

УДК 632.937

© 2010

Т.І. Пати́ка,
кандидат сільсько-
господарських наук
Національний
університет біоресурсів
і природокористування України

М.В. Канди́бін,

доктор
біологічних наук

І.А. Тихоно́вич,
академік РАСГН і УААН
Державна наукова установа
Всеросійський науково-дослідний
інститут сільськогосподарської
мікробіології РАСГН

В.П. Пати́ка,

академік УААН

Інститут

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

ВИКОРИСТАННЯ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ГРУПИ *BACILLUS THURINGIENSIS* У ФІТОЗАХИСТІ ВІД КОМАХ- ШКІДНИКІВ

Наведено результати досліджень селекційного відбору нових перспективних штамів *Bacillus thuringiensis* 1- і 10-го серотипів (H_1 , H_{10}) — продуцентів біологічно активних речовин, агентів препаратів фітозахисної дії.

Проаналізовано корисні біологічні особливості штамів у межах формування і вдосконалення технологій використання мікробіологічних засобів для контролю чисельності комах-шкідників.

Усе більше фахівців усвідомлюють, що завдяки розвитку біологічних методів захисту рослин можна не тільки забезпечити надійний захист сільськогосподарської продукції, а й розв'язати важливе питання збереження довкілля та природного рівня його біологічного різноманіття. Останнім часом вдалося значно розширити і поглибити уявлення про роль мікроорганізмів у землеробстві, а також сформулювати пріоритетні завдання щодо заміни пестицидів на мікробіологічні препарати [1, 6, 10].

Мікроорганізми є основними факторами ґрунтоутворювальних процесів, живлення рослин і фітосанітарного стану посівів. Особливості мікроорганізмів полягають у тому, що за відповідних умов вони можуть здійснювати біосинтез різних метаболітів, набувати енергійного, інтенсивного росту і розвитку. При оптимізації систем захисту рослин, які забезпечують високі показники виходу якісної, екологічно чистої сільськогосподарської продукції, особливої уваги надають методам мікробіологічного контролю чисельності комах-шкідників.

На основі мікроорганізмів розроблено і використовується ряд мікробних препаратів інсектицидної, родентицидної, фунгіцидної дії. Спорують бактерії *Bacillus thuringiensis* є найбільш розповсюдженими агентами мікробіологічного контролю чисельності комах і мають багатобачну дію на них: антифідантну, метатоксичну, фізіологічну, тератогенну, дерепродук-

ційну, що зумовлює високу біологічну, економічну, соціальну ефективність біопрепаратів на їх основі.

Біопрепарат на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* вважають високоякісним, надійним та оптимальним для технологій застосування в рослинництві, якщо він відповідає таким параметрам і вимогам:

- штам-продуцент здатний у стандартних і виробничих поживних середовищах накопичувати достатньо високий титр спор і кристалів і в найкоротший термін (в одиниці маси необхідно мати максимальну кількість активних клітин і метаболітів з корисними властивостями; спостерігати синхронне споро- та кристалоутворення зі співвідношенням спор і кристалів 1:1);

- збереження і незмінність готового біопрепарату (сухого порошку, пасти або рідини) тривалий час без істотних змін його властивостей;

- висока біологічна активність (ентомоцидність) препарату за діючими біологічно активними речовинами для тест-об'єктів (екзо-, ендотоксинами та іншими метаболітами);

- персистентність, гомогенність, адгезійна здатність біопрепарату;

- зручність для транспортування і технологічних прийомів застосування;

- безпека для людини, корисної ентомофауни, риб, теплокровних тварин.

Мета досліджень — здійснити селекцію

1. Етапи селекційного відбору біоваріантів *Bacillus thuringiensis* з корисними виробничими показниками

I	Вихідна культура + фізіологічний розчин	
II	Розсів на чашки Петрі методом виснаженого мазка до ≈ 500 колоній	
III	Відбір типових колоній не менше 50	
IV	Мікроскопія, відбір 25 варіантів із співвідношенням спор і кристалів 1:1	
V	Культивування глибинним методом на оптимальному поживному середовищі, відбір 10 варіантів із титром не менше 3 млрд спор у 1 мл культуральної рідини	
VI	ЛК ₅₀ BtH ₁ і BtH ₁₀ для біотесту — личинок (L ₂) колорадського жука не більше 0,35%	ЛК ₅₀ екзотоксину BtH ₁ і BtH ₁₀ для біотесту — личинок (L ₂) кімнатної мухи не більше 3,5 мкл/г корму

перспективних штамів-продуцентів *B. thuringiensis* з аналізом біологічних і господарсько цінних властивостей для формування і вдосконалення технологій їх використання у фітозахисті від комах-шкідників агробіоценозів.

