. Власенко, Н. В. Черевач, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара

ВЫЖИВАНИЕ *BACILLUS THURINGIENSIS* И *BEAUVERIA BASSIANA* НА ХВОЕ ЕЛИ *PICEA ABIES*

Определены сроки выживания энтомопатогенных бактерий *B.thuringiensis* и грибов *B.bassiana* на поверхности хвои елей после обработки жидким комплексным микробным инсектицидным препаратом «Бактофунгин-LS» в весенний и осенний периоды. Рекомендовано проводить обработку хвойных растений биопрепаратом осенью против зимующих фаз развития вредителей и 1–2 обработки весной и летом против активных фаз.

Ключевые слова: Beauveria bassiana, Bacillus thuringiensis, выживание микроорганизмов, хвойные деревья.

О. А. Dregval, O. G. Vlisenko, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov

O. Honchar Dnipropetrovsk National University

SURVIVAL OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND *BEAUVERIA BASSIANA* ON THE PINE-NEEDLES OF *PICEA ABIES*

Defined terms entomopathogens survival of bacteria and fungi *B. bassiana* *B. thuringiensis* on the surface of conifers after treatment liquid complex microbial insecticide «Baktofunhin-LS» in the spring and autumn periods. It is shown that the autumn-winter period more favorable for saving entomopathogens on coniferous plants. *B. thuringiensis* well kept for 125 days, during this period the number of bacteria decreased from 10^7 to 10^4 – 10^5 CFU/ g needles. *B. bassiana* well preserved for 28 days, the number is reduced from 10^6 to 10^3 – 10^4 CFU/ g needles. Spring treatment of preparation does not ensure long-term preservation of entomopathogenic fungi on the surface of plants, but did not significantly affect the preservation of bacteria. After 60 days *B. thuringiensis* manifested in a relatively high titer (10^4 CFU/ g), while *B. bassiana* not detected in 9 days.

The results indicate the feasibility of treatment conifers of complex microbial insecticide of the autumn and the spring. Autumn treatment of plants can provide infection of inactive overwintering stages of insects that facilitate the creation of centers of infection and its spread in the spring forest biocenoses. In spring and summer should be carried out 1-2 treatment on the basis of the development cycle of pests.

Key words: Beauveria bassiana, Bacillus thuringiensis, survival of microorganisms, conifers.

Значної шкоди лісовому господарству завдають комахи-шкідники, спалахи масового розмноження яких охоплюють значні території. Особливо значних збитків поширення листо-хвоєгризучих шкідників завдає насадженням хвойних порід, які менш стійкі порівняно з листяними. Уже після одноразового об'їдання крон хвойні всихають, чому сприяють стовбурні шкідники, які руйнують деревину [1].

Застосування хімічних інсектицидів призводить до загибелі не тільки шкідників, але й корисної ентомофауни, порушуючи рівновагу біогеоценозу. Біологічний метод, який ґрунтується на використанні ентомопатогенних мікроорганізмів і ентомофагів, розглядається як найбільш перспективний для захисту рослин у лісових біоценозах [1; 2]. На користь цього свідчить вибірковість дії ентомопатогенів, збереження вірулентності упродовж декількох років, створення довготривалих осередків інфекції та екологічна безпечність [1; 3].

Мускардинові гриби *Beauveria bassiana* та кристалоутворюючі бактерії *Bacillus thuringiensis* – дві групи ентомопатогенних мікроорганізмів, які вже знайшли практичне застосування в інтегрованих системах захисту рослин від шкідників [1; 7]. Останнім часом стратегія створення біопрепаратів змістилася у напрямку розробки біотехнологій на основі асоціацій мікроорганізмів. Високоєфективною виявилась асоціація вищезгаданих мікроорганізмів. Створений на їх основі комплексний інсектицидний біопрепарат «Бактофунгін-LS» виявив широкий спектр дії проти представників лускокрилих, жорсткокрилих, трипсів, попелиць, пильщиків, кліщів тощо [2; 3; 6].

Ефективність дії біопрепаратів у значній мірі залежить від закріплення та терміну зберігання ентомопатогенів на поверхні оброблених рослин. Тому визначення термінів збереження життєздатності ентомопатогенів у навколишньому середовищі є актуальною проблемою.

Метою роботи було дослідження виживання ентомопатогенних бактерій *B.thuringiensis* і грибів *B.bassiana* на хвої ялин.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для дослідження була хвоя ялин (*Picea abies*), оброблених мікробним препаратом «Бактофунгін-LS». Модельні ялини на території ДП «Дніпропетровський лісгосп» обробляли з використанням ручного обприскувача. Робочий розчин препарату містив $1,7 \cdot 10^9$ спор і кристалів δ -ендотоксину *B. thuringiensis var. thuringiensis* і $1,9 \cdot 10^8$ бластоспор грибів *B. bassiana* в 1 мл. Для закріплення компонентів препарату на поверхні хвої до розчину додавали різні прилипачі: карбоксиметилцелюлозу (КМЦ), зелену патоку та сухе молоко до концентрації 1 %.

