

ІДЕНТИФІКАЦІЯ НОВИХ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ЗА КЛЮЧОВИМИ ОЗНАКАМИ ФЕНОТИПУ

В.В. Круть, Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, В.П. Патика

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*Проведено порівняльний аналіз основних морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та ентомопатогенних властивостей ізольованих з організмів листогризухих комах штамів бактерій з аналогічними властивостями еталонних та колекційних штамів *Bacillus thuringiensis*. Визначено ентомопатогенні властивості виділених штамів проти личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*). Встановлено, що за комплексом ключових ознак фенотипу ізольовані нами штами споріднені з типовими представниками виду *B. thuringiensis*.*

Ключові слова: нові ентомопатогенні штами, колекційні та еталонні штами *Bacillus thuringiensis*, ідентифікація.

Ентомопатогенні бактерії роду *Bacillus*, зокрема виду *B. thuringiensis*, є значним біологічним агентом щодо контролю комах – шкідників рослин (ряд *Lepidopteran*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Mallophaga*, *Diptera* тощо) [1–4]. Безпечність для флори та корисної фауни, природне походження, відсутність утворення стійкості цільових об'єктів роблять їх унікальним інструментом в екологічно безпечному органічному землеробстві [2]. Ефективність дії *B. thuringiensis* ґрунтується на здатності бактерії в процесі спороутворення синтезувати ендотоксини, що активуються в кишківнику листогризухих комах, зупиняють їх живлення та зумовлюють фізіологічні зміни, не сумісні з життям, під час переходу до форми імаго. Зокрема, спектр та рівень синтезу цих токсинів кодується комплексом *Cry* генів, що містяться на мегаплазміді і забезпечують цілий спектр біологічної активності: цитолітичну, гемолітичну, ентомоцидну тощо [1]. З літературних джерел відомо про підвидову та штамову специфічність представників виду *B. thuringiensis* до певних шкідників [1, 3, 4]. У різних країнах світу великі компанії займаються виробництвом біопрепаратів, дія яких заснована на ентомотоксичних властивостях

штамів *B. thuringiensis*: Monsanto (США), Mucogen (США), Hoechst (Німеччина), Novo (Данія), ICI (Великобританія), Sandoz (Швейцарія) та ін. Але, зважаючи на штамову гетерогенність представників цього виду, неухильне зростання інтересу до продукції органічного походження та тотальне забруднення агроєкосистем отрутохімікатами [5], пошук ефективних штамів продуцентів біоінсектицидів та всебічне дослідження їх властивостей набуває дедалі більшої актуальності.

Метою наших досліджень було виділити в чисті культури та дослідити ключові ознаки фенотипу бактерій роду *Bacillus* з ентомопатогенними властивостями.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У ході досліджень використано 9 нових штамів, ізольованих нами із кишківника листогризухих комах. Для порівняльного аналізу в роботі використано колекційні штами *B. thuringiensis* 297, 293 та 239, що були надані нам доктором сільськогосподарських наук Т.І. Патиною. Штам *B. thuringiensis* 98 використали як еталонний, оскільки він становить основу препарату Бітоксисабацилін, виробником якого є Росія [6]. Нові штами бактерій ізолювали із внутрішніх тканин личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, ряд *Coleo-*

ptera) та американського білого метелика (*Hyphantria cunea Dryri*, ряд *Lepidoptera*) з наступним їх накопиченням у чистій культурі на картопляному агарі (КА). Скринінг комах проводили на полях приватних господарств та науково-дослідних установ, що не підлягають обробці хімічними чи біологічними інсектицидними препаратами, розташованих на території Київської, Черкаської, Житомирської областей та АР Крим.

