

УДК 579.64:632.937.3

**ШТАММЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
BACILLUS THURINGIENSIS ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА
БИОПРЕПАРАТОВ В УКРАИНЕ****Кузнецова Л.Н., Крыжко А.В., Алексеенко О.П.**

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной
микробиологии УААН,
ул. К. Маркса, 107, п. Гвардейское, АР Крым, 97513, Украина
E-mail: icxm@mail.ru

*Из насекомых природных популяций выделены штаммы бактерий группы *Bacillus thuringiensis*, высокопатогенные для листогрызущих вредителей Coleoptera и Lepidoptera. Изучена способность штаммов к продуцированию термостабильного экзотоксина, проведена оценка их технологичности. Выделенные штаммы перспективны для создания микробного биопрепарата для защиты растений от листогрызущих вредителей.*

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, патогенность, токсины, защита растений

В последние годы, учитывая негативные результаты широкого применения химических инсектицидов, все большее внимание как ученых, так и практиков привлекают микробиологические методы борьбы с вредителями растений. В отличие от ядохимикатов, микробные инсектициды обладают специфически избирательным действием на насекомых-вредителей, относительно безвредны для человека и окружающей его фауны и флоры.

Бактериальные инсектициды производят во многих промышленно развитых странах мира и применяют на всех континентах Земного шара (кроме Антарктиды). Они эффективны в борьбе с гусеницами и личинками чешуе-, прямо-, жестко-, перепончато- и двукрылых насекомых. Наибольший рынок сбыта бактериальных препаратов – Северная Америка (около 50 % мирового производства), затем следуют Центральная и Южная Америка, Европа и Азия.

Наибольшее применение находят бактериальные инсектициды на основе спорообразующего микроорганизма *Bacillus thuringiensis* – естественного обитателя биоценозов. Несмотря

на то, что впервые бактерии данного вида были выделены из насекомых, последующие исследования показали их широкую распространенность в окружающей среде. Некоторые авторы сообщают о естественном обитании бактерий данного вида в почве [1], A.W. West и S.F. Petras [2, 3] – о выявлении *B. thuringiensis* в составе микрофлоры листьев. Работами Л.И. Бурцевой и Г.В. Калмыковой [4] показано присутствие бактерий в насекомых, подстилках скотного двора и пастбищ.

Общепризнанная схема внутривидовой идентификации *B. thuringiensis* была разработана в институте Пастера в 1962 г. Охарактеризовано более 50 подвидов и показано, что *B. thuringiensis* является политипажным видом, различные штаммы которого отличаются физиологическими и патогенными свойствами и могут быть использованы против практически важных объектов, ранее не охваченных биометодом [5]. В процессе выделения новых штаммов *B. thuringiensis* могут быть открыты новые возможности биологического контроля насекомых.

Патогенное действие *B. thuringiensis* на насекомых связано с токсинами и другими метаболитами бактерий. К настоящему времени хорошо изучены только δ - и β -токсины. Основными, определяющими энтомопатогенные свойства бактерий, являются δ -токсины – кристаллические включения белкового происхождения (*Cry*-белки). β -экзотоксин продуцируется только отдельными подвидами *B. thuringiensis* и по структуре является аналогом аденозинтрифосфорной кислоты [6]. Экзотоксин играет особую роль в патогенезе насекомых, оказывая не только летальный, но и тератогенный эффект [7], и действуя как синергист в комплексе со спорами бактерий и кристаллами δ -токсина.

Учитывая, что β -экзотоксин имеет спектр токсического действия, отличающийся от кристаллического δ -токсина, и обладает иным механизмом действия, перспективным является создание бактериальных препаратов на основе патогенов, содержащих оба токсина.

Актуальность изучения *B. thuringiensis* и применения этого микроорганизма в системе защиты растений от вредителей определяет научно-исследовательскую работу лаборатории микробиометода Южной опытной станции ИСХМ УААН, целью которой является выделение из насекомых природных популяций энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis* и разработка на их

основе препаратов, альтернативных химическим инсектицидам.

Материалы и методы. В работе использовали общепринятые в микробиологии и энтомологии методы. Выделение новых штаммов бактерий проводили по методике А.А. Евлаховой и О.И. Швецевой [8]. Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств – согласно методик А. Varjas, A. Bonnefoi [9] и О. Lysenko [10].