Періодично здійснювали висіви змивів із хвої за методом Коха на поверхню щільних поживних середовищ: м'ясо-пептонного агару (МПА) для виявлення *B. thuringiensis* та МПА з 2 % глюкози для виявлення *B. bassiana*. Для виявлення бактеріального компонента препарату до середовища додавали канаміцин (15 мкг/мл), оскільки в роботі використовували канаміциностійкий штам, а для виділення грибного компонента – стрептоміцин (20 мкг/мл), який пригнічував ріст бактерій. Підраховували кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1 г хвої. Повторність дослідів триразова.

Результати та їх обговорення. Проаналізовано виживання мікробних компонентів інсектицидного препарату на основі *B. thuringiensis* та *B. bassiana* в природних умовах на ялинах. Обробка рослин проводилась навесні (травень 2013 р.) та восени (листопад 2013 р.). Обрані періоди обробки рослин пояснюються необхідністю з'ясування термінів внесення ентомопатогенів у лісові біоценози для забезпечення найбільш ефективного захисту від шкідників. На думку деяких авторів, внесення змішаних біологічних препаратів доцільно проводити в осінній період. Це пояснюється тим, що при дії ентомопатогенних бактерій комахи послаблюються і в такому стані зимують. На них оселяються ентомопатоген-

ні гриби, які спричинюють мікоз. Внаслідок цього навесні популяція шкідників зменшується [1].

Як видно з даних табл. 1, кількість життєздатних спор *B. thuringiensis* після 6 діб після обробки рослин у весняно-літній період знизилась на порядок, через 2 місяці ще на 3 порядки при використанні КМЦ і на 2 порядки при застосуванні зеленої патоки та сухого молока.

Таблиця 1

Вживання *B.thuringiensis* на хвої ялин (травень–липень)

Прилипач	Кількість КУО/г хвої				
	1 доба	3 доба	6 доба	9 доба	60 доба
КМЦ	$(1,97 \pm 0,07) \cdot 10^7$	$(8,90 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(1,84 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(1,70 \pm 0,17) \cdot 10^6$	$(2,21 \pm 0,02) \cdot 10^3$
Зелена патока	$(2,20 \pm 0,06) \cdot 10^7$	$(8,8 \pm 0,02) \cdot 10^6$	$(1,30 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(1,17 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(3,00 \pm 0,03) \cdot 10^4$
Сухе молоко	$(1,54 \pm 0,02) \cdot 10^7$	$(5,00 \pm 0,05) \cdot 10^6$	$(1,92 \pm 0,05) \cdot 10^6$	$(1,73 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(2,6 \pm 0,01) \cdot 10^4$

Таким чином, за 60 діб титр КУО бактеріального компонента препарату знизився з 10^7 до 10^3 – 10^4 на 1 г хвої.

Грибний компонент виявився нестійким у цей період: вже на шосту добу кількість КУО *B. bassiana* знизилась майже на 2 порядки, а на дев'яту добу боверія взагалі не виявилась (табл. 2).

Таблиця 2

Вживання *B.bassiana* на хвої ялин (травень–липень)

Прилипач	Кількість КУО/г хвої				
	1 доба	3 доба	6 доба	9 доба	60 доба
КМЦ	$(1,50 \pm 0,50) \cdot 10^6$	$(1,02 \pm 0,07) \cdot 10^6$	$(3,50 \pm 0,32) \cdot 10^4$	-	-
Зелена патока	$(1,37 \pm 0,14) \cdot 10^6$	$(9,04 \pm 0,11) \cdot 10^5$	$(2,82 \pm 0,11) \cdot 10^4$	-	-
Сухе молоко	$(1,11 \pm 0,02) \cdot 10^6$	$(7,90 \pm 0,60) \cdot 10^5$	$(3,00 \pm 0,10) \cdot 10^4$	-	-

Осінньо-зимовий період був більш сприятливим для збереження життєздатності спор компонентів біопрепарату.

Як видно із даних табл. 3, *B.thuringiensis* висівалась із хвої ялин протягом 125 діб. Протягом першого тижня було зареєстровано зменшення кількості КУО на один порядок, потім за наступні 4 місяці ще на 1–2 порядки із 10^7 до 10^5 – 10^4 КУО/г.

