

УДК 632.937

**БИОПРЕПАРАТЫ ФИТОЗАЩИТНОГО НАЗНАЧЕНИЯ
НА ОСНОВЕ ЭНТОМОПАТОГЕНОВ *BACILLUS
THURINGIENSIS***

Патыка Т.И.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
ул. Шевченко, 97, г. Чернигов, 14027, Украина
E-mail: isgm@ukrpost.ua

*Изложены научно-методические подходы совершенствования технологий производства и применения препаратов на основе природных энтомопатогенов *Bacillus thuringiensis* – продуцентов биологически активных веществ и агентов препаратов фитозащитного действия.*

Ключевые слова: *энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis*, селекционный отбор, биотестирование, экзотоксигенность, энтомоцидная активность.*

При разработке систем интегрированной защиты растений, обеспечивающих высокий выход высококачественной и экологически чистой сельскохозяйственной продукции, особое внимание уделяется методам биологического контроля численности насекомых. Одними из эффективных и широко применяемых (около 95 % рынка биопестицидов) средств контроля численности насекомых-вредителей являются биопрепараты на основе грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), обладающей способностью продуцировать биологически активные вещества (экзо -, эндотоксины и другие метаболиты). Это связано с рядом уникальных особенностей *Bt*:

- безопасность для нецелевых объектов и, в первую очередь, для человека и теплокровных животных;
- технологичность в производстве и применении биопрепаратов, созданных на основе этих энтомопатогенов;
- разнообразие свойств серотипов и штаммов *Bt*, что обеспечивает специфичность действия соответствующих биопрепаратов.

Токсикологические исследования, проводимые в течение 40 лет во всем мире, показали безопасность этих микроорганизмов и

их метаболитов, включая инсектицидные белки и другие вещества, что позволяет широко их использовать в практике биоконтроля насекомых-вредителей [1-4]. Мировой ассортимент биопрепаратов фитозащитного назначения большой и разнообразный. На основе спор и метаболитов *Bt* в странах ближнего и дальнего зарубежья выпускаются десятки биопрепаратов, которые эффективны и способны снизить численность и вредоносность насекомых и клещей – опасных массовых вредителей сельскохозяйственных растений и животных (Битоксибациллин, Бактокулицид, Бацикол, Лепидоцид, БИП, Гомелин, Децимид, Колорадо, Турингин, Астур и др.).

Биопрепарат на основе *Bt* считают высококачественным, надежным и оптимальным для технологий применения в области растениеводства, если он соответствует следующим параметрам и требованиям:

1) штамм-продуцент способен в стандартных и производственных питательных средах накапливать достаточно высокий титр спор и кристаллов и в кратчайший срок (в единице массы необходимо содержание максимального количества активных клеток и метаболитов с полезными свойствами; синхронное споро- и кристаллообразование с соотношением спор и кристаллов 1:1);

2) сохранность и неизменность готового биопрепарата (сухого порошка, пасты или жидкой формы) продолжительное время без существенных изменений его свойств;

3) высокая биологическая активность (энтомоцидность) препарата по действующему началу для тест-объектов;

4) персистентность, гомогенность, адгезионная способность биопрепарата;

5) удобство транспортировки и технологических приемов применения;

6) безопасность для обслуживающего персонала, окружающей среды.

У микробиометода фитозащиты имеются огромные резервы и перспективы использования препаратов в программах интегрированного управления численностью вредителей, направленных на восстановление и поддержание биоценотического равновесия в агроэкосистемах. Применение микробных препаратов инсектицидного, фунгицидного и других действий ведет к стабилизации биоценотических связей в агроценозах.

Цель исследований заключалась в изучении биологических особенностей разновидностей энтомопатогенных бактерий *Bt* (*BtH₁* – var. *Thuringiensis*, *BtH₁₀* – var. *Darmstadiensis*) для совершенствования технологических приемов производства биоинсектицидов на основе *Bt* и эффективного их использования в практике растениеводства.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы природного типа: *Bt* 1-го и 10-го серотипов (*BtH₁*, *BtH₁₀*), выделенные из популяций насекомых разных эколого-географических регионов и обладающие фитозащитными энтомоцидными свойствами и перспективными производственными показателями.

Динамику продуктивности культур при культивировании их глубинным методом в качестве показателя технологичности штаммов изучали методом серийных разведений культуральной жидкости (КЖ) с последующим высевом на МПА и подсчетом выросших колоний. Определение степени патогенности *Bt* с учетом избирательного действия, количественное определение показателей летальных концентраций (LK_{50}), уровень токсинообразования определяли методами, принятыми в микробиологии и патологии членистоногих, в соответствии с методическими рекомендациями [5-10]. В качестве биотестов использовали: инсектарную линию комнатной мухи (*Musca domestica*, L₂) – тест по экзотоксиногенности культур *Bt*; личинок природной популяции колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say., L₁₋₂) – тест по энтомоцидной активности энтомопатогенов *Bt*. Суммарную оценку патогенного действия препаратов на популяции насекомых оценивали по первичному летальному эффекту и последствию.

