

**УДК 579.64:632.937.3**

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ АКТИВНЫХ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER ИЗ НАСЕКОМЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КРЫМА**

*Кузнецова Л.Н.*

*Институт сельского хозяйства Крыма НААН, пгт. Гвардейское, Украина  
E-mail: solanum@ukr.net*

Из насекомых крымских популяций выделен ряд штаммов *B. thuringiensis*, среди которых наибольшую энтомоцидную активность проявил штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, изолированный из гусениц американской белой бабочки. При обработке листьев картофеля бактериальной культурой в течение 5 суток наступает 100% гибель личинок колорадского жука. Штамм является технологичным и может быть основой для биопрепаратов, используемых для защиты сельскохозяйственных растений от листогрызущих вредителей.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, штамм, энтомопатоген, эффективность.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Стремление к сохранению биосферы от загрязнения обуславливает интерес к поиску нехимических средств защиты растений от вредных насекомых. Большинство биопрепаратов, выпускаемых сегодня в мире, изготавливаются на основе энтомопатогенных штаммов *B. thuringiensis*. Вирулентность этого возбудителя — одно из решающих условий эффективности, а значит и перспективности использования данных бактерий в защите растений [1]. *B. thuringiensis* является естественным обитателем биоценозов. Однако большая численность насекомых, их естественная устойчивость к инфекции, сложные биоценоотические связи, влияние абиотических факторов способствуют образованию новых активных форм микроорганизмов [2]. Поэтому поиск высокоактивных и технологичных для производства биопрепаратов штаммов *B. thuringiensis* всегда является актуальным.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследования проводили в отделе микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН. Энтомопатогенные бактерии выделяли из насекомых, собранных в природных популяциях по методике Л.И. Бурцевой [3]. Способность выделенных бактерий к образованию спор и белковых кристаллов эндотоксина определяли микроскопированием [4].

Идентификацию выделенных штаммов проводили согласно схемы идентификации А. Varjas, А. Bonnefoi и А. Lysenko [5, 6]. В качестве эталонных

были взяты штаммы следующих серотипов: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 994, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293, *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* 942, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* 109-С и *B. thuringiensis* var. *darmstadiens* 820.

Энтомоцидное действие новых штаммов изучали в лабораторных условиях по методике А.Я. Лесковой [4]. Биотест – личинки колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, *Coleoptera*) младшего возраста. Опыты проводили в 3-х повторностях в стеклянных сосудах, куда помещали насекомых и, обработанные жидкими культурами штаммов, листья картофеля. Обработанным кормом личинки питались 3 суток, после чего корм меняли на необработанный. В качестве эталона использовали жидкую споровую культуру производственного штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 994.

Жидкие споровые культуры получали при культивировании бактерий в питательной среде на технологических качалках (220 об. / мин.) в течение 48 часов при температуре 28-30<sup>0</sup> С [7].

Технологичность штаммов определяли по методике С.Д. Перта [8].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований в природных популяциях Крыма собрано 68 погибших и больных насекомых - представителей отрядов *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*. Микробиологическим анализом собранного материала выделено 28 штаммов микроорганизмов, 4 из которых по первоначальным признакам споро- и кристаллообразования отнесены к бактериям группы *B. thuringiensis* (табл.1).

Таблица 1

#### Характеристика штаммов *B. thuringiensis*, выделенных из насекомых природных популяций Крыма

Штамм	Стация сбора	Объект сбора	Состояние насекомого
0363	приусадебный участок, капуста	капустная совка ( <i>Mamestra brassicae</i> L.)	труп имаго
0371	лесополоса, клен	американская белая бабочка ( <i>Hypphantria cunea</i> Drury)	трупы гусениц младших возрастов
0379	поле, картофель	колорадский жук ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say)	трупы и инфицированные гусеницы старших возрастов
0411	лесополоса, абрикос	кольчатый шелкопряд ( <i>Malacosoma neustria</i> L.)	трупы личинок старших возрастов

Для идентификации новых выделенных штаммов изучали их морфологические и физиолого-биохимические свойства, а также способность к продуцированию термостабильного экзотоксина.

Морфологию колоний и клеток наблюдали при выращивании бактерий на мясопептонном агаре (МПА). Культуры определены как быстрорастущие. Колонии на поверхности среды появлялись на вторые-третьи сутки, имели круглую или неправильную форму с зубчатой границей, вязкие по консистенции, диаметром в среднем 5-12 мм. Рельеф колоний плоский, поверхность матовая, серовато-кофейного цвета с более светлой ареолой.

Бактериальные клетки – грамположительные палочки размером 0,3-1,2 мкм, подвижные, благодаря наличию жгутиков (перитрихи). На стадии вегетативного роста образуют цепочки (от 6 - 8 до 10 - 12 клеток в цепочке в зависимости от штамма). Споры и кристаллы в клетках расположены субтерминально.

На твердых и жидких средах штаммы выделенных *B. thuringiensis* растут в пределах 20-45 °С, температурный оптимум 26-30 °С. Рост бактерий наблюдали в диапазоне рН 6,0-8,6, а оптимальной является реакция среды 6,9-7,2.

При культивировании исследуемых штаммов на диагностических средах показано, что в процессе роста бактерии способны образовывать ацетил-метил-карбинол (АМК) на средах, с пептоном и глюкозой и лецитиназу, на средах, содержащих лецитин (табл. 2).

Таблица 2

**Физиолого-биохимические свойства штаммов *Bacillus thuringiensis*, выделенных из насекомых природных популяций Крыма**

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	Образование					Гидролиз		Усвоение			
	АМК	Лецитиназы	Уреазы	Вуали	Пигмента	Крахмала	Желатины	Сахарозы	Маннозы	Глюкозы	Лактозы
994 (var. <i>thuringiensis</i> )	+	+	-	+++	-	++	++	+	+	+	-
0293 (var. <i>kurstaki</i> )	+	+	++	-	-	++	++	-	-	+	-
942 (var. <i>dendrolimus</i> )	+	+	-	-	-	+	+++	-	-	+	-
109-С (var. <i>morrisoni</i> )	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
820 (var. <i>darmstadiens</i> )	+	-	-	-	-	++	+++	-	-	+	-
0363	+	+	-	+++	-	++	+++	+	+	+	-
0371	+	+	-	++	-	++	+++	+	+	+	-
0379	+	+	-	+++	-	+	++	+	+	+	-
0411	+	+	-	+++	-	++	+	+	+	+	-

Примечание. Условные обозначения: Образование АМК, лецитиназы; образование уреазы, вуали, пигмента; усвоение сахаров: + реакция положительная, - реакция отрицательная. Гидролиз крахмала: - гидролиз отсутствует, + зона гидролиза 2-3 мм, ++ зона гидролиза 5-6 мм. Протеолиз желатина: + растворения 1/3 колонки, ++ растворения 2/3 столбика и +++ полное растворение, - реакция отрицательная.

Бактерии проявляют способность к гидролитическому расщеплению крахмала. Зона гидролиза составляет от 2,2 до 3,8 мм. В качестве источника углерода усваивают сахарозу, глюкозу и маннозу, обладают протеолитической активностью, которая проявляется в разрезании желатины. Бактерии не образуют уреазы и пигментов. На мясопептонном бульоне образуют вуаль.

Биотест *Musca domestica* L. выявил способность новых штаммов к продуцированию экзотоксина.

По исследованным морфологическим и физиолого-биохимическим характеристикам выделенные штаммы 0361, 0371, 0379 и 0411, согласно схемы идентификации А. Barjas, А. Bonnefoi и А. Lysenko, отнесены к бактериям группы *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Биотестирование идентифицированных штаммов *B. thuringiensis* на личинках колорадского жука показало, что наиболее высокими энтомопатогенными свойствами характеризуются штаммы 0371 и 0411. Гибель насекомых в опытах с кормом, обработанным жидкими споровыми культурами таких штаммов, превышала гибель насекомых в опытах с кормом, обработанным культурой эталонного штамма 994, как по количеству погибших насекомых, так и по времени (табл. 3).

Таблица 3

**Энтомоцидная активность штаммов *B. thuringiensis*, выделенных из природных популяций Крыма, против личинок колорадского жука (L<sub>1-2</sub>)**

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	Гибель личинок на сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	1,7±0,01	6,7±0,2	8,3±1,6	8,3±1,6
994 (эталон)	5,0±0,2	81,7±1,6	91,7±4,4	98,3±1,6
0363	41,7±1,4	70,0±1,6	95,0±3,2	95,0±3,2
0371	31,7±0,6	100		
0379	8,0±0,3	48,0±0,7	65,3±0,3	76,0±0,1
0411	44,0±0,2	96,7±3,2	100	

Под влиянием штамма 0371 полную гибель личинок наблюдали на 5-тые суток, под влиянием штамма 0411 – на 7-е сутки. В варианте же с эталонным штаммом 994 за аналогичный период погибало соответственно 81,7% и 91,7% насекомых, причем, 100%-ная гибель личинок под действием штамма 994 не была отмечена и на 10-е сутки опыта.

Как менее активные энтомопатогены определены штаммы 0363 и 0379, под действием которых процент погибших насекомых не превышал соответственно 95,0% и 76,0% на 10-е сутки.

Выделенный новый штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, обладающий высоким энтомопатогенным действием против личинок колорадского жука, был исследован на технологичность. Культивирование бактерий проводили в дрожжеполисахаридной питательной среде в качалочных колбах с объёмом среды 50 мл.

Показано, что для бактерий на стадии вегетативных клеток характерна динамика роста и развития, которая состоит из 4-х классических фаз: Lag-фазы, фазы ускорения роста, экспоненциальной и стационарной фаз. Lag-фаза проходила в течение 0,5-1,5 часов, а последующие фазы развития вегетативных клеток - до 10-14 часов. Титр жидких культур за этот период достигал 0,5-0,8 млрд. колониеобразующих единиц в 1 мл. Через 12-16 часов культивирования в вегетативных клетках отмечали начало активного формирования белковых кристаллов и спорогенных зон. Массовую споруляцию наблюдали через 20-24 часа. Весь период культивирования составлял 45-48 часов и заканчивался полным освобождением спор из спорангиев (табл. 4).

**Таблица 4**

**Технологические показатели развития бактерий штамма *B. thuringiensis* 0371 при культивировании в дрожжеполисахаридной среде**

Этап развития бактерий	Период наблюдения (часов)
Начало образования спорогенных зон	14-16
Массовая споруляция	20-24
10% свободных спор	28-30
Споры и кристаллы в свободном состоянии	45-48

Технологические показатели развития бактерий, представленные в таблице 4, характеризуют штамм 0371 как технологичный [9].

**ВЫВОД**

Таким образом, полученные в ходе исследований данные свидетельствуют, что штамм *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, выделенный из гусениц американской белой бабочки крымской популяции, обладает высоким энтомопатогенным действием против личинок колорадского жука, является технологичным, и, следовательно, может быть основой для разработки нового биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений от листогрызущих вредителей.

**Список литературы**

1. Лескова А.Я. Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений / А.Я. Лескова, Л.М. Рыбина – Новосибирск, 1987. – С.31–42.
2. Kalmakoff J. Ecological approaches to the use of microbial pathogens in Vect. control. / J. Kalmakoff, J. Miles // Bio. Vsehesce – 1980. – V.30. – №5.– p.334–347.
3. Бурцева Л. И. Методы выделения и биотестирования энтомопатогенных бактерий. // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. [под ред. В.В. Глупова. ] / Л. И. Бурцева М. : Круглый год, 2001. – 736 с.

4. Лескова А.Я. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств (Методические указания) / Лескова А. Я. – Л. : – 1984. – С. 17–19.
5. Lysenko O. The taxonomy of entomogenous bacteria / O. Lysenko – Insect. Pathology. – New York, acad. Pres.– 1963. – V. 2. ( Ed. Steinhaus ) – P. 638–661.
6. Barjac de H. Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* a Kuj to their differentiation / H. de Barjac, A. Bonnefoi // J. Insect. Pathol. – 1963. – №. 11. – P. 333.
7. Евлахова А.А. Болезни вредных насекомых. Методы учета, сбора, хранения насекомых, пораженных болезнями. // Евлахова А.А., Швецова О.И. – М., 1965. – С. 51.
8. Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток/ Перт С.Д. – М: Мир, 1978. – 332 с.
9. Яворська Г.В. Промислова Мікробіологія / Яворська Г.В., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. – Львів, 2008. – 256 с.

**Кузнецова Л.М. Виділення та біотестування активних штамів ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* Berliner з комах природних популяцій Криму/ Л.М. Кузнецова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 3. – С. 89-94.**

З комах кримських популяцій виділено ряд штамів *B. thuringiensis*, серед яких найбільшу ентомоцидну активність виявив штам *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, ізольований з гусениць американського білого метелика. За обробки листя картоплі бактеріальною культурою протягом 5 діб настає 100% загибель личинок колорадського жука. Штам є технологічним і може бути основою для біопрепаратів, що використовуються для захисту сільськогосподарських рослин від листогризух шкідників.

**Ключові слова:** *Bacillus thuringiensis*, штам, ентомопатоген, ефективність.

**Kusnezova L.N. The influence of *Bacillus thuringiensis* on the quantity of the phylloplana epiphytic microflora and its fungustatic action against the activators of illnesses in the potato agroecosis / L.N. Kusnezova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 3. – P. 89-94.**

The several strains of *B. thuringiensis* were selected from the Crimean insect populations. The strain *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 0371, isolated from *Hyphantria cunea* Drury caterpillars showed the most insecticidal activity. While processing the potato leaves with bacterial culture we observed the 100% mortality of potato beetle larvae for 5 days. The strain is a technological one and it can be the base for biopreparation for plant protection against leaf-cutting predators.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, strain, entomopathogens, efficiency.

Поступила в редакцію 19.09.2012 г.