Таблиця 3

Вживання *B.thuringiensis* на хвої ялин (листопад–березень)

Прилипач	Кількість КУО/г хвої					
	1 доба	3 доба	7 доба	28 доба	79 доба	125 доба
КМЦ	$(4,82 \pm 0,15) \cdot 10^7$	$(3,25 \pm 0,13) \cdot 10^6$	$(2,71 \pm 0,17) \cdot 10^6$	$(2,10 \pm 0,13) \cdot 10^6$	$(2,62 \pm 0,13) \cdot 10^5$	$(5,50 \pm 0,14) \cdot 10^4$
Зелена патока	$(3,61 \pm 0,07) \cdot 10^7$	$(1,83 \pm 0,41) \cdot 10^7$	$(4,32 \pm 0,01) \cdot 10^6$	$(3,93 \pm 0,25) \cdot 10^6$	$(1,42 \pm 0,47) \cdot 10^5$	$(8,00 \pm 0,56) \cdot 10^4$
Сухе молоко	$(4,10 \pm 0,17) \cdot 10^7$	$(1,04 \pm 0,48) \cdot 10^7$	$(6,60 \pm 0,07) \cdot 10^6$	$(6,51 \pm 0,21) \cdot 10^6$	$(4,89 \pm 0,47) \cdot 10^5$	$(1,43 \pm 0,73) \cdot 10^5$

На відміну від бактеріального компонента біопрепарату *B. bassiana* висівалась лише протягом 28 діб (табл. 1).

Кількість КУО на третю добу зменшилась майже на порядок, на сьому добу чисельність *B. bassiana* зменшилась ще на 1–2 порядки і у випадку застосування КМЦ і сухого молока в якості прилипачів зберігалась майже на цьому рівні протягом місяця. Грибний компонент біопрепарату не виявлявся на 79 та 125 добу.

Така різка зміна динаміки *B. bassiana* може бути пов'язана із погодними умовами, які у січні місяці були досить суворі. Тоді температура повітря досягала -24°C . На відміну від *B. bassiana*, бактеріальний компонент *B. thuringiensis* був більш стійким до низьких температур завдяки наявності ендоспор.

Таблиця 4

Вживання *B. bassiana* на хвої ялин (листопад—березень)

Прилипач	Кількість КУО/г хвої					
	1 доба	3 доба	7 доба	28 доба	79 доба	125 доба
КМЦ	$(1,52 \pm 0,31) \times 10^6$	$(3,71 \pm 0,13) \times 10^5$	$(2,73 \pm 0,40) \times 10^3$	$(2,50 \pm 0,23) \times 10^3$	-	-
Зелена патока	$(3,00 \pm 0,16) \times 10^6$	$(3,52 \pm 0,25) \times 10^5$	$(1,51 \pm 0,83) \times 10^4$	$(2,33 \pm 0,21) \times 10^3$	-	-
Сухе молоко	$(1,34 \pm 0,18) \times 10^6$	$(3,44 \pm 0,11) \times 10^5$	$(1,72 \pm 0,03) \times 10^4$	$(1,63 \pm 0,91) \times 10^4$	-	-

Треба зазначити, що життєздатність обох компонентів препарату у навколишньому середовищі була вище у осінньо-зимовий період, ніж у весняно-літній, ймовірно за рахунок меншої інсоляції. Сонячне світло, особливо ультрафіолєове випромінення, згубно впливає на життєдіяльність мікроорганізмів. За даними А. В. Крижко і співавторів життєздатність спор *B. thuringiensis* на поверхні оброблених рослин картоплі у літній період в умовах південного степу України зберігалась не більше 7 діб [4]. В умовах листяного лісу, де інсоляція менша, зниження чисельності *B. thuringiensis* за даними польських учених реєструвалося через 1 місяць після обробки. Через рік ентомопатогенні бацили виявити не вдалося [10]. Що стосується наших досліджень, то через рік після обробки рослин, незалежно від пори року, під час якої вона здійснювалася, *B. thuringiensis* також не висівалася.

Значний вплив на виживання грибного компоненту препарату, окрім інсоляції, здійснювала вологість повітря. У нашій кліматичній зоні, для якої притаманне посушливе жарке літо, вологість є одним із обмежувальних факторів, що впливають на життєздатність грибів. Під час літнього дослідження боверія на хвої збереглася тільки упродовж 1 тижня, тоді як у зимовий період вона висівалась через місяць у титрах, достатніх для збереження популяції у зовнішньому середовищі. Після різкого зниження температури, що призвело до зниження вологості, грибний компонент на поверхні хвої виявити не вдалося. За даними експериментів, проведених у Великобританії, *B. bassiana* на поверхні хвойних рослин краще переносить умови вологості зими з помірними температурами, ніж кліматичні умови літа. Відсутність цих грибів на гілках рослин у червні з одночасним виявленням у ґрунті під деревами автори пояснюють більш екстремальними умовами наземного середовища порівняно з ґрунтовим [8].