Результаты и их обсуждение. При производстве фитозащитных биопрепаратов *Bt* (равно как и других биопрепаратов) необходимо постоянное наблюдение за активностью штаммов-продуцентов и соответствующая селекция и отбор по производственно ценным свойствам. Практически ценные свойства микроорганизмов, влияющие на технологичность при получении препаратов и эффективность их применения нестабильны. Для стабилизации ценных свойств штамма-продуцента по комплексу свойств (продуктивности, энтомовирулентности и др.) необходимо проведение селекционных процедур, соответствующих конкретным биологическим особенностям того или иного микроорганизма. Многоступенчатой аналитической селекцией (рис. 1)

проведен отбор оптимальных вариантов штаммов-продуцентов в ряде генераций с анализом биологических и хозяйственно ценных свойств диссоциантов в соответствии с селекционными критериями. Проведение такой селекции позволило получить штаммы *Bt* для выполнения последующих этапов исследований.



Рис. 1. Схема селекционного отбора вариантов BtH_1 и BtH_{10} с ценными производственными показателями

На рост и развитие энтомопатогенных бактерий *Bt* существенное влияние оказывают состав и соотношение азотных и углеродных компонентов питательной среды. Поэтому первоначально необходимо осуществлять подбор компонентов углеродного и азотного питания для штамма-продуцента биопрепарата с последующим определением наиболее усвояемых форм этих питательных элементов, оптимальной нормы посевного материала, рН среды и режима аэрации. Подбирая питательные среды необходимого состава, следует учитывать специфику культивируемого штамма. Это важно для создания оптимальных условий, которые бы способствовали наилучшему росту микроорганизма и биосинтезу необходимых продуктов жизнедеятельности. В результате проведенных исследований подобраны питательные среды различного состава, которые могут быть использованы для регионального и промышленного производств биопрепаратов на основе *Bt* (табл. 1 и 2). Следует отметить, что при разработке и подборе питательных сред для технологического производства биопрепаратов на основе BtH_1 и

BtH₁₀, наряду с учетом титра спор и кристаллов, проводили учет накопления в среде термостабильного экзотоксина (биотестирование на тест-объекте *Musca domestica*) и степень энтомоцидности (тест – *Leptinotarsa decemlineata* Say.).

Таблица 1. Характеристика штаммов *BtH₁* и *BtH₁₀* на питательных средах разного состава

Варианты среды	Титр спор, млрд/мл культуральной жидкости	ЛК ₅₀ , мкл/г корма для <i>L₂ Musca domestica</i>
<i>BtH₁</i>		
№ 1 (дрожже-полисахаридная)	2,9-3,58	2,76-3,18
№ 2 (кукурузно-глюкозная)	2,75-3,2	3,44-3,62
<i>BtH₁₀</i>		
№ 1 (дрожже-полисахаридная)	3,0-3,3	2,97
№ 2 (кукурузно-глюкозная)	3,0	2,5

Таблица 2. Качество биопрепаратов на основе *BtH₁* и *BtH₁₀*

Титр спор, млрд/мл КЖ	Соотношение спор и кристаллов	ЛК ₅₀ , мкл/г корма для <i>L₂ Musca domestica</i>	Энтомоцидная активность, ЛК ₅₀ , % для <i>L₂ Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>BtH₁</i>			
3,16	1:1	2,85	0,195
<i>BtH₁₀</i>			
3,2	1:1	2,90	0,21

Так, при стабильных титрах спор и кристаллов (до 3,0 млрд/мл культуральной жидкости) показатели ЛК₅₀ для биотестов не превышали показателей норм, указанных в блок-схеме (см. рис. 1), но и в отдельных вариантах обладали более высокой активностью, т.е. меньшими значениями летальных концентраций, что свидетельствует о высокой активности и функциональности штаммов разных серотипов *BtH₁* и *BtH₁₀*.

Разностороннее действие биоагентов *Bt* складывается из разных параметров, обусловленных взаимоотношением патоген-хозяин. В лабораторных условиях определена энтомоцидная

активность BtH_1 и BtH_{10} контактной генерации колорадского жука. Восприимчивость насекомых по вариантам опыта, с учетом гибели по дням учета, оказалась практически на одном уровне – 0,23 % по показателю ЛК₅₀ (табл. 3).

Таблица 3. Восприимчивость 1-й контактной генерации колорадского жука к BtH_1 и BtH_{10}

Рабочая суспензия, %	Интактная популяция			ЛК ₅₀ , %	Контактная популяция			ЛК ₅₀ , %
	гибель по дням учета				гибель по дням учета			
	3	5	7		3	5	7	
BtH_1								
10,0	60,0	97,5	100	0,20	57,5	90,0	100	0,23
2,0	35,0	87,5	100		32,5	82,5	100	
0,4	27,5	67,5	92,5		27,5	57,5	87,5	
BtH_{10}								
10,0	55,0	92,5	100	0,23	60,0	95,0	100	0,22
2,0	37,5	82,5	100		37,5	85,0	100	
0,4	25,0	62,5	87,5		27,5	55,0	90,0	

Установлена высокая энтомоцидная активность BtH_1 и BtH_{10} в испытанных концентрациях на 7 сутки опыта – 87,5-100 %. С учетом разработанной методики получена контактная генерация и изучено влияние сублетальных доз Bt на плодовитость и вес жуков полученной контактной генерации (табл. 4).

