

УДК 579.64
© 2017

М.В. БОЙКО,
аспірант

Національний університет
біоресурсів і природокористування
України

E-mail: maryaulina@gmail.com

вул. Героїв оборони, 13, м. Київ

ЕНТОМОПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ
BACILLUS THURINGIENSIS
ТА ЇХ ПОТЕНЦІАЛ
У БІОКОНТРОЛІ КОМАХ

*Представлено дані про поліфункціональні властивості бактеріальних штамів природного типу *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* з ентомотоксичними та антифідантними ефектами щодо личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Вивчено ефективність дії штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 в умовах лабораторних і польових дослідів з використанням як біомест личинки колорадського жука молодшого віку (L_{1-2}). Доведено, що аксенічна культура штаму *B. thuringiensis* № 87/3 після селекції *in vitro* має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу становить від 3,0 до 4,7 млрд/мл культуральної рідини), ентомоцидності (96,0–99,0 %).*

Ключові слова: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, споро-кристалічний комплекс, ентомотоксична дія, антифідантний ефект.

Постановка проблеми. Мікробіологічний метод захисту рослин з використанням компонентів біотичного походження та метаболітних препаратів на основі живих культур мікроорганізмів є актуальним науково-практичним напрямом біотехнології в аграрній науці. Дослідження в області біоконтролю мають особливе значення у зв'язку з негативними наслідками масового застосування пестицидів. Пестициди, утворюючи метаболіти різної токсичності, забруднюють навколишнє середовище, негативно впливають на біоту. Широке їх використання призводить до появи стійких популяцій шкідників [1].

Мікробні препарати, основою яких є мікроорганізми, включаючи бактерії роду *Bacillus*, багато років виробляються в усьому світі і використовуються в рамках інтегрованого захисту рослин для біологічного контролю шкідливих організмів. Щороку виробляється 13 000 тонн бактеріальних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis*. Вони характеризуються високою вибірковістю інсектицидної дії, безпечністю для рослин,

корисних комах, риб, теплокровних тварин та людини. *B. thuringiensis* під час споруляції продукує параспоральний кристалічний білок δ -ендотоксин, що специфічно зв'язується з афінним до нього білком, який знаходиться на поверхні апікальних мембран епітеліальних клітин кишківника комах [2, 3]. Ця властивість і зумовила широке використання *B. thuringiensis* як основи екологічно безпечних ентомопатогенних препаратів – альтернативи синтетичним хімічним інсектицидам [4].

Світові тенденції розвитку стійких агро-екосистем свідчать про те, що запобігти негативним втручанням у функціонування агробіоценозів можливо за умови здійснення фундаментальних комплексних і прикладних досліджень, які спрямовані на реалізацію природного потенціалу екосистем, ефективного використання їх біологічних можливостей. Тому пошук, селекція та комплексні дослідження перспективних штамів-продуцентів як базових складових біопрепаратів – на сьогодні надзвичайно актуальні напрями досліджень.

Мета роботи – оцінити біологічний потенціал штамів бактерій *B. thuringiensis* стосовно шкідливих комах агробіоценозів для ефективного їх використання у практиці рослинництва.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри екобіотехнології та біорізноманіття. У роботі використано новий відселектований *in vitro* штам ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H₁) № 87/3, виділений з личинок природних популяцій листогризучих комах *Leptinotarsa decemlineata* Say, старшого віку (L₄) в природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся. Після аналітичної селекції даний штам зберігається в робочій колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП. Референтний штам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H₁) 800, Федеральної державної бюджетної установи Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології, Санкт-Петербург, Пушкін — який використовується як виробничий штам-продуцент біопрепарату Бітоксикацилін.

Отримання чистих культур, визначення морфолого-культуральних властивостей, приготування послідовних розведень мікробних суспензій, культивування на рідких та агаризованих поживних середовищах проводили згідно зі загальноприйнятими в мікробіології та біотехнології методами [5–7].

Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м'ясопептонний бульон (МПБ), Лурія Бертрані (LB), а також оптимізовані лабораторно-промислові середовища дріжджо-полісахаридного складу (3,0%-вий білково-вітамінний комплекс, Белбіофарм, + 1,5%-ве кукурудзяне борошно), лабораторно-промислові середовища з мелясою (4,0%), оптимізоване середовище на основі капустиного гідролізату, які створюють відповідні вибіркові умови для розвитку специфічно адаптованих культур *Bt*.

