

УДК 579.64:632.76

ЕНТОМОПАТОГЕНИ *BACILLUS THURINGIENSIS* ЯК ОСНОВА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ШИРОКОГО СПЕКТРУ ДІЇ

М. В. Бойко, М. В. Патика, Т. І. Патика

e-mail: maryaulina@gmail.com

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв оборони, 13, м. Київ, 03041, Україна

Висвітлено аспекти застосування біотехнологічних препаратів на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) для захисту рослин від шкочодочинних організмів. Метою дослідження було оцінити новий штам бактерій *B. thuringiensis* 87/3 в якості потенційної основи біопрепаратів широкого спектру дії.

Ефективність дії штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 доведена в лабораторних і польових умовах з використанням біоместу *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₁₋₂), а також фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia* ssp. Результати дослідження біологічної ефективності штаму Bt 87/3 на личинок колорадського жука L₁₋₂ показали, що в перші дні після обробки процес зниження чисельності личинок шкідника відбувався повільно, але при цьому рослини не пошкоджувались, що обумовлено антифідантним ефектом. Виразний максимум загибелі личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₁₋₂) зафіксовано на десяту добу при інфекційному навантаженні 1:1. Результати досліджень свідