

АКТИВНІ ШТАМИ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* З КОМАХ ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ

Кузнєцова Л.М., Конопльова Г.М.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Карла Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513, Україна

*З комах природних популяцій півдня України виділено штами бактерій *Bacillus thuringiensis*, що діють ефективно проти листогризучих комах *Lepidoptera* і *Diptera*. Вивчені фізіолого-біохімічні властивості і спектр ентомопатогенної дії даних бактерій. Активність патогенів проти личинок колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, ряд *Coleoptera*), гусениць капустиної совки (*Mamesta brassicae*, ряд *Lepidoptera*) та американського білого метелика (*Huphantria cunea Dryri*, ряд *Lepidoptera*) молодшого віку становить 74,7-100%. Штами передано до колекції бактеріальних ентомопатогенів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН як перспективні для розробки біопрепаратів для захисту рослин від листогризучих шкідників.*

Ключові слова: штами, ентомопатогенні бактерії, ідентифікація, технологічність, ефективність.

Теоретичне обґрунтування фітосанітарної оптимізації агроєкосистем неможливе без урахування біологічних елементів (популяцій ентомофагів, мікробів-антагоністів та ін.), значну роль серед яких відіграють ентомопатогенні мікроорганізми. Ці ентомопатогени є основою мікробних препаратів, що використовуються в інтегрованій системі захисту рослин. Безперечною перевагою таких препаратів для регулювання чисельності комах є їх безпечність для навколишнього середовища [1].

Найбільш розповсюдженими агентами біологічного контролю шкідників є бактерії *Bacillus thuringiensis*. Встановлено, що *B. thuringiensis* є політипажним видом, різні штами якого вирізняються фізіологічними і патогенними властивостями і можуть бути використані проти шкідливих організмів, раніше не охоплених біометодом [2]. Очевидно, в процесі виділення нових штамів будуть відкриті нові можливості бактеріологічного контролю комах.

Нині розробкою біоінсектицидів займаються десятки компаній, найбільш значними з яких є ICI (Великобританія), Monsanto, Ecogen, Mycogen, Abbot – Laboratories (США), Sandor (Швейцарія), Hoechst (Німеччина), Novo і Christian Hansen (Данія) та ін. Науковці одержують нові штами – продуценти біотоксинів, а також створені методами генної інженерії мікроорганізми з посиленими біопестицидними властивостями.

Враховуючи вищезазначене, на базі Південного філіалу Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН проводяться дослідження з виділення та ідентифікації високоактивних ентомопатогенних штамів *B. thuringiensis*, визначення спектра їхньої дії проти найбільш розповсюджених листогризухих шкідників овочевих, плодово-ягідних та декоративних культур.

Матеріали й методи. Дослідження проводили з використанням методів, загальноприйнятих у мікробіології та ентомології. Штами бактерій виділяли за методикою А.А. Євлахової і О.І. Швецової [3], морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій вивчали за методиками А. Barjac, А. Bonnefoi [4] і О. Lysenko [5]. Здатність штамів синтезувати термостабільний екзотоксин визначали за допомогою біотесту *Musca domestica L.* [6].

Ентомопатогенні властивості бактерій вивчали за методикою А.Я. Лескової [6] у лабораторних дослідах на личинках колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*, ряд *Coleoptera*), гусениць капустиної совки (*Mamesta brassicae*, ряд *Lepidoptera*) та американського білого метелика (*Hyphantria cunea Dryri*, ряд *Lepidoptera*). Для обробки корму (листя) використовували спорові культури штамів *B. thuringiensis* з титром спор 200 млн/мл.

Спорові культури отримували при культивуванні бактерій у дріжджово-полісахаридному середовищі у колбах на технологічних качалках. За еталон брали спорову культуру *B. thuringiensis var. thuringiensis* 98 – аналог штаму-основи біопрепарату бітоксинациліну і *B. thuringiensis var. kurstaki* 0293 – аналог штаму-основи лепідоциду.

Вивчення технологічності нових штамів і кінетичних показників розвитку культури здійснювали за методом С.Д. Перта [7].

Результати та їх обговорення. З природних популяцій комах зібрано близько 150 загиблих і хворих комах, представників рядів *Coleoptera*, *Lepidoptera* і *Diptera*. Виділено 27 штамів мік-

роорганізмів, 6 із яких (табл. 1) за первинними ознаками споро- і кристалоутворення віднесено до групи *thuringiensis*.

Таблиця 1. Штами *B. thuringiensis*, виділені з комах природних популяцій півдня України (2001-2005 рр.)