Энтомопатогенные свойства бактерий изучали, руководствуясь методикой А.Я. Лесковой [11]. Для отбора высокоактивных штаммов в качестве биотестов использовали личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, *Coleoptera*). Обработку корма (листья картофеля) проводили споровыми культурами бактерий при титре спор 200 млн/мл [11].

Для сравнения использовали споровую культуру *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 98 (биоагент препарата Битоксибациллина) с высокими антифидантными свойствами. Споровые культуры получали при культивировании бактерий в дрожже-полисахаридной среде в колбах объемом 750 мл, содержащих 35 мл питательной среды, на технологических качалках при t° 28-30 °C и 220 об./мин.

В ходе исследований, наряду с оценкой энтомопатогенных свойств бактерий, проводили оценку их антифидантных свойств по проценту повреждения листовой поверхности на третьи сутки опыта.

Для определения способности штаммов продуцировать термостабильный экзотоксин как тест-насекомое использовали 72-часовые личинки комнатной мухи (*Musca domestica* L.) Активность продуцируемого экзотоксина оценивали по результатам учета гибели насекомых при разной концентрации надосаточной жидкости. Для сравнения в опытах использовали надосаточную жидкость, полученную при культивировании *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 98, активно продуцирующей термостабильный экзотоксин.

Для определения спектра энтомопатогенного действия активных штаммов бактерий в качестве биотестов использовали личинок и гусениц листогрызущих насекомых младших возрастов.

Изучение технологичности отобранных штаммов и кинетических показателей развития культуры проводили по С.Д. Перту [12].

Результаты и их обсуждение. Научными экспедициями по поиску и сбору эпизоотологического материала для выделения штаммов *B. thuringiensis* были охвачены практически все южные области Украины, районы Краснодарского края, Иркутской области Российской Федерации и ряд районов Молдавии. В результате собрано более двух тысяч больных и погибших насекомых, представителей отрядов *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Neuroptera*, *Orthoptera*, *Diptera* и др. По результатам микробиологического анализа насекомых выделено 839 изолятов бактерий, 147 из которых по признакам споро- и кристаллообразования были отнесены к группе *B. thuringiensis*. Полученные активные штаммы составляют коллекцию штаммов *B. thuringiensis*, часть из них входит в состав Национальной коллекции полезных почвенных микроорганизмов при Институте сельскохозяйственной микробиологии УААН.

Для отбора высокопатогенных штаммов использовали личинок колорадского жука, как широко распространенного вредителя, не восприимчивого к промышленным биопрепаратам *B. thuringiensis* на основе споро-кристаллического комплекса [13].

В результате анализа, 14 из всех выделенных штаммов *B. thuringiensis* были отнесены к высокопатогенным (табл. 1). Под действием отобранных штаммов гибель личинок достигала 95,5-100 % (в контрольном варианте с *B. thuringiensis* 98 – до 97,3-100 %) в течение 7-10 суток. Причем, в вариантах со штаммами *B. thuringiensis* 800, 888, 990 и 994 до 50 % насекомых погибало в течение 3-4-х суток. Как наиболее эффективный по исследуемым показателям следует выделить штамм 800, под действием которого в течение 4-5 суток гибель личинок достигала 100 %.

Из отобранных патогенов 9 штаммов обладали антифидантными свойствами. Поедаемость корма, обработанного такими штаммами в течение первых 3-х суток не превышала 5 %, что соответствовало показателю штамма *B. thuringiensis* 98 (табл. 1).

Установлено, что штаммы, проявляющие высокую токсичность по отношению к личинкам колорадского жука, являются продуцентами термостабильного β -эзотоксина. Как в вариантах с тестируемыми штаммами, так и в варианте со штаммом *B. thuringiensis* 98, вылет мух из куколок отмечен не был. Действие токсина проявлялось как на стадии пупария, так и на стадии

куколки, что в конечном итоге привело к 100 % гибели подопытных насекомых.

Таблица 1. Токсичность штаммов *B. thuringiensis* для личинок младших возрастов *Leptinotarsa decemlineata* (L₁₋₂)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Гибель личинок, %				% поедаемости корма на 3-и сутки опыта
	3 суток	5 суток	7 суток	10 суток	
Контроль (вода)	0,0	2,7	5,3	9,3	75-80
98	28,0±1,0	90,7±0,3	97,3±0,1	100	до 5
708	27,3±0,7	88,0±0,7	97,3±0,2	100	35-40
742	30,7±0,4	90,7±1,3	100		15-20
800	49,3±1,0	100			до 5
804	36,0±0,3	90,7±0,3	96,0±1,3	100	0
874	18,7±0,2	98,7±0,3	100		до 5
888	50,7±0,7	98,7±0,1	100		0
890	25,3±0,3	90,7±0,7	98,7±0,3	100	до 5
989	12,0±1,3	82,7±1,0	100		75-80
990	55,6±1,0	84,4±0,4	100		0
994	46,7±0,3	82,2±0,3	95,5±1,0	100	0
39-Н	25,3±0,5	62,7±0,1	100		до 5
072	21,3±1,0	54,7±0,4	86,7±1,0	100	5-7
0170	25,3±0,5	82,0±0,9	96,0±0,7	100	до 5
0177	42,6±0,3	58,6±,3	100		до 5