Порівняння ефективності закріплення компонентів препарату на поверхні хвої з використанням різних прилипачів показало, що найкращого результату можна досягти додаванням до робочого розчину сухого молока, хоча КМЦ та зелену патоку також можна рекомендувати для закріплення спор мікроорганізмів на рослинах. При застосуванні сухого молока кількість ентомопатогенів на обробленій поверхні зазвичай була на порядок вищою у кінцевому періоді їх виявлення, ніж при використанні інших прилипачів.

Висновки. Визначено терміни виживання ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* і грибів *B. bassiana* на поверхні хвої ялин після обробки рідким комплексним мікробним інсектицидним препаратом «Бактофунгін-LS» у весняний та осінній періоди. Показано, що осінньо-зимовий період більш сприятливий

вий для збереження ентомопатогенів на хвойних рослинах. *B. thuringiensis* добре зберігається протягом 125 діб. За цей період чисельність бактерій зменшилась з 10^7 до $10^4 - 10^5$ КУО/г хвої. *B. bassiana* добре зберігається протягом 28 діб: чисельність знижується з 10^6 до $10^3 - 10^4$ КУО/г хвої. Обробка препаратом навесні не забезпечує тривалого збереження грибного ентомопатогена на поверхні рослин, але суттєво не впливає на збереження бактеріального компонента препарату. Через 60 діб *B. thuringiensis* виявлялась у досить високому титрі (10^4 КУО/г), тоді як *B. bassiana* не виявлялась уже на дев'яту добу.

Отримані результати вказують на доцільність обробки хвойних рослин комплексним мікробним препаратом як восени, так і навесні. Осіння обробка рослин може забезпечити інфікування ентомопатогенами неактивних зимуючих стадій комах, що сприятиме створенню осередків інфекції та її поширення навесні у лісових біоценозах. Весною та влітку потрібно проводити 1–2 обробки з урахуванням циклу розвитку шкідників.

Для кращого закріплення ентомопатогенів на поверхні хвої рекомендується до робочого розчину додавати сухе молоко.

Бібліографічні посилання

1. Громовых Т. И. Энтомопатогенные грибы в защите леса / Т. И. Громовых. – Новосибирск : Наука, 1982. – 80 с.
2. Дирда Н. С. Біологічна активність антибіотикостійких варіантів штаму *Bacillus thuringiensis* – компонента комплексного інсектицидного препарату / Н. С. Дирда, О. А. Дрегваль, А. І. Вінніков // Матеріали Міжнар. наук.-практ. форуму «Наука і бізнес – основа розвитку економіки», Дніпропетровськ, 11 – 12 жовт. 2012 р. – С. 213–214.
3. Дрегваль О. А. Сумісна дія штамів ентомопатогенних бактерій і грибів / О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 1 (5). – С. 82–87.
4. Крижко А. В. Ентомопатогенні бактерії в агроценозі картоплі / А. В. Крижко, Л. М. Кузнецова, Г. М. Ткаленко // Карантин і захист рослин. – 2011. – №8 (182). – С. 22–24.
5. Машанов А. И. Микроорганизмы в защите леса / А. И. Машанов, В. М. Гукасян, А. И. Чуликов. – Новосибирск : Наука, 1981. – 191 с.
6. Пат. № а 2008 13915 Україна, МПК C12N 1/14, C12R 1/6455, A01N 63/04, A01P 7/04 Комплексний інсектоакарицидний препарат «Бактофунгін – LS» та спосіб його отримання / А. І. Вінніков, Н. В. Черевач, О. А. Дрегваль; заявник і патентовласник Дніпропетр. нац. ун-т.; заявл. 03.12.2008; опубл. 10.05.11, бюл. № 9.
7. Патыка В. Ф. Экология *Bacillus thuringiensis* / В. Ф. Патыка, Т. И. Патыка. – К. : Изд-во ПДАА, 2007. – 216 с.
8. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest / E. L. Ormond, A. P. Thomas, P. J. Pugh etc // FEMS Microbiol. Ecol. – 2010. – №74(1). – P. 146–154.
9. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future / L.A. Lacey, D. Grzywacz, D.I. Shapiro-Ilan etc // J. Invertebr. Pathol. – 2015. – 132. – P. 1 – 41.
10. Persistence of the spores of *B. thuringiensis subsp. kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves / E. Konecka, J. Baranek, I. Bielinska etc // Sci. Total. Environ. – 2014. – №472. – P. 296–301.
11. Prospects for the use of biological control agents against *Anoplophora* in Europe / T. Brabbs, D. Collins, F. Hérard etc / Pest Manag. Sci. – 2015. – 71. – № 17 – 14.

Надійшла до редколегії 16.06.2015