Штам <i>B. thuringiensis</i>	Станція збору	Об'єкт збору	Стан комах
0299	лісосмуга	кільчатий шовкопряд	загиблі гусениці 2-3-денного віку
0304	поле	колорадський жук	загиблі імаго
0314	південний берег Криму	непарний шовкопряд	хворі і загиблі личинки 1-4-денного віку
0326	лісосмуга	бояришниця	хворі гусениці 2-3-денного віку
0332	лісосмуга	златовійка	загиблі гусениці 3-4-денного віку
0344	житловий масив	американський білий метелик	загиблі лялечки

Отримані результати (табл. 2) свідчать, що відібрані штами бактерій здатні активно діяти проти личинок і гусениць досліджуваних шкідників (на 10-у добу досліду гинуло 74,7-100 % комах). Особливо ефективним щодо шкідників виявився штам *B. thuringiensis* 0326, дія якого практично дорівнює дії еталонних штамів. Проти личинок колорадського жука активно діють також штами *B. thuringiensis* 0332 і 0344 (гине від 98,7 до 100 % комах), проти гусениць капустиної совки – штам *B. thuringiensis* 0304 (загибель комах – 84,0 %). Особливо високу активність відібрані штами бактерій виявляють щодо гусениць американського білого метелика (загибель комах – 92,3-100 %).

Ідентифікацію нових активних штамів проводили за схемою, яка включає визначення фізіолого-біохімічних властивостей і здатності до продукування термостабільного екзотоксину (табл. 3).

Визначено здатність виділених штамів утворювати ацетилметил-карбінол (АМК) і лецитиназу та високу здатність до гідролітичного розщеплення крохмалю: зона гідролізу складає 4-5 мм. Як джерело вуглецю значна частина бактерій засвоює

сахарозу, манозу, саліцин. Штами бактерій мають протеолітичну активність, яка виявляється у розрідженні желатини і пептонізації казеїну молока. У штамів, які не засвоюють сахариди, виявлена здатність до утворення уреазі і пігменту, при рості на МПБ відмічена відсутність вуалі. Наявність термостабільного екзотоксину виявлена у бактерій, що мають ті ж самі фізіолого-біохімічні властивості, що й штам *B. thuringiensis var. thuringiensis* 98.

Таблиця 2. Ентомоцидна активність нових штамів *B. thuringiensis* проти розповсюджених шкідників овочевих і декоративних насаджень Криму

Штам <i>B. thuringiensis</i>	Загинуло на 10-у добу після обробки, %		
	личинки коларадського жука	гусениць капустяної совки	гусениць американського білого метелика
Контроль (вода)	6,7±0,1	2,7±0,1	5,3±0,3
98 (еталон)	92,3±0,1	93,3±0,1	100
0293 (еталон)	–	89,83±0,3	100
0299	83,4±1,0	81,3±0,7	98,7±0,3
0304	92,3±0,3	84,0±1,3	100
0314	–	71,3±0,1	100
0326	98,7±0,3	87,3±0,3	100
0332	100	68,7±0,3	100
0344	98,7±0,7	83,4±1,3	92,3±0,7

Аналіз отриманих результатів дозволив ідентифікувати нові штамми бактерій як *B. thuringiensis var. kurstaki* (серотип 3) і *B. thuringiensis var. thuringiensis* (серотип 1).

У подальшому досліджували технологічність – при культивуванні у дріжджово-полісахаридному середовищі (ДПС) – виділеного штаму *B. thuringiensis var. thuringiensis* 0326, який виявив високу активність проти личинок коларадського жука, гусениць капустяної совки і американського білого метелика.

Встановлено, що формування спор практично завершується через 30-33 години культивування, після чого відмічається вихід спор зі спорангіїв (табл. 4). Кінцевий титр становив 2,4-2,8 млрд спор в 1 мл культури.

Таблиця 3. Результати ідентифікації штамів *B. thuringiensis*, виділених з комах природних популяцій у 2001-2005 рр.