Таблица 4. Плодовитость и вес жуков контактной генерации (обработка 0,5 %-ной суспензией $L_3 - L_4$)

Варианты опыта	Кол-во отложенных яиц отдельными самками					Среднее на 1 самку	Снижение плодовитости, % к контролю	Вес имаго					Средний	Снижение веса, % к контролю
	1	2	3	4	5			1	2	3	4	5		
BtH_1	8	0	12	0	10	6	82,9	0,22	0,23	0,23	0,22	0,22	0,22	44,0
BtH_{10}	6	10	6	3	11	7,2	79,5	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	43,5
Контроль	48	32	29	32	34	35	—	0,42	0,34	0,42	0,44	0,38	0,4	—

Важными показателями являются количество отложенных яиц отдельными самками, снижение плодовитости и процент снижения веса. Показатели плодовитости насекомых в опыте снизились до 80,0-83,0 %, веса имаго – до 44,0 %. Следует учитывать, что суммарный эффект *Bt*, как продуцентов фито-защитных препаратов, несравненно выше первичного – летального, так как его действие многостороннее на насекомых (антифи-дантное, метатоксическое, складывающееся из физиологического, таратогенного и дерепродукционного). Биотехнологические аспекты производства препаратов на основе энтомопатогенных бактерий *Bt* разнообразны и разрабатываются с учетом физиологических, биохимических и других особенностей микробов-продуцентов и, соответственно, целевых назначений. Имеется ряд основных требований, а именно: селективность (избирательность), высокая эффективность действия, безопасность для человека, полезной флоры и фауны, удобство в производстве и применении, стабильность ценных свойств препарата при хранении и применении.

Таким образом, комплексные исследования уникального биологического потенциала природных энтомопатогенов *Bt*, как продуцентов биологически активных веществ и агентов биопрепаратов с комплексом полезных для агрофитоценозов свойств, являются значимыми разработками научно-практических основ и методов регулирования численностью популяций насекомых-вредителей для стабильности и саморегуляции агро-экосистем. Исследования биологического разнообразия и фито-защитных свойств *Bt* позволят расширить и углубить знания в области технологии использования *Bt* в фитозащите от насекомых, применительно к различным биоценотическим условиям и на этой основе разработать соответствующие рекомендации.

1. Мікроорганізми і альтернативне землеробство /[Патика В.П., Тихонович І.А., Філіп'єв І.Д. та ін.]; за ред. В.П. Патики. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

2. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве /[Тихонович И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К. и др.]. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.

3. Baum J.A. *Bacillus thuringiensis* naturaland recombinant bioinsecticide products /Baum J.A., Carlton B.C. //Method in Biotechnology.

– 1999. – Vol. 5. – P. 189-209.

4. Hofte H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* /H. Hofte, H.R. Whitely //Microbiol. Rev. – 1989. – Vol. 53. – P. 242-255.

5. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей. – М., 1984. – 27 с.

6. Лескова А.Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств /А.Я. Лескова. – Л., 1984. – С. 17-19.

7. Рекомендации к практикуму по бактериозам насекомых. – Саранск, 1985. – 118 с.

8. Лабинская С.А. Микробиология с техникой микробиологических исследований /С.А. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 269 с.

9. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования /М.О. Биргер. – М.: Медицина, 1982. – 463 с.

10. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика /Н.В. Кандыбин. – М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.

БІОПРЕПАРАТИ ФІТОЗАХИСТНОЇ ДІЇ НА ОСНОВІ ЕНТОМОПАТОГЕНІВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Патика Т.І.

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, м. Чернігів

*Викладено науково-методичні підходи щодо вдосконалення технології створення та застосування препаратів на основі природних ентомопатогенів *Bacillus thuringiensis* – продуцентів біологічно активних речовин і агентів препаратів фітозахистної дії.*

Ключові слова: *ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis*, селекційний відбір, біотестування, екзотоксиногенність, ентомоцидна активність.*

**BIOLOGICAL PRODUCTS OF PHYTOPROTECTIVE
ACTION CREATED ON THE BASIS OF
ENTOMOPATHOGENIC *BACILLUS THURINGIENSIS***

Patyka T.I.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

*The paper provides overview of the scientifically-methodical approaches directed on the improvement of «know-how» and application of preparations created on the basis of natural entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* – producers of biologically active substances and agents of preparations of phytoprotective action.*

*Key words: entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*, selection, biotesting, exotoxingenic, entomocycle activity.*