Матеріали і методи. У роботі використано референтні екзотоксиногенні штами ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* 2-х серологічних варіантів (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis* BtH₁ 800, *B. thuringiensis* var. *darmslandensis* BtH₁₀ 109), які зберігаються у колекції мікроорганізмів ДНУ Всеросійського НДІ сільськогосподарської мікробіології РАСГН, а також використано відселектовані, нові штами, що виділяли з природних популяцій хворих і загиблих комах різних еколого-географічних регіонів України та Росії (BtH₁ — 14/1, 20/1, BtH₁₀ — 18/5, 23/3).

Виділення ентомопатогенів проводили методом скринінгу за ознакою інсектицидності згідно з методиками [5, 7, 8]. Морфологічний фенотип колоній чистих культур *B. thuringiensis* та їх продуктивність визначали загальноприйнятими у мікробіології методами [2, 4]. Культуральні, фізіолого-біохімічні особливості виділених штамів визначали методами, які використовуються як диференціальна діагностика за схемою Н. de Vargas, O. Lysenko [13, 14] порівняно з референтними штамми. Для ідентифікації культур використовували визначник Берджі [9]. Аналіз первинної послідовності фрагмента 16S рПНК — за методами K. Brajesh, T. Madden, D. Moreira [12, 15, 16]. Технологічні параметри розвитку культур ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* визначали за І.П. Работноюю [11].

Як модельні біотести використовували природні та інсектарні популяції комах (інтактних і контактних генерацій) з різним ступенем чутливості до бактеріального зараження, зокрема личинок кімнатної мухи (*Musca domestica* L.) для штамів 1- і 10-го серотипів як спеціалізований тест на екзотоксиногенність (визначення термостабільного β -екзотоксину); личинок молодшого віку колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) як тест на ентомоцидну активність. Виявлення ступеня патогенності

B. thuringiensis з урахуванням вибіркової дії, кількісне визначення показників летальних концентрацій (ЛК₅₀), рівень біосинтезу β -екзотоксину, δ -ендотоксину визначали методами, прийнятими в мікробіології і патології членистоногих [5, 7, 8]. Інфікування тест-комах суспензіями штамів проводили контактним методом і *per os* у різних концентраціях, включаючи сублетальні. Отримані дані статистично обробляли на персональному комп'ютері з використанням програм EXCEL, Statistica 6, Vector NTI Advance 8.0; за допомогою методів математичної статистики [3].

Результати досліджень та їх обговорення. Завдяки багаступінчастій аналітичній селекції проведено відбір оптимальних варіантів штамів-продуцентів у ряді генерацій з аналізом біологічних і господарсько цінних властивостей відповідно до розроблених селекційних критеріїв (табл. 1).

В організмі хворих і загиблих комах агробіоценозів одночасно з бактеріями, що утворюють кристали ендотоксину, виявлено спорові бактерії, які не мали кристалічних включень і були в основному не патогенні для фітофагів, але за своїми біохімічними властивостями близькі до кристалогенних бацил. Отже, з одного і того самого епізоотологічного матеріалу необхідно було виділити ізоляти чистих культур, щоб відібрати штами з корисними фітозахисними властивостями. Проведення селекції за ознаками і властивостями продуктивності, кількісного утворення кристалів ендотоксину дало змогу одержати ефективні, технологічні штами *B. thuringiensis* BtH₁ — 14/1, 20/1, BtH₁₀ — 18/5, 23/3.

Порівняння відселектованих і референтних штамів *B. thuringiensis* свідчить, що в генетичному плані найбільш спорідненими виявилися генотипи з рівнем подібності 16S рПНК штамів 1- і 10-го серотипів — 90—94%. Гомологія ентомопатогенних штамів зумовлюється їх токсигенним потенціалом.

Оцінка екзотоксиногенності нових штамів *B. thuringiensis* BtH₁ — 14/1, 20/1 на інсектарній популяції *Musca domestica* L. показала пере-

2. Визначення екзотоксигенності BtH₁ і BtH₁₀ контактним методом і per os (біотест личинки II віку *Musca domestica* L.)