Для определения спектра действия выделенных бактерий изучена их эффективность против наиболее вредоносных на территории Крыма листогрызущих насекомых отряда *Lepidoptera* – златогузки (*Euproctis chrysorrhoea*), кольчатого шелкопряда (*Malacosoma neustria*), плодовой моли (*Lithocolletis corylifoliella*) и американской белой бабочки (*Hyphantria cunea Dryri*). опыты проводили в условиях лаборатории.

Показано, что исследуемые патогены являются активными против гусениц данных видов вредителей: 92,0-100 % насекомых погибали, в основном, в течение 7-ми суток, на 10-е сутки живых гусениц не наблюдали ни в одном из вариантов опыта (табл. 2).

Особенно восприимчивыми к *B. thuringiensis* оказались гусеницы плодовой моли и американской белой бабочки. Как наиболее эффективные против этих вредителей, следует выделить штаммы *B. thuringiensis* 888, 0177 и 800, в вариантах применения 130

которых полная гибель насекомых отмечена в течение 4-5 суток. Эффективность указанных штаммов *B. thuringiensis* против гусениц златогузки была ниже в среднем на 10-12 %.

Таблица 2. Токсичность штаммов *B. thuringiensis* для наиболее распространенных листогрызущих вредителей Крыма (L₁₋₂)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Гибель гусениц на 7-й день учета, %			
	<i>Euproctis chrysorrhoea</i>	<i>Malacosoma neustria</i>	<i>Lithocolletis corylifoliella</i>	<i>Hyphantria cunea Dryri</i>
Контроль (вода)	0,0	2,6	5,3	2,6
98	85,3±0,3	100	96,7±0,1	100
800	85,3±0,3	100	100*	93,3
888	94,3±1,0	98,7±0,7	100	100*
890	82,7±0,1	98,7±0,7	93,3±0,3	97,6±0,3
994	94,3±0,3	100	100	98,0±0,7
39-Н	97,6±1,3	92,0±0,7	92,0±0,1	100
0177	78,6±1,0	97,3±0,3	100	100*

* – гибель на 5-й день опыта

Для отбора высокопатогенных штаммов, перспективных для разработки биопрепаратов, при культивировании бактерий в дрожже-полисахаридной среде, проведена первичная оценка их технологичности по двум показателям: титр жизнеспособных спор в культуре и период культивирования.

Установлено, что в период культивирования весь цикл развития культур соответствует пяти стандартным фазам развития бактерий группы *B. thuringiensis*. Начальный процесс культивирования сопровождается *lag* – фазой и следующей за ней экспоненциальной фазой роста, которая через 6-8 часов переходит в фазу замедленного роста, а затем, через 10-13 часов, – в стационарную фазу. В стационарной фазе максимальный титр вегетативных клеток в жидкой культуре отмечали в вариантах со штаммами 888 и 994 (соответственно $2,7-3,0 \times 10^8$ и $3,1-3,4 \times 10^8$ КОЕ в 1 мл). В этот же период происходит интенсивное формирование белковых кристаллов и проспор. Последняя фаза культивирования характеризовалась активным процессом формирования спор и последующим лизисом и освобождением спор.

Титр спор и период культивирования варьировали в

зависимости от штамма *B. thuringiensis* (табл. 3). Так, минимальное количество спор в 1 мл культуры (в среднем 2,0-2,4 млрд) было получено в варианте со штаммами 890 и 39-Н, максимальное (в среднем 3,5-3,9 млрд) – в вариантах со штаммами 888 и 994.

По исследуемым показателям, как наиболее технологичные, можно выделить штаммы *B. thuringiensis* 800, 888 и 994. Титр жизнеспособных спор в культуре таких штаммов превышал 3,4 млрд спор в 1 мл среды и период культивирования составлял не более 48 часов.

