УДК 579.64:632.76

©ЕНДОУТВОРЮЮЧІ БАКТЕРІЇ *BACILLUS THURINGIENSIS VAR. THURINGIENSIS* ЯК ОСНОВА МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДІЇ

М. В. БОЙКО, аспірант кафедри екобіотехнології та біорізноманіття
М. В. ПАТИКА, доктор сільськогосподарських наук, професор,
член-кореспондент НААН, завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: maryaulina@gmail.com

Анотація. *Висвітлено аспекти застосування мікробних препаратів на основі Bacillus thuringiensis для захисту рослин від шкодочинних організмів. Ефективність дії штаму Bacillus thuringiensis 87/3 доведено в лабораторних і польових умовах з використанням біотесту Leptinotarsa decemlineata Say. (личинки молодшого віку, L_{1-2}), а також фітопатогенних мікроміцетів роду Venturia ssp. Установлено високу технологічність штаму B. thuringiensis №87/3 має титр метаболітного спорокристалічного комплексу від 3,6 до 4,8 млрд. в 1мл культуральної рідини), ентомоцидність (99,4%) і антифунгальну дію, яка виявляється у зменшенні кількості уражених збудником парші рослин яблуні в 1,5-2 рази порівняно із контрольним варіантом. Широкий спектр дії ендоутворюючих бактерій Bt демонструє перспективність їх використання для фітозахисту.*

Ключові слова: B. thuringiensis var. thuringiensis, біоконтроль, фітозахисна дія, ентомоцидна активність.

Актуальність. При розробленні систем інтегрованого захисту рослин, що забезпечують високий вихід екологічно чистої сільськогосподарської продукції, особлива увага приділяється методам біологічного контролю чисельності комах. *Bacillus thuringiensis (Bt)* успішно використовується як біопестицид понад 60 років.

Біопрепарати на основі цієї бактерії характеризуються високою вибірковістю інсектицидної дії та екологічною безпечністю. *B. thuringiensis* під час споруляції продукує параспоральний кристалічний білок δ-ендотоксин, що специфічно зв'язується з аффінним до нього білком, який міститься на поверхні апікальних мембран епітеліальних клітин кишківника комах. Ця властивість і зумовила широке використання *B. thuringiensis* як основи ентомопатогенних препаратів для альтернативи синтетичним хімічним інсектицидам [1]. Дослідження біологічного різноманіття та фітозахисних властивостей природніх штамів *Bt* розширять і поглиблять знання щодо технології використання цих бактерій як агентів біопрепаратів широкого спектра дії.

© М. В. БОЙКО, М. В. ПАТИКА, 2017

Аналіз останніх досліджень та публікацій. На сьогодні накопичено певний досвід ефективного використання ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis (Bt)* з потенціалом ентомоцидної й антагоністичної активності відносно широкого кола комах-шкідників та фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу метаболітів різної природи. Численні скринінгові дослідження з виділення активних ентомопатогенних штамів *Bacillus thuringiensis* різних природних джерел показали їхнє високе біологічне різноманіття, диференціацію за інсектицидною активністю та токсигенністю продукованих білків, метаболітів [2]. Т. Г. Юдіна припустила, що спільність ентомоцидної й антимікробної дії полягає в утворенні іонних каналів у мембранах епітеліальних клітин комах і цитоплазматичних мембранах мікробних клітин [3]. У роботах Л. К. Каменек зі співавторами продемонстровано вплив дельта-ендотоксинів *B. thuringiensis* на фітопатогенні бактерії та гриби [4]. Нещодавно вперше показано, що інсектицидний штам *B. thuringiensis C25* ефективно контролює збудника хвороби шовковиці *Ciboria shiraiana* [5]. Низку робіт присвячено рістостимулюючій активності, яку виявляють *B. thuringiensis*, переважно при обробці рослин дельта-ендотоксином [4, 6]. Подальші дослідження поліфункціональних властивостей нових штамів *Bt* є актуальними для розширення можливостей ефективного використання біоагентів у практиці рослинництва.

Мета дослідження – оцінити нові штами бактерій *B. thuringiensis* як потенційної основи біопрепаратів широкого спектра дії.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводились на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри екобіотехнології та біорізноманіття; Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України, м. Чернігів; Інституту садівництва НААН України, лабораторії фізіології рослин і мікробіології.