Варіант досліду	% загибелі личинок при дозі зараження корму				ЛК ₅₀ , мкл/г корму	ЛК ₅₀ , %
<i>Метод per os (мкл/г корму)</i>						
	25	12,5	6,25	3,12	2,84	
BtH ₁	100±0,0	100±0,0	90±1,0	74±0,7		—
BtH ₁₀	100±0,0	100±0,0	94±0,7	76±1,0	2,74	
<i>Контактний метод (занурювання личинок у суспензію на 1 хв), %</i>						
BtH ₁	32,0±0,3	20,0±0,3	14,0±0,7	0	—	29,8
BtH ₁₀	40,0±0,7	22,0±0,3	18,0±0,3	0		28,4

важну загибель личинок (86—100%) при інфікуванні їх BtH₁ у розведеннях культуральної рідини 1:4 (25 мкл/г корму) і 1:8 (12,5 мкл/г корму). За продуктивністю і рівнем екзотоксигенності для личинок кімнатної мухи нові штами не поступаються показникам референтного штаму BtH₁ 800. Отже, під час послідовних генерацій відібрано перспективні штами, що поєднують практично цінні властивості: висока вихідна технологічність — стабільний титр спор 3,5 млрд/мл культуральної рідини; екзотоксигенність — за показниками ЛК₅₀ для личинок 2-го віку *Musca domestica* L. до 2,5—2,8 мкл/г корму. Для нових селектованих штамів BtH₁₀—18/5, 23/3 рівень екзотоксигенності становив 2,4—3,3 мкл/г корму.

Доведено, що визначення кількісного складу екзотоксину можна здійснювати більш спрощеним методом біологічного тестування, а саме, контактним (табл. 2).

За різних доз інфікування ЛК₅₀ пероральним методом становила 2,8 і 2,7 мкл/г корму для BtH₁ і BtH₁₀ відповідно. Використовуючи контактний метод, показники ЛК₅₀ у досліді становили 28—30%.

Показник ЛД₅₀ досліджуваних штамів 1- і 10-го серотипів для личинок 2-го віку *Leptinotarsa decemlineata* Say. становив 2,7—3,45 мкл культуральної рідини (табл. 3), що свідчить про активність і функціональність біоагентів.

Отже, вивчення токсигенного потенціалу штамів *B. thuringiensis* свідчить про високу ентомоцидність щодо комах рядів двокрилих і

твердокрилих — *Musca domestica* L., *Leptinotarsa decemlineata* Say.

Різносторонніми випробуваннями нових штамів *B. thuringiensis* доведено, що ентомоцидні, антифідантні та інші властивості ентомотоксинів, призводячи до відповідних ефектів у комах, тим самим не лише підсилюють дію мікробіологічних препаратів, що містять токсини, а й пролонгують терміни цієї дії. Обов'язковою умовою ефективного використання препаратів групи *B. thuringiensis*, так само як і всіх інших біоінсектицидів, є облік особливостей біопрепарату і механізму його дії.

Успіх використання мікробних біопрепаратів, зокрема *B. thuringiensis*, залежить від технологічних параметрів його виготовлення і не меншою мірою від правильної раціональної технології його застосування. На ефективність застосування біопрепаратів впливає цілий ряд технологічних, екологічних, видоспецифічних чинників (фенологія розвитку комах, чутливість до ентомопатогену різних фаз і вікових стадій розвитку, міграція окремих фаз комах, характер оброблюваної рослини, місце локалізації шкідника та ін.).

Різнобічна дія біоагентів *B. thuringiensis* складається з різних параметрів, зумовлених взаємовідношенням патоген-живитель. З природної популяції одержано контактну генерацію колардського жука і вивчено вплив сублетальних доз *B. thuringiensis* на плодючість і масу жуків отриманої генерації, оцінено ентомоцидну активність BtH₁ і BtH₁₀ контактної генерації. Чут-

3. Ентомоцидна активність штамів *Bacillus thuringiensis* (біотест личинки II віку *Leptinotarsa decemlineata* Say.)

