

УДК 632.937.3

**БІОПРЕПАРАТ БАЦИЛОТУРІНГ ДЛЯ ЗАХИСТУ РОСЛИН
ВІД КОМАХ-ШКІДНИКІВ**

Машко Н.О., Патика Т.І., Надкерничний С.П.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

*Наведені результати вивчення ефективності застосування препарату бацилотурінгу, створеного на основі штаму ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* Л-4, як засобу захисту картоплі від колорадського жука. Показано, що обробка цим препаратом посівів картоплі забезпечує надійний захист культури від колорадського жука, сприяє приросту урожаю (до 99% в порівнянні з контрольним варіантом), поліпшенню якості бульб та збереженню доквілля від політантів.*

*Ключові слова: ентомопатогенні бактерії, *Bacillus thuringiensis*, біопрепарати, бацилотурінг, колорадський жук, картопля, урожай.*

Світові тенденції розвитку аграрної науки свідчать, що для підвищення екологічної сталості, отримання безпечних продуктів харчування слід вирішувати в першу чергу проблеми ефективного використання потенціалу екосистем. Саме тому науковці та аграрії-практики вважають за необхідне дотримуватись екологічних норм господарювання, на що в останні роки звертається дедалі більша увага.

Виявлення корисних природних біоагентів є невід’ємною складовою пошуку екологічно безпечних систем захисту рослин, це зокрема, – моніторинг фітосанітарної ситуації; комплекс агротехнічних заходів, серед яких одним із найважливіших є вирощування стійких до шкідливих організмів сортів; максимальне збереження корисних компонентів агроценозів; використання спеціалізованих біологічних агентів, нешкідливих для навколишнього середовища [1].

Розробляючи сучасні системи захисту рослин, дослідники особливу увагу приділяють методам біологічного (мікробіологічного) контролю чисельності комах-шкідників. Одним з найефективніших серед відомих і широко

застосовуваних нині засобів мікробіологічного контролю за шкідливими комахами є препарати на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Ці мікроорганізми, які є невід'ємною складовою природної мікробіоти, не шкідливі для довкілля. Механізм дії препаратів на основі *Bacillus thuringiensis* цілком природний і є прикладом ефективного використання природних процесів, якими останнім часом людина навчилася керувати [2, 3]. Особливості механізму дії біоагентів зазначених препаратів полягають у їх високій фізіологічній та екологічній вибірковості в межах певних систематичних груп комах, що гарантує безпечність для корисної ентомофауни (комаха-запилювачів, ентомофагів, інших біоагентів, які контролюють чисельність членистоногих фітофагів у біоценозах).

Мікробні препарати захисної дії слід розглядати як важливу складову інтегрованого методу захисту рослин, оснований на системному підході, який має включати економічно доцільні й екологічно безпечні організаційно-господарські, біологічні, селекційно-генетичні та хімічні заходи.

Метою наших досліджень було створити на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* і продуктів їх життєдіяльності новий екологічно безпечний препарат для захисту рослин від комах-шкідників, а також, розробити технології виробництва і застосування новоствореного препарату в агроecosистемах.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були штами ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* (Л-4, 187, 218, 240, 302, 315), виділені з природних популяцій комах зони Полісся.

Ідентифікацію бактерій проводили за схемою Н de Varjas, A. Vonnefoi, O. Lysenko [3], яка дозволяє порівнювати нові штами з типовими культурами кристалоутворюючих бактерій за їхніми морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями. Як типовий при ідентифікації був використаний колекційний (стандартний) штам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 98 (*H*). Для попарного порівняння штамів користувалися коефіцієнтом подібності [4].

У лабораторних умовах шляхом періодичного культивування *B. thuringiensis* вирощували на технологічних качалках (200-220 об/хв) з використанням модифікованого нами рідкого поживного середовища Євлахової і Швецової [5], в якому пептон був замінений на кукурудзяний екстракт з

додаванням витяжки із сіна і ґрунту. Процес культивування тривав 72 години за температури 28-32°C.