У роботі використано новий відселектований *in vitro* штам ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis var. thuringiensis* (*Bt* H_1) №87/$_3$, виділений із личинок природних популяцій листогризучих комах *Leptinotarsa decemlineata* Say. старшого віку (L_4) у природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся. Після аналітичної селекції цей штам зберігається в робочій колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП.

Отримання чистих культур, визначення морфолого-культуральних властивостей, приготування послідовних розведень мікробних суспензій, культивування на рідких та агаризованих поживних середовищах проводили згідно із загальноприйнятими в мікробіології та біотехнології методами [7, 8].

Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м’ясо-пептонний бульйон (МПБ), середовище Лурія – Бертані (LB), а також оптимізоване середовище на основі капустяного гідролізату, які створюють відповідні вибіркові умови для розвитку специфічно адаптованих культур *Bt.*

Культивування проводили в колбах Ерленмейєра на біотехнологічній качалці з термоплатформою (220об./хв, температура +30˚С) упродовж 48-72год. Об’єм середовища 50мл, кількість інокулюму – не менше ніж 4,0% від об’єму середовища. Титр колонієутворювальних одиниць – не менше ніж

3,6млрд/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 фуксином Циля [8], а також за диференційованою методикою забарвлення В. Смирнова [7]. 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) [1].

У лабораторно-польових дослідах ефективність штаму *Bt* H_1 №87/3 визначали на біотесті *Leptinotarsa decemlineata* Say. L_{1-2}. Польові досліди проводили за такою схемою: контроль – без обробки; контроль – хімічний інсектицид, варіант – оброблення рослин культуральною рідиною *B. thuringiensis* $87/_3$ (розведення 1:1). Досліди закладались на картопляних полях дослідного господарства Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України. Загальна площа дослідної ділянки 0,06га. У досліді використано картоплю сорту Ред Леді. Обробку виконували ручним помповим оприскувачем Marolex profession 12, витрата робочої рідини 300л/га. Облік чисельності різних фаз шкідника проводили на модельних площадках по 30 кущів у кожній у чотириразових повторах. Ефективність препаратів враховували за кількістю загиблих личинок на 3-ю, 5-у, 7-у і 10-у добу досліду.

Кількість загиблих особин у досліді обчислювали за формулою Аббота [9]:

$$A = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \times 100 \quad ,$$ де

А – ентомоцидна активність, (%);

M_0 – відсоток загиблих особин у досліді;

$M_к$ – відсоток загиблих особин у контролі. Загибель у контролі не повинна перевищувати 15,0%.

Антагоністичну дію бактеріальних штамів *Bt* щодо фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia ssp.* визначали в польових дослідженнях на базі Інституту садівництва НААН України позакореневою обробкою дерев яблуні. Сад закладений у 2001 році на підщепі 54-118. Схема посадки дерев 5^x 3, система утримання ґрунту в міжряддях – природнє задерніння. Для досліду брали сорти різних груп достигання, а саме: літній сорт Дельбарестіваль, осінній – Слава Переможцям та зимовий – Вільмута. Польові досліди проводили за такою схемою: контроль – обприскування дерев водою; варіанти – оброблення рослин *Bacillus thuringiensis №87/3; B. subtilis; B. pumilis.* Для обробки дерев застосовували культуральну рідину досліджуваних бактерій з розрахунку 20л/га. Витрата робочої рідини 1000л/га.

Статистичне оброблення експериментальних даних проводили за допомогою пакета програм MS Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. У лабораторно-польових умовах досліджено ефективність застосування штаму *Bacillus thuringiensis 87/3* щодо личинок колорадського жука молодшого віку (табл. 1).

1. Ефективність штамів *Bacillus thuringiensis* на личинок колорадського жука L_{1-2} (модельний дрібноділянковий дослід, 2017 рік)

Варіанти досліду	Загибель личинок за добою обліку, %			
	3	5	7	10
Контроль (без обробки)	0	0	0	1,1±0,02
Хімічний інсектицид	37,4±0,02	70,4±0,11	84,2±0,04	89,9±0,08
B. thuringiensis 87/3	34,3±0,02	69,3±0,09	95,6±0,7	99,4±0,6

Робочу суспензію готували безпосередньо перед обробленням. У перші дні після обробки процес зниження чисельності личинок шкідника відбувався повільно, але при цьому рослини не пошкоджувались, що зумовлено антифідантним ефектом. У наступні дні досліду відбувалося порушення метаморфозу і загибель особин наступної фази розвитку. Результати польових досліджень свідчать про високу біологічну ефективність дії штаму *Bt 87/3* щодо личинок колорадського жука – 99,4%.