Штам	Титр спор, млрд/мл культуральної рідини	ЛД ₅₀ , мкл культуральної рідини для L ₂ <i>L. decemlineata</i> Say.
BtH ₁ — 14/1	3,2	2,90
BtH ₁ — 20/1	3,0	3,45
BtH ₁₀ — 18/5	2,8	3,25
BtH ₁₀ — 23/3	3,5	2,68

ливність комах за варіантами досліду, з урахуванням загибелі за днями обліку, виявилася практично на одному рівні — 0,23% за показником ЛК₅₀. Важливими показниками були кількість відкладених яєць окремими самками, зниження плодючості (до 80—83%) та маси імаго (до 44%).

Установлено, що у варіантах з VtH₁ і VtH₁₀ відкладено імаго яєць на 17 і 20,5% менше, ніж на контролі. Виявлено сповільнене (пролонговане) відкладання яєць імаго, інфікованих у стадії личинок III—IV віку. Знижена життєздатність личинок дочірнього покоління свідчить про прояв віддаленої дії ентомотоксинів, які

продукують бактерії групи *B. thuringiensis*. Основною причиною низької плодючості імаго, крім інтоксикації, слід вважати також тривале голодування, пов'язане з антифідантною дією штамів-ентомопатогенів. Отже, під час оцінки ефективності мікробних препаратів на основі *B. thuringiensis* потрібно враховувати різносторонню дію на комах (сумарний захисний ефект). Контактно-кишкова дія препаратів *B. thuringiensis* на комах зумовлює максимальний інсектицидний ефект і гарантоване стримування чисельності шкідливих об'єктів на рівні, що не перевищує економічного порога шкідливості.

Висновки

Для розв'язання проблем підвищення стійкості сільськогосподарського виробництва, екологічної соціальної безпеки країни рекомендується застосування інсектицидних біопрепаратів із пролонгованим типом ентомотоксичної дії та післядії на популяції комах-шкідників. Враховуючи те, що в мікробіоконтролі

чисельності комах найбільше значення у світі набули бактерії групи *thuringiensis*, науково-теоретичні і практичні дослідження вдосконалення технології використання ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* з різним типом контролю чисельності комах сприяють подальшій домінантності цього напрямку.

Бібліографія

1. *Биопрепараты в сельском хозяйстве* (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве)/[И.А. Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь и др.]. — М.: Россельхозакадемия, 2005. — 154 с.
2. *Герхард Ф.* Методы общей бактериологии/Ф. Герхард. — М.: Мир, 1984. — Т. 2. — 466 с.
3. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований)/Б.А. Доспехов. — [5-е изд. доп. и перераб.]. — М.: Агрпромиздат, 1985. — 351 с.
4. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии/Д.Г. Звягинцев. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — 304 с.
5. *Кандыбин Н.В.* Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика/Н.В. Кандыбин. — М.: Агрпромиздат, 1989. — 172 с.
6. *Кандыбин Н.В.* Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*/[Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка]. — СПб. — Пушкин, 2009. — 252 с.
7. *Лескова А.Я.* Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств/А.Я. Лескова. — Л., 1984. — С. 17—19.
8. *Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей.* — М., 1984. — 27 с.
9. *Определитель бактерий Берджи/Под ред.*

Дж. Хоулта, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. — [9-е изд.; пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина]. — М.: Мир, 1997. — 432 с.

10. *Патика В.П.* Микроорганизми і альтернативне землеробство/[В.П. Патика, І.А. Тихонович, І.Д. Філіп'єв та ін.]. — К.: Урожай, 1993. — 176 с.

11. *Работнова И.Л.* Культивирование микроорганизмов/И.Л. Работнова; под ред. Н.С. Егорова//Промышленная микробиология. — М.: Высш. шк., 1989. — С. 113—138.

12. *Brajesh K.S.* Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community/K.S. Brajesh, L. Nazaries, S. Munro [et. al.]/Applied and environmental microbiology. — 2006. — 72, № 11. — P. 7278—7285.

13. *De Barjac H.* Classification of *Bacillus thuringiensis* strains/H. de Barjac, E. Frachon//Entomophaga. — 1990. — V. 35. — P. 233—240.

14. *Lysenko O.* The taxonomy of entomogenous bacteria/O. Lysenko//Insect Pathology. — 1963. — V. 2. — P. 638—661.

15. *Madden T.L.* Applications of network BLAST server/T.L. Madden, R.L. Tatusov, J. Zhang//Methods Enzymol. — 1996. — V. 266. — P. 131—141.

16. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations/D. Moreira//Nucleic Acids Research. — 1998. — 26, № 13. — P. 3309—3310.