Таблица 3. Сравнительная оценка штаммов *B. thuringiensis* по первичным технологическим параметрам

Параметры	Штаммы <i>B. thuringiensis</i>						
	98	800	888	890	994	39-Н	0177
Титр спор культуры (млрд/мл)	2,1-2,5	3,4-3,7	3,7-4,2	2,0-2,5	3,4-3,8	2,1-2,4	3,1-3,5
Период культивирования (час.)	38-44	40-44	44-48	42-46	40-46	46-52	34-40

Таким образом, штаммы *B. thuringiensis* 800, 888 и 994, обладая высокими патогенными свойствами, образуя споро-кристаллический комплекс и продуцируя термостабильный β -экзотоксин, с учетом исследованных первичных технологических показателей, могут быть основой для разработки и производства бактериальных препаратов для защиты растений от листогрызущих вредителей в агроценозах Украины.

1. Половинко Г.П. Встречаемость энтомопатогенных кристаллообразующих бактерий вида *Bacillus thuringiensis* в почвах Сибири и Казахстана /Г.П. Половинко, Н.В. Богомолова //Сиб. экол. журн. – 1997. – Т. 4, № 6. – С. 571-577.

2. West A.W. Persistence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil supplemented with grass or manure /A.W. West and H.D. Burges //Plant and Soil. – 1985. – Vol. 83. – P. 389-398.

3. Petras S.F. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil /S.F. Petras and L.E. Casida //Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – Vol. 50. – P. 1496-1501.

4. Бурцева Л.И. Экологически безопасные и беспестицидные технологии получения растениеводческой продукции /Л.И. Бурцева, Г.В. Калмыкова //Всерос. науч.-произв. совещ. (г. Краснодар, 1994): Тез. докл. – Пушино, 1994. – С. 202-204.
5. Georgis R. Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture /R. Georgis //Microb. Insecticides: Novelty or Necessity?: Proc. Symp. Brit. Crop. Prot. Counc. (Warwick, 16-18 Apr., 1997). – Farnham, 1997. – С. 243-252.
6. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты /Под ред. В.В. Глупова. – М.: Круглый год, 2001. – 736 с.
7. Лескова А.Я. Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений /А.Я. Лескова, Л.М. Рыбина. – Новосибирск, 1987. – С. 312.
8. Евлахова А.А. Болезни вредных насекомых. Методы учета, сбора, хранения насекомых, пораженных болезнями /А.А. Евлахова, О.И. Швецова. – М., 1965. – С. 51.
9. Barjac H. de Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* a Kuj to their differentiation /H. De Barjac, A. Bonnefoi //J. Insect. Pathol. – 1963. – Vol. 11. – P. 333.
10. Lysenko O. The taxonomy of entomogenous bacteria /O. Lysenko //Insect. Pathology (Ed. Steinhaue). – New York: Acad. Pres, 1963. – Vol. 2 – P. 638-661.
11. Лескова А.Я. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств (Методические указания) /А.Я. Лескова. – Л., 1984. – 21 с.
12. Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток /С.Д. Перт. – М.: Мир, 1978. – 332 с.
13. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми /Н.В. Кандыбин. – М.: Агропромиздат, 1989. – 176 с.

**ШТАМИ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ
BACILLUS THURINGIENSIS ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА
БІОПРЕПАРАТІВ В УКРАЇНІ**

Кузнєцова Л.М., Крижко А.В., Олексієнко О.П.

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології
УААН, смт. Гвардійське

З комах природних популяцій виділено штами бактерій групи Bacillus thuringiensis, високопатогенні до листогризучих шкідників Coleoptera та Lepidoptera. Вивчена спроможність штамів до продукування термостабільного екзотоксину, проведено оцінку їх технологічності. Виділені штами перспективні для створення мікробного препарату для захисту рослин проти листогризучих шкідників.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, патогенність, токсини, захист рослин.

**THE STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA
BACILLUS THURINGIENSIS FOR BIOPREPARATION
MANUFACTURING IN UKRAINE**

Kusnezova L.N., Krizhko A.V., Alexeenko O.P.

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

The Bacillus thuringiensis strains, highly-pathogenic for the leaf-champing vermins of the Coleopteran's and Lepidopteran's orders, were selected from the insect natural populations. The ability of these strains to produce the temperature-stable exotoxin have been studied. The estimation of their technological properties was done. The perspective strains for making of microbial biopreparation for plants protection from leaf-champing vermins have been selected.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, pathogenicity, toxin, plant protection.