Культивування проводили в колбах Ерленмейера на біотехнологічній качалці з термоплатформою (200 об./хв, температура

+30 °С) протягом 48–72 год. Об'єм середовища 50, 100 мл, кількість інокулюма – не менше 4,0 % від об'єму середовища. Титр колонієутворюючих одиниць не менше 2 млрд/мл культуральної рідини, який визначали шляхом глибинного посіву в агаризоване середовище, а також за допомогою камери Горяєва.

Морфологію бактеріальних клітин вивчали мікроскопіюванням фіксованих препаратів, фарбованих основним фуksiном Циля [7], а також з використанням диференційованої методики забарвлення В. Смирнова [6]. Мікроскопію проводили з використанням імерсії на світловому мікроскопі *Axio Scope* з фотофіксацією (збільшення 100), без імерсії на мікроскопі *Polivar* (збільшення 40). Біотехнологічні особливості культивування штамів *Bt* визначали в площині продуктивності аксенічних культур, характеру та швидкості утворення ентомоцидних метаболітів (споро-кристалічного комплексу) [7].

Вірулентність штаму *Bt* H₁ № 87/3, порівняно з референтним штамом, визначали в модельних дослідах на біотесті *Leptinotarsa decemlineata* Say. L1-2 за інфікування культуральною рідиною в різних концентраціях (розведення 1:1; 1:10; вихідна культуральна рідина) [2, 8]. Кількість загиблених особин у досліді враховували на 3-, 5-, 7- і 10-ту добу за формулою Аббота [9]

$$A = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \cdot 100,$$

де *A* – ентомоцидна активність, %;

*M*₀ – відсоток загиблених особин у досліді;

*M*_к – відсоток загиблених особин у контролі. Загибель у контролі не повинна перевищувати 15,0 %.

Антифідантну дію штамів-продуцентів *B. thuringiensis* та ефективність застосування рідких препаративних форм на їх основі проти колорадського жука на посівах картоплі вивчали в польових умовах. Площа облікової ділянки 8 м², повторність дослідів триразова. У досліді використано картоплю сорту Слов'янка.

Статистично експериментальні дані обробляли з використанням програм MS Excel 10.0 та STATISTICA 12.

Результати дослідження та їх обговорення. Досліджено трофічні ресурси для біотехнологічного культивування штамів *Bt* на рідких і агаризованих поживних середовищах з аналізом титру споро-кристалічного комплексу та тестуванням на ентомоцидні властивості біоагентів (табл. 1).

Дослідження впливу поживних середовищ (дріжджо-полісахаридне, мелясне, оптимізоване капустиане, МПБ, LB) на продуктивність штамів *Bt* першого серотипу показали різний рівень технологічності та прояву ентомопатогенної дії споро-кристалічного комплексу – від 2,0 до 4,8 млрд спор/мл та від 86,0 до 99,1 % відповідно. Вегетативна стадія росту аксенічних культур *Bt* 87 та 800 під час ферментації характеризується однорідністю бактеріальної популяції, клітини розташовуються попарно або з'єднані в ланцюжки. Перехід до спороутворення, як правило, характеризується збільшенням темпів

росту і розвитку, а також наявністю малих, ізольованих клітин. Найбільш сприятливим для експериментального отримання препаративних форм *Bt* виявилось оптимізоване капустиане середовище. При цьому досягається найбільший титр ентомоцидних компонентів у культурах *Bt*, зокрема 3,6 і 4,7 млрд/мл.

Оцінка антифідантного ефекту рідких препаративних форм *Bt*, який проявляється контактено через смакові рецептори особин колорадського жука, в польових дослідах показала (табл. 2), що личинки споживають незначну частину листової поверхні рослин (порівняно з контрольними неінфікованими), помітно відстаючи в рості та розвитку.

Результати польових досліджень підтверджують про високу біологічну ефективність рідких препаративних форм на основі *Bt* щодо личинок колорадського жука (92,0–99,0 %). Стратегія взаємовідношень ентомопатогенів *Bt* з організмом комахи характери-

1. Вплив трофічних ресурсів на продуктивність ентомоцидних штамів *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (модельний дослід, НУБіП, ІС НААН, 2016–2017 рр.)