Виробництво дослідно-промислових партій біопрепарату на основі *B. thuringiensis* Л-4 здійснювали глибинним методом (ферментер об'ємом 1,0 м³), використовуючи модифіковане нами середовище [11], в якому патоку замінили на мелясу і змінили кількісний склад солей. Наявність ентомотоксинів визначали за методом Яловіцина [5] та методикою ВНДІСГМ [6]. Серологічний аналіз по джгутиковим Н-антигенам проводили з використанням реакції аглютинації зі специфічними сироватками [7].

Ентомопатогенну дію біопрепаратів визначали за формулою Франца [10]

$$M = 100 \times (1 - K_1/K_2 \times P_2/P_1)$$

де M – смертність, %,

K_1, K_2 – кількість живих особин до і після обробки в контролі,

P_1, P_2 – кількість живих особин до і після обробки в досліді.

Ефективність новоствореного препарату бацилотурінгу (біоагент *B. thuringiensis* Л-4) вивчали за умов польового дрібноділянкового досліду, порівнюючи з хімічним інсектицидом банколом та біологічним – бітоксимациліном (біоагент *B. thuringiensis* 98). Дослід був закладений на дерново-середньопідзолистому супіщовому ґрунті, який характеризувався такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі становив 1,1%; азоту, що легко гідролізується (за Тюрніним і Кононою), – 5,0-6,0 мг; рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 11-12 мг P_2O_5 ; обмінного калію (за Кірсановим) – 12-13 мг K_2O на 100 г ґрунту, рН 6,0, гідролітична кислотність – 1,5 мг-екв. на 100 г ґрунту. Площа облікової ділянки – 10 м², повторність - чотириразова. У досліді використано картоплю сорту Луговська. Спосіб посадки - гребневий з відстанню між рядами 70 см, а між рослинами в рядку – 35 см, глибина загортання бульб становила 8-10 см. Застосовувалась агротехніка вирощування, загальноприйнята для зони Полісся. Дослід закладено за Доспеховим [8]. У схему були включені такі варіанти: 1 – без обприскування вегетуючих рослин хімічними і бактеріальними препаратами (контроль); 2 – обприскування вегетуючих рослин банколом; 3 – обприскування вегетуючих рослин бітоксимациліном; 4 – обприскування вегетуючих рослин бацилотурінгом.

У дослідних варіантах визначали антифідантну та ентомопатогенну дію препаратів, а також проводили облік урожаю картоплі, її товарності.

Для статистичного опрацювання одержаних даних використовували метод дисперсійного аналізу [8].

Результати та їх обговорення. В результаті проведених досліджень відібрано культури бактерій, що мають високу ентомопатогенну активність щодо личинок колорадського жука: Л-4, 187, 218, 240, 302, 315.

Відібрані штами являють собою грампозитивні спороутворюючі палички із заокругленими кінцями, рухомі. Розміри клітин однодобових культур на МПА – 3,10-5,00 x 1,20-1,50 мкм. На 3-4-у добу на МПА в клітинах утворюються субтермінально розміщені овальні спори розміром 1,50-1,80 x 1,20-1,50 мкм, а також параспоральні включення (кристали) розміром 0,50-1,50 x 1,00 мкм. На поживному середовищі МПА через 2 доби культури *B. thuringiensis* утворюють матові, плоскі колонії кремового кольору діаметром 4-6 мм. Консистенція м'яка, структура дрібнозерниста; іноді колонії дисоціюють на S- і R-форми. На поверхні м'ясопептонного бульйону культури утворюють тонку плівку (вуаль), стовпчик середовища під плівкою прозорий, є осад. Факультативні анаероби. Мінімальна температура росту – +10°C, максимальна – +42°C, оптимальна температура – +28°C – +30°C, оптимальне рН середовища – 7,0-7,2.