За результатами попередніх модельних досліджень встановлено, що досліджувані біоагенти-продуценти *Bt* мають високу антагоністичну активність щодо фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia ssp*. [10]. Лабораторні досліди показали, що під впливом споро-кристалічного комплексу штаму *B. thuringiensis 87/3* відбуваються значні зміни морфогенезу тест-культури в усіх варіантах, а саме: з'являються характерні зони лізису, міняються щільність, товщина та напрямок росту міцелію, а також ступінь інгібування проростання конідій у межах 86,0-93,0%. У контролі (без внесення бактеріальних метаболітів культури *B. thuringiensis*) середній діаметр мікроміцету на 10-у добу становив 2,1см порівняно з дослідними варіантами, у яких зафіксовано ріст міцелію не більше ніж 0,4-0,7см [10].

За результатами польових досліджень установлено, що позакоренева обробка дерев яблуні різних термінів достигання розчином із використанням бактерій *Bacillus thuringiensis* сприяла зменшенню кількості уражених паршею листків яблуні в 1,5-2 рази порівняно із контрольним варіантом. В оброблених варіантах відсоток ураження був менше ніж 40%, тоді як у контролі – від 55% (рослини сорту Слава Переможцям) до 70% (сорт Вільмута). Аналогічну закономірність спостерігали і при позакореневому використанні *Bacillus pumilis*, за винятком сорту Дельбарестіваль – відсоток ураження листків був на рівні контролю. Зазначено, що позакореневе використання робочого розчину, приготованого з культурою бактерій *Bacillus subtilis* не мало впливу на зміну кількості уражених паршею листків яблуні досліджуваних сортів.

Отже, встановлено, що оброблення рослин яблуні суспензією на основі *Bacillus thuringiensis 87/3*, значно зменшувала кількість уражених паршею листків порівняно з контролем.

Висновки і перспективи. Проведені дослідження дали змогу оцінити ефективність дії штаму *B. thuringiensis №87/3* щодо личинок колорадського жука, а також фітопатогенів *Venturia ssp,* що розширює можливості його використання. Показано, що культура штаму *B. thuringiensis №87/3* має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу становить від 3,6 до 4,8млрд/мл культуральної рідини), ентомоцидності (99,4%) та антифунгальної дії, яка виявляється у зменшенні кількості уражених паршею листків яблуні в 1,5-2 рази порівняно з контрольним варіантом.

Таким чином, поліфункціональність штаму *Bt 87/3* демонструє перспективи ефективного його використання для фітозахисту.

Список використаних джерел

1. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis.* /Н.В Кандыбин, Т.И.Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка Монография. – СПб, Пушкин: Научное издание «Инновационный центр защиты растений», 2009. – 252 с.

2. Bravo A.**,** Gomez I., Porta H. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity // Microbial Biotechnol. 2013. Vol. 6. P. 17-26.

3. Юдина Т.Г. Антимикробная активность и экологическая роль белковых включений бактерий – представителей родов *Bacillus, Xenorhabdus, Photorhabdus*: дис…д-ра биол. наук в форме научного доклада. М., 2006. 81 с.

4. Каменек Л.К., Каменек Д.В., Тюльпинева А. А., Терпиловский М.А. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* в отношении фитопатогенных грибов родов *Phytophthora* и *Fusarium* // Биотехнология. 2008. №5. С. 76-83.

5. Sultana R., Kim K. *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraiana* in mulberry (*Moris australis* L.) // Biocontr. Sci. Technol. 2016. Vol. 26(2). P. 145-162.

6. Коробов Я.А., Каменек Д.В., Каменек Л.К. Ростостимулирующий эффект дельта-эндотоксина в отношении ювенильных растений перца стручкового // Вестник Алтайского ГАУ. 2014. №11(121). С.14-19.

7. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных /под ред. В. В. Смирнова. – К., 1983. – 50 с.

8. Smirnoff W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of Bacillus thuringiensis /W. A. Smirnoff //Insect. Pathol. – 1962. – P. 384-386.

9. Abbot W. A method of computing the effectiveness of an insecticide /W. Abbot // J. Econ. Entomol. –1925. –18.– P. 265-267.

10. Біотехнологічна поліфункціональність метаболітного споро-кристалічного комплексу та особливості культивування *Bacillus thuringiensis*/ Т.І. Патика, М.В. Бойко, М.В. Патика // Мікробіол. журнал. -2017. - Т. 79, №2.- С. 77-84.