Культуральні та фізіологічні властивості бактерій, морфологію клітин та колоній вивчали загальноновизнаними методами [7]. Зокрема колір, форму і консистенцію колоній визначали за ростом на КА. Забарвлення клітин встановлювали за Грамом, форму клітин та особливості розташування спор – шляхом мікроскопіювання. Культуральні та біохімічні властивості штамів досліджували за характером росту на стерильному м'ясопептонному бульйоні (МПБ) та желатині. Протеоліз на середовищі з желатином визначали за рівнем його розрідження. Редукцію нітратів до нітритів виявляли за допомогою додавання реактиву Грісса до бактеріальної культури, вирощеної на МПБ, який містив 0,1% азотнокислого калію. Почервоніння бактеріальної маси свідчило про здатність бактерій редукувати нітрати до нітритів. Оксидазну активність визначали методом Ковакса [8]. Каталазну активність у бактерій вивчали за допомогою 10%-го перекису водню. Здатність засвоювати вуглеводи, органічні кислоти або амінокислоти, як єдине джерело вуглецевого живлення, досліджували за ростом бактерій та зміною забарвлення середовища Омелянського, яке містило індикатор бром-тимол синій. Як єдині джерела живлення випробували 0,5%-ий розчин вуглеводів та 0,1%-ий – багатоатомних спиртів, а також амінокислот. Засвоєння тих чи інших сполук оцінювали на 3, 7, 14 та 21 добу культивування за зміною кольору індикатора, що відбувалася внаслідок зміни величини рН.

Ентомопатогенні властивості досліджуваних штамів характеризували відповідно до методу Лескової. Для цього у скляний

посуд поміщали личинки колорадського жука молодшого віку. Впродовж трьох днів їх годували листям картоплі, обробленим рідкою споровою культурою титром 109. Потім листя змінювали на необроблене. Рівень ентомопатогенності досліджуваних штамів розраховували як відсоток загинувших личинок до контролю на 3–5-ту добу експозиції [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ході досліджень з кишківника листогризувачів комах було виділено понад 50 бактеріальних ізолятів, з яких за результатами первинного скринінгу ключових фенотипових ознак для подальших досліджень було відібрано 9 штамів.

Як колекційні, так і ізольовані штами під час росту на КА продемонстрували здатність до утворення колоній кремового кольору (табл. 1). За морфологією клітин усі досліджувані штами є прямими короткими паличками із заокругленими кінцями, що розташовуються попарно або ланцюжками. Характеризуються як грампозитивні, некапсульовані та рухливі внаслідок наявності перетрихальних джгутиків.

Штами, що здатні утворювати ендоспори, розташовуються субтермінально. Всі досліджені культури утворюють лише каталазу та редукують нітрати до нітритів, розріджують желатин та ростуть при незначних концентраціях NaCl (табл. 1). Подібність цих ознак зближує ізольовані штами з колекційними, а також типовими представниками роду *Bacillus*. Як видно з таблиці 2, за ключовими біохімічними ознаками ізольовані нами штами також споріднені з колекційними *B. thuringiensis* 297, 293, 239 та еталонним штамом *B. thuringiensis* 98.

Зокрема, на мінеральному середовищі Омелянського, до якого додавали як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, усі досліджувані штами утворюють кислоту, натомість не зброджують лактозу, рафінозу, манітол, та є варіабельними за здатністю утилізувати саліцин і сахарозу. Подібність перелічених вище ознак не суперечить науковим даним та вказує на

Таблиця 1

Фізіологічні та біохімічні властивості досліджуваних штамів

Ознака	Колекційні та еталонні штами <i>B. thuringiensis</i> (4 шт.)	Нові ентомопатогенні штами бактерій роду <i>Bacillus</i> (9 шт.)
колір колоній	кремовий	
морфологія клітин	паличкоподібна	
здатність до спороутворення	+	+
тип розташування спор	субтермінальний	
забарвлення за Грамом	+	+
рухливість	+	+
	перетрихальний тип руху	
утворення каталази	+	+
утворення оксидази	-	-
редукція нітратів	+	+
гідроліз желатину	+	+
ріст при 6,5% NaCl	+	+