Дані, що характеризують фізіолого-біохімічні ознаки відібраних культур ентомопатогенних бактерій, наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Фізіолого-біохімічні ознаки відібраних штамів ентомопатогенних бактерій

| Тест | Штам | | | | | | |
|--------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 98 (типовий) | Л-4 | 187 | 218 | 240 | 302 | 315 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Наявність пігменту | – | – | – | – | – | – | – |
| Розщеплення ескуліну | + | + | + | + | + | + | + |
| Гідроліз крохмалю | + | + | + | + | + | + | + |
| Відновлення нітратів в нітрити | + | + | + | + | + | + | + |
| Наявність кристалів | + | + | + | + | + | + | + |
| Розщеплення тирозину | + | + | + | + | + | + | + |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Розрідження желатини | + | + | + | + | + | + | + |
| Пептонізація молока | + | + | + | + | + | + | + |
| Процес утворення : | | | | | | | |
| ліпаз (ТВ-80) | + | + | + | + | + | + | + |
| ацетилметилкарбінолу | + | + | + | + | + | + | + |
| аміаку з аргініну | + | + | + | + | + | + | + |
| лецитинази | + | + | + | + | + | + | + |
| уреази | - | - | - | - | - | - | - |
| лугів на цитратному агарі | + | + | + | + | + | + | + |
| плівки (МПБ) | + | + | + | + | + | + | + |
| аміаку | + | + | + | + | + | + | + |
| сірководню | - | - | - | - | - | - | - |
| індолу | - | - | - | - | - | - | - |
| каталази | + | + | + | + | + | + | + |
| Кислоти, утворені з: | | | | | | | |
| манози | + | + | + | + | + | + | + |
| мальтози | + | + | + | + | + | + | + |
| маніту | - | - | - | - | - | - | - |
| сахарози | + | + | + | + | + | + | + |
| арабінози | - | - | - | - | - | - | - |
| ксилози | - | - | - | - | - | - | - |
| саліцину | + | + | + | + | + | + | + |
| лактози | - | - | - | - | - | - | - |
| целобіози | + | + | + | + | + | + | + |
| гліцерину | + | + | + | + | + | + | + |
| Вплив антибіотиків на ріст бактерій | Зони відсутності росту бактерій на МПА, мм | | | | | | |
| гентаміцин | 12 | 8 | 20 | 9 | 10 | 9 | 9 |
| тетрациклін | 32 | 31 | 30 | 33 | 29 | 30 | 20 |
| карбеніцилін | - | - | 10 | - | - | - | - |
| оксацилін | - | - | - | - | - | - | - |
| левоміцетин | 36 | 34 | 34 | 35 | 32 | 35 | 25 |
| фузидин | 24 | 21 | 24 | 24 | 20 | 19 | 18 |
| цефазолін | 9 | - | 24 | 24 | 20 | 19 | 7 |
| віброміцин | 32 | 31 | 35 | 30 | 29 | 30 | 20 |
| еритроміцин | 30 | 34 | 30 | 30 | 29 | 30 | 24 |
| олеандоміцин | 24 | 24 | 27 | 25 | 24 | 24 | 15 |
| Коефіцієнт подібності,% | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Примітка: “-” – ознака відсутня; “+” – ознака чітко проявляється.

За культурально-морфологічними, фізіолого-біохімічними та серологічними властивостями, а також за результатами нумеричної таксономії культури ентомопатогенних бактерій штами Л-4, 187, 218, 240, 302, 315 ідентифіковані нами як *B. thuringiensis var.thuringiensis* (H₁).

За умов лабораторних дослідів з використанням методів фазово-контрастної мікроскопії та спектрофотометрії були вивчені процеси споро- і токсиноутворення відібраних штамів на модифікованому середовищі Євлахової і Швецової. Отримані дані (табл.2) засвідчили, що штам *B. thuringiensis* Л-4 виявився найбільш активним продуцентом ентомотоксинів. Зазначений штам був використаний для подальших досліджень [9], якими були визначені оптимальні умови культивування і склад поживного середовища для його вирощування.