References

1. Kandyibin NV. Microbiological control of insect´s quantity and its dominant Bacillus thuringiensis. Moscow SPb Pushkin: Innovatsionnyiy tsentr zaschityi rasteniy, 2009. 252 p.

2. Bravo A**,** Gomez I, Porta H et al. Evolution of Bacillus thuringiensis Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnol. 2013; (6):17-26.

3. Yudina TG. Antimikrobnaya aktivnost i ekologicheskaya rol belkovyih vklyucheniy bakteriy – predstaviteley rodov Bacillus, Xenorhabdus, Photorhabdus: dis…d-ra biol. nauk v forme nauchnogo doklada. Moscow, 2006. 81 p.

4. Kamenek, L.K., Tyulpineva, A.A., Terpilovskiy, M.A. (2008). Deystvie delta-endotoksina Bacillus thuringiensis v otnoshenii fitopatogennyih gribov rodov Phytophthora i Fusarium. Biotechnologiya, (5), 76-83.

5. Sultana R, Kim K. Bacillus thuringiensis C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraiana* in mulberry (*Moris australis* L.). Biocontr. Sci. Technol. 2016. 26(2):145-162.

6. Korobov Ya.A, Kamenek L.K. (2014). Rostostimuliruyuschiy effekt delta-endotoksina v otnoshenii yuvenilnyih rasteniy pertsa struchkovogo. Vestnik Altayskogo GAU. 121(11):14-19.

7. Smirnov VV. Metodicheskie rekomendatsii po vyideleniyu i identifikatsii bakteriy roda Bacillus iz organizma cheloveka I zhivotnyih.1983:50 p.

8. Smirnoff VA. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of Bacillus thuringiensis. Insect. Pathol.1962:384–386.

9. Abbot W, A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 1925;18: 265-267.

10. Patyka T.I, Boiko M.V, Patyka M.V. (2017). Biotekhnolohichna polifunktsionalnist metabolitnoho sporo-krystalichnoho kompleksu ta osoblyvosti kultyvuvannia Bacillus thuringiensis. Mikrobiol. zhurnal.79(2):77-84.

ЭНДООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ *BACILLUS THURINGIENSIS VAR. THURINGIENSIS* КАК ОСНОВА МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

М. В. Бойко, М. В. Патыка

Аннотация. *Освещены аспекты применения микробных препаратов на основе Bacillus thuringiensis для защиты растений от вредоносных организмов. Эффективность действия штамма Bacillus thuringiensis 87/3 доказана в лабораторных и полевых условиях с использованием биотеста Leptinotarsa decemlineata Say. (личинки младшего возраста, L_{1-2}), а также фитопатогенных микромицетов рода Venturia ssp. Установлена высокая технологичность штамма B. thuringiensis №87/3 имеет титр метаболитного споро-кристалического комплекса от 3,6 до 4,8 млрд в 1мл культуральной жидкости), энтомоцидность (99,4%) и антифунгальное действие, которое проявляется в уменьшении количества пораженных возбудителем парши растений яблони в 1,5-2 раза по сравнению с контрольным вариантом. Широкий спектр действия эндообразующих бактерий Bt демонстрирует перспективность их использования для фитозащиты.*

Ключевые слова: B. thuringiensis var. thuringiensis, биоконтроль, фитозащитное действие, энтомоцидная активность.

ENDO-FORMING BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS VAR. THURINGIENSIS* AS A BASIS OF MICROBIAL PREPARATIONS OF A WIDE SPECTRUM OF ACTION

M. Boiko, M. Patyka

Abstract. *The aspects of using microbial preparations based on Bacillus thuringiensis for the plants protection against harmful organisms was discussed. The*

efficacy of the Bacillus thuringiensis 87/3 strain was demonstrated in laboratory and field conditions using Leptinotarsa decemlineata Say.(larvae of younger age, L_{1-2}), as well as phytopathogenic micromycetes Venturia ssp. It has been established the high adaptability of t B. thuringiensis 87/3 strain (the titre of the metabolic spore-crystalline complex is from 3.6 to 4.8 billion/ml.), entomocidal (99.4%) and antifungal effect, which is shown in reduction of the diseased plants number by the apple scab causative in 1,5-2 times, in comparison with the control variant. A wide range action of endo-forming bacteria Bt demonstrates the prospects of their use for phytoprotection.

Keywords: B. thuringiensis var. thuringiensis, biocontrol, phytoprotective action, entomocidal activity.