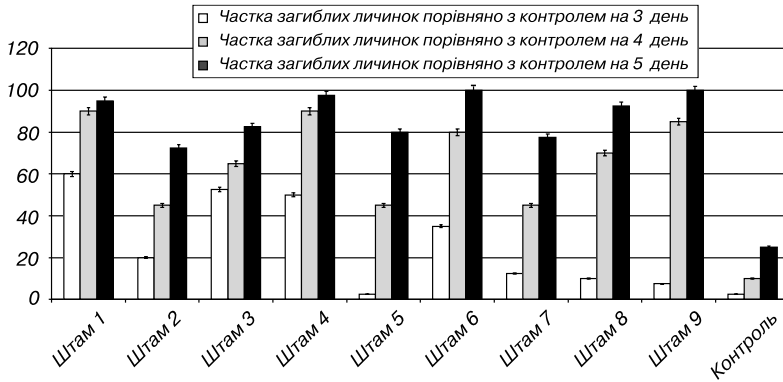
спорідненість як колекційних, так і ізолюваних нами штамів з типовими представниками виду *B. thuringiensis* [1, 4, 10]. Однак незважаючи на подібність деяких ознак (табл. 2) до колекційних штамів,

згідно з літературними джерелами, для представників цього виду такі властивості є специфічними залежно від штамів. Отже, за ключовими морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками ізолю-

Таблиця 2

Використання досліджуваними штамми деяких сполук як єдиного джерела живлення

Джерело живлення	Колекційні та еталонні штами <i>B. thuringiensis</i> (4 шт.)	Нові ентомопатогенні штами бактерій роду <i>Bacillus</i> (9 шт.)	
моносахариди	глюкоза	+	+
	маноза	-/+	-/+
	арабіноза	-	-
	галактоза	-/+	-/+
дисахариди	мальтоза	+	+
	сахароза	+	-/+
	лактоза	-	-
трисахарид	рафіноза	-	-
полісахарид	інулін	+	+
багатоатомні спирти	сорбитол	-/+	+
	манітол	-	-
ароматичний спирт	саліцин	-/+	+
монокарбонова амінокислота	лейцин	-/+	+
дикарбонова амінокислота	аспарагінова кислота	-/+	+
діамінокислота	аргінін	-/+	+
карбоциклічні амінокислоти	фенілаланін, тирозин	-	-

Варіант обробки штамми *B. thuringiensis*

Ентомотоксична дія ізольованих штамів *B. thuringiensis* на личинки *Leptinotarsa decimlineata* Say

вані штами споріднені з типовими представниками роду *Bacillus*, зокрема виду *B. thuringiensis*. Але з огляду на значну внутрішньовидову гетерогенність *B. thuringiensis*, ізольовані штами можуть бути коректно ідентифіковані на рівні виду із залученням додаткових фенотипових, а можливо, і генотипових ознак. Саме тому на наступному етапі досліджень були перевірені ентомопатогенні властивості виділених штамів (рисунок).

У процесі досліджень було з'ясовано, що тестовані штами *B. thuringiensis* є гетерогенними за токсичним впливом на личинки колорадського жука. Зокрема, найбільшим токсичним впливом на його личинки характеризувалися штами *B. thuringiensis* 9 та 6, які на 5-й день експозиції спричиняли загибель 100% личинок. Доволі високою ентомотоксичною дією характеризувалась і культуральна рідина ізольованих штамів 1, 3, 4, 8. Натомість, аналогічна обробка культуральною рідиною штамів 2, 5 та 7

призводила до загибелі лише 72,5–80% личинок колорадського жука.

Отже, досліджені нами штами характеризуються високою та середньою патогенністю щодо личинок колорадського жука. Це наближує їх до ентомопатогенних видів роду *Bacillus*, зокрема виду *B. thuringiensis* [1, 3].

ВИСНОВКИ

Результати досліджень засвідчили, що за комплексом ключових ознак фенотипу ізольовані бактерії роду *Bacillus* є спорідненими з типовими представниками виду *B. thuringiensis*. Але для остаточного з'ясування їх таксономічного статусу необхідно залучити додаткові фенотипові та генотипові ознаки. Встановлений високий рівень патогенності деяких штамів відкриває перспективи для подальшого їх дослідження з метою розробки нових вітчизняних біоінсектицидних препаратів для потреб сільського господарства.