Поживне середовище / штам-продуцент	Титр споро-кристалічного комплексу, млрд/мл культуральної рідини *	Ентомоцидна активність штамів <i>Bt</i> , % на 10 добу; біотест <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say. L ₁₋₂ (інфекційна концентрація 1:1)
Дріжджо-полісахаридне / штам <i>Bt</i> № 87/3	3,0	96,8 + 0,6
Дріжджо-полісахаридне / штам <i>Bt</i> № 800	2,4	95,6 + 1,2
4,0 % м'яси / штам <i>Bt</i> № 87	2,7	92,0 + 0,8
4,0 % м'яси / штам <i>Bt</i> № 800	2,6	94,3 + 0,5
МПБ / штам <i>Bt</i> № 87	2,1	86,0 + 1,1
МПБ / штам <i>Bt</i> № 800	2,0	88,3 + 1,2
LB / штам <i>Bt</i> № 87	2,3	87,7 + 1,8
LB / штам <i>Bt</i> № 800	2,1	89,0 + 1,3
Оптимізов. капустиане середовище / штам <i>Bt</i> № 87/3	4,7	99,1 + 0,9
Оптимізоване капустиане середовище / штам <i>Bt</i> № 800	3,6	98,7 + 0,7

* Результати трьох дослідів, де титр життєздатних спор наведений за максимальними межами варіювання продуктивності культур *Bt*.

2. Антифідантна дія штамів-продуцентів *B. thuringiensis* (біомест *Leptinotarsa decemlineata* Say., польовий дослід, НУБіП, 2017 р.)

Варіант дослідження	Ступінь пошкодження листкової поверхні, % (бал)	Маса личинок відносно контролю, %	Кількість пошкоджених рослин, %	% загиблих личинок через 7 діб*
Контроль (без обробок)	80,0 (4)	100,0	55,0	-
<i>Bt</i> № 87/3	19,0 (2)	51,3 + 0,15	20,0	94,8 + 0,85
<i>Bt</i> № 800	23,0 (2)	55,7 + 0,8	25,0	93,7 + 0,72

* Після обробки рідкою препаративною формою *Bt*.

зується як агресивна, оскільки збереження популяції хазяїна не є обов'язковою умовою існування ентомопатогенних бактерій.

Особливості механізму дії препаратів *Bt* на організм комахи, а також довготривалість

практичний досвід застосування різних серотипів для контролю чисельності комах слугує достатньою передумовою для широкого практичного застосування препаратів на основі *Bt* у системі мікробіологічного контролю комах.

Висновки

Аксенічна культура штаму *B. thuringiensis* № 87/3 після селекції *in vitro* має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу становить від 3,0 до 4,7 млрд/мл культуральної рідини) та високу біологічну ефективність щодо личинок колорадського

жука – 92,0–99,0 %. Метаболічна активність природних бактеріальних штамів *Bt* демонструє потенціал та важливість ефективного науково обґрунтованого використання біопрепаратів на їх основі в агробіології, біотехнології, аграрному виробництві.

Бібліографія

1. Писаренко В.М. Агроєкологія: навчальний посібник / В.М. Писаренко, П.В. Писаренко, В.В. Писаренко. – Полтава. – 2008. – 255 с.
2. Мікробіоконтроль численності наскомих и его домінанта *Bacillus thuringiensis*: монографія / [Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка В.Ф.]. – СПб; Пушкин: Інноваційний центр захисту рослин, 2009. – 252 с.
3. Bravo A. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control / A. Bravo, S. Gill, M. Soberon // *Toxicon*. – 2007. – Vol. 49. – P. 423–435.
4. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management / D. Chandler, A.S. Bailey, G.M. Tatchell et al. // *Phil. Trans. R. Soc. B*. – 2011. – 366:1987–1998. doi:10.1098/rstb.2010.0390.
5. Лескова А.Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценке их патогенных свойств / А.Я. Лескова. – Л., 1984. – С. 17–19.
6. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / Под ред. В.В. Смирнова. – К., 1983. – 50 с.
7. Smirnoff W.A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* / W.A. Smirnoff // *Insect. Pathol.* – 1962. – P. 384–386.
8. Lamenha C. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters / C. Lamenha, L. Finkler // Federal University of Pernambuco Brasil. – 2012. – P. 613–627.
9. Abbot W. A method of computing the effectiveness of an insecticide / W. Abbot // *J. Econ. Entomol.* – 1925. – 18. – P. 265–267.