Штам <i>B. thuringiensis</i>	Утворення		Гідроліз крохмалю	Засвоєння			Протеоліз	Утворення			Наявність екзотоксину	Назва варіанту <i>B. thuringiensis</i>
	АМК	лецитинази		сахарози	манози	саліцину		уреази	вуалі	пігменту		
0293 (еталон)	+	+	+	-	-	-	+++	+	-	+	-	<i>var. kurstaki</i>
0308	+	++	+	-	-	-	++	+	-	+	-	<i>var. kurstaki</i>
0314	+	+	++	-	-	-	+++	+	-	+	-	<i>var. kurstaki</i>
98 (еталон)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>var. thuringiensis</i>
0299	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>var. thuringiensis</i>
0304	+	+	++	+	+	+	++	-	+	-	+	<i>var. thuringiensis</i>
0326	+	+	+	+	+	+	+	-	++	-	+	<i>var. thuringiensis</i>
0332	+	++	+	+	++	+	++	-	++	-	+	<i>var. thuringiensis</i>
0344	+	+	++	+	+	+	+++	-	+	-	+	<i>var. thuringiensis</i>

Примітка: “+” – реакція позитивна; “-” – реакція негативна; гідроліз крохмалю: + зона гідролізу 3-4 мм; ++ зона гідролізу 5-6 мм; протеоліз желатини: + розрідження 1/3 стовпчика; ++ розрідження 2/3 стовпчика; +++ розрідження повне.

Таблиця 4. Технологічні показники розвитку *B. thuringiensis* 0326 при культивуванні в ДПС

Етап розвитку бактерій	Термін культивування, годин
Початок утворення спорогенної зони	17-20
Масова споруляція	23-25
10% вільних спор	35-37
Спори і кристали у вільному стані	68-72

Таким чином, одержані дані свідчать, що штам *B. thuringiensis* 0326 є технологічним при використанні ДПС і може бути застосований для розробки препаративної форми.

Виділені активні штами передано до колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

1. Гулий В.В., Лескова А.Я., Мурза В.И. // Информ. бюлл. ВПС МОББ. – 1986. – № 17. – С. 19-45.

2. Штерншис М.В. Повышение эффективности бактерий и их роль в защите растений. – Новосибирск, 1987. – С. 4-72.

3. Евлахова А.А., Швецова О.И. Болезни вредных насекомых. Методы учета, сбора, хранения насекомых, пораженных болезнями. – М., 1965. – С. 51.

4. Barjac H. de, Bonnefoi A. Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* a Kuj to their differentiation // J. Insect. Pathol. – 1963. – N 11. – P. 333.

5. Lysenko O. The taxonomy of entomogenous bacteria // Insect. Pathol. – 1963. – N 2 – P. 638-661.

6. Лескова А.Я. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств (Методические указания). – Л., 1984. – С. 17-19.

7. Перту С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток – М.: Мир, 1978. – 332 с.

АКТИВНЫЕ ШТАММЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* ИЗ НАСЕКОМЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Кузнецова Л.Н., Коноплёва Г.Н.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной
микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

*Из насекомых природных популяций юга Украины выделены штаммы бактерий *Bacillus thuringiensis*, эффективные против листогрызущих насекомых *Lepidoptera* и *Diptera*. Изучены физиолого-биохимические свойства и спектр энтомопатогенного действия данных бактерий. Активность патогенов против личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, отр. *Coleoptera*), гусениц капустной совки (*Mamesta brassicae*, отр. *Lepidoptera*) и американской белой бабочки (*Hyphantria cunea Dryri*, отр. *Lepidoptera*) младшего возраста составляет 74,7-100 %. Штаммы переданы в коллекцию бактериальных энтомопатогенов Института сельскохозяйственной микробиологии УААН как перспективные для разработки биопрепаратов для защиты растений от листогрызущих насекомых.*

Ключевые слова: *штамм, энтомопатогенные бактерии, идентификация, эффективность, технологичность.*

THE ACTIVE STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS* FROM INSECTS OF NATURE POPULATIONS

Kuznetsova L.N., Konoplyova G.N.

The South Experimental Station of Institute of Agricultural
Microbiology UAAS, Gvardeyskoye

*Strains of *Bacillus thuringiensis* effecient against leaf-chewing insects of *Lepidoptera* and *Diptera* genus have been isolated from insects of nature populations. Their physiological and biochemical properties and the spectrum of entomopathogenic action were studed. The activity of pathogens against the larva of potato beetle (*Leptinotarsa decemlinaeta*, order *Coleoptera*), caterpillars of cabbage moth (*Mamesta brassicae*, order *Lepidoptera*) and fall webworm moth (*Hyphantria cunea Dryri*, order *Lepidoptera*) of small age grade was around 74,7-100 %. These strains were added to bacterial entomopathogene collection of the Institute of agricultural microbiology of UAAS as perspective for elaboration of biopreparations for plants protection against leaf-chewing insects.*

Key words: *strains, entomopathogenic bacteria, identification, effectiveness.*