Таблиця 2. Вміст ентомотоксинів у дослідних зразках препаратів, виготовлених на основі штамів *B. thuringiensis*

| Показник | Штами <i>B. thuringiensis</i> | | | | | | |
|---|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 98 тип- повий | Л-4 | 187 | 218 | 240 | 302 | 315 |
| Титр спор млрд. в 1 мл рідкого кон- центрату | 3,35 | 5,54 | 4,16 | 3,76 | 6,08 | 4,92 | 4,05 |
| Сира біомаса, г у 100 мл сере- довища | 2,25 | 2,89 | 2,98 | 3,29 | 3,85 | 2,32 | 3,86 |
| Вміст δ-ендо- токсину, мг у 1 г сирової біомаси | 22,09 | 39,04 | 25,67 | 24,92 | 24,15 | 30,04 | 21,24 |
| Вміст β-екзо- токсину, мг/л | 454,40 | 901,95 | 581,07 | 407,11 | 405,20 | 732,84 | 492,34 |

Використовуючи результати проведених досліджень, ми створили препарат бацилотурінг на основі *Bacillus thuringiensis* Л-4, розробили лабораторний технологічний регламент з виготовлення біопрепарату та технологію його виробництва в дослідно-промислових умовах.

Бацилотурінг, виготовлений в дослідно-промислових умовах,

являє собою порошок сірого кольору, один грам якого містить 40-45 млрд. спор. Новостворений препарат використаний у подальших дослідженнях як засіб захисту картоплі від колорадського жука.

Результати вивчення антифідантної дії бацилотурінгу та ефективності його застосування проти личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) на посівах картоплі в польових умовах показали, що цей біопрепарат з успіхом можна використовувати в системі контролю листогризухих фітофагів (табл. 3).

Таблиця 3. Антифідантна дія препаратів на личинок колорадського жука (в середньому за 2001-2005 рр.)

| Варіант досліджу | Кількість пошкоджених кущів картоплі, % | Ступінь пошкодження листової поверхні, % (бали) | Маса личинок відносно контролю, % | Кількість загинувших личинок через 6 діб після обприскування, % |
|---|---|---|-----------------------------------|---|
| Без застосування хімічних і мікробних препаратів (контроль) | 65 | 57 (4) | 100 | – |
| Обприскування рослин картоплі банколом | 16 | 11 (2) | 79 | 97 |
| Обприскування рослин картоплі бітоксубациліном | 24 | 14 (2) | 87 | 85 |
| Обприскування рослин картоплі бацилотурінгом | 17 | 14 (2) | 81 | 91 |

При обробці рослин картоплі банколом переважна більшість (97%) личинок гине вже в перші три доби, тоді як після обробки біопрепаратами на основі *B. thuringiensis* личинки спочатку голодують (що підтверджує антифідантний ефект цих засобів) і тільки після 5-6 діб гинуть (до 91%). Для знищення шкідників кожної генерації шкідника слід проводити окрему обробку біоінсектицидами; за період вегетації рослин проводиться 2-3

такі обробки. Головне – вчасно обробити рослини при масовій появі личинок молодшого віку (L_{1-2}). Тривалість личинкової стадії колорадського жука в зоні Полісся становить 21 день.

Препарати на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis*, які використовувалися в польовому досліді, виявляючи високу ентомоцидність, різко обмежуючи чисельність личинок колорадського жука, забезпечують надійний захист картоплі, що сприяє значному підвищенню урожайності та поліпшенню якості бульб (табл.4). За ефективністю бацілотурінг не поступався хімічному препарату банколу і біопрепарату бітоксисабциліну.