ЛІТЕРАТУРА

1. Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes / A. Gonzalez, R. Diaz, M. Diaz et al. // Revista de biologia tropical. – 2011. – Vol. 59, no. 3. – P. 1007–1016.
2. *Bacillus thuringiensis*. A genomic and proteomics perspective / M.A. Ibrahim, N. Griko, M. Junke, L.A. Bulla // Bioengineered bugs. – 2010. – No. 1. – P. 31–50.
3. Kati H. Characterization of highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain isolated from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha* / H. Kati, K. Sezen, Z. Demirbag // Folia Microbiol. – 2007. – Vol. 52, no. 2. – P. 146–152.
4. Keshavarzi M. Isolation, Identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains / M. Keshavarzi // J. Agric. Sci. Technol. – 2008. – Vol. 10, no. 2. – P. 493–499.

5. Сільськогосподарська мікробіологія і збалансований розвиток агроєкосистем / В.Ф. Петриченко, І.А. Тихонович, С.Я. Коць та ін. // Вісник аграрної науки. – 2012. – № 8. – С. 5–11.
6. Вплив різних липкогенних композицій на спорування та синтез білка колекційними штамами *Bacillus thuringiensis* / В.В. Круть, Л.А. Данкевич, С.К. Воцелко, В.П. Патица // Мікробіол. журн. – 2014. – Т. 76, № 5. – С. 34–41.
7. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – С. 365–373.
8. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction / N. Kovacs // Nature. – 1956. – No. 178. – P. 703.
9. Лескова А.Я. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств (Методические указания) / А.Я. Лескова. – Л., 1984. – 21 с.
10. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.; пер. с англ. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.

REFERENCES

1. Gonzalez A., Diaz R., Diaz M. (2001). Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba, with insecticidal activity against mosquitoes. Revista de biologia tropical, vol. 59, no. 3. – pp. 1007–1016 (in English).
2. Ibrahim M.A., Griko N., Junke M., Bulla L.A. (2010). *Bacillus thuringiensis*. A genomic and proteomics perspective, Bioengineered bugs, no 1, pp. 31–50 (in English).
3. Kati H., Sezen K., Demirbag Z. (2007). Characterization of highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain isolated from Common Cockchafer, *Melolontha melolontha*. Folia Microbiol, vol. 52, no. 2, pp. 146–152 (in English).
4. Keshavarzi M. (2008). Isolation, Identification and differentiation of local *Bacillus thuringiensis* strains J. Agric. Sci. Technol, vol. 10, no. 2, pp. 493–499 (in English).
5. Petrychenko V.F., Tykhonovych I.A., Kots S.Ya. (2012). Silskohospodarska mikrobiolohiia i zbalansovanyi rozvytok ahroekosystem [Agricultural microbiology and balanced development of agro-ecosystems]. Visnyk ahrranoi nauky, no. 8, pp. 5–11 (in Ukrainian).
6. Krut V.V., Dankevych L.A., Votselko S.K., Palyka V.P. (2014). Vplyv riznykh lypkohenykh kompozytsii na sporoutvorennia ta syntez bilka kolektsiinymy shtamamy *Bacillus thuringiensis* [The influence of different compositions of heterogeneous sporogonic and protein synthesis of collectors strains of *Bacillus thuringiensis*]. Mikrobiol. zhurn., vol. 76, no. 5, pp. 34–41 (in Ukrainian).
7. Gerkhartda F. (1983). Metody obshchey bakteriologii [Methods of general bacteriology]. Moscow: Mir, vol. 1, pp. 365–373 (in Russian).
8. Kovacs N. (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction, Nature. No. 178, p. 703 (in English).
9. Leskova A.Ya. (1984). Identifikatsiya kultur *Bacillus thuringiensis* i otsenka ikh patogennykh svoystv (Metodicheskie ukazaniya) [Identification of crops of *Bacillus thuringiensis* and assessment of their pathogenic properties (Guidelines)]. Leningrad, 21 p. (in Russian).
10. Khoultta Dzh, Kriga N., Snita P. (1997). Opredelitel bakteriy Berdzhi [The determinant of bacteria Burdji]. Moscow: Mir, Iss. 9, vol. 1, 432 p. (in Russian).