Таблиця 4. Урожайність картоплі сорту Луговська на дерново-підзолистому ґрунті при застосуванні біопрепаратів на основі *B.thuringiensis* (в середньому за 2001-2005 рр.)

| Варіант досліду | Урожай, ц/га | Товарність, % | Приріст урожаю | |
|---|-----------------|------------------|----------------|------|
| | | | ц/га | % |
| Без застосування хімічних і мікробних препаратів (контроль) | 84 | 55,7 | – | – |
| Обприскування банколом | 166 | 78,9 | 82 | 97,6 |
| Обприскування бітоксисабциліном | 156 | 79,8 | 72 | 85,7 |
| Обприскування бацілотурінгом | 167 | 81,6 | 83 | 98,8 |

Таким чином, створений нами на основі *B. thuringiensis* Л-4 новий препарат бацілотурінг являє собою вискоєфективний та екологічно безпечний засіб захисту картоплі й інших сільськогосподарських культур від колорадського жука. При його застосуванні урожайність картоплі зростає, порівняно з контролем, в 2,0 рази, суттєво поліпшуючи при цьому якість бульб (товарність 81,6% проти 55,7% у контролі) та уберігаючи навколишнє середовище від забруднення засобами хімізації.

1. Патица В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. та ін. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. – К.: Урожай, 1993. – С. 141-156.
2. Гейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. – М.: Колос, 1972. – 640 с.
3. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. – М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
4. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
5. Рекомендации к практикуму по бактериозам насекомых. – Саранск, 1985. – 118 с.
6. Данилова Э.Б., Барбашова Н.М. Спектрофотометрическое определение β -экзотоксина в культуральной жидкости *B.thuringiensis* // Тр. ВНИИСХМ. – 1985. – Т. 55. – С. 115-119.
7. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. – К.: Наукова думка, 1968. – 316 с.
8. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
9. Пат. 53097 А Україна , А01N63/00, С12N1/20. Штам бактерій *Bacillus thuringiensis var.thuringiensis* Л-4 для одержання бактеріального препарату проти колорадського жука / Машко Н.О., Надкерничний С.П., Богдан С.Д. – Заявл. 06.03.2002; Опубл. 15.01.2003, Бюл. № 1.
10. Туряница А.И., Бойко Н.В. Патогенное действие бактерий рода *Klebsiella* на колорадского жука // Микробиол. журн. – 1996. – Т. 58, № 1. – С. 73-79.
11. Дрегваль О.А., Черевач Н.В., Винников А.И. Оптимизация состава питательной среды для культивирования энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* // Бюл. Института сільськогосподарської мікробіології. – 2000. – № 8. – С. 46-47.

БИОПРЕПАРАТ БАЦИЛЛОТУРИНГ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ

Машко Н.А., Патыка Т.И., Надкерничный С.П.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

*Приведены результаты исследований по применению препарата бациллотуринга, созданного на основе штамма энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* Л-4, для защиты картофеля от колорадского жука. Показано, что использование бациллотуринга на посевах картофеля обеспечивает надежную защиту культуры от колорадского жука, способствует приросту урожая (до 99% по сравнению с контрольным вариантом), улучшению качества клубней и сохранению окружающей среды от поллютантов.*

*Ключевые слова: энтомопатогенные бактерии, *Bacillus thuringiensis*, биопрепараты, бациллотуринг, колорадский жук, картофель, урожай.*

BACILLOTHURINGUS BIO-PREPARATION FOR PROTECTION OF PLANTS FROM INSECT PESTS.

Mashko N.A., Patyka T.I., Nadkernichny S.P.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*It is presented the results of a research as to the usage of Bacillothuringus preparation which has been created on the basis of a new *Bacillus thuringiensis* L-4 strain of entomo-pathogenic bacteria as a means of protection of potato's from Colorado potato beetle.*

It has been shown that use of Bacillothuringus on potato crops provides a reliable protection of the plants from Colorado potato beetle and contributes to the increase of yields (up to 99% in comparison with the reference crops), improvement of individual tubers' quality and preservation of environment from pollutants.

*Key words: entomo-pathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*, bio-preparations, Bacillothuringus, Colorado beetle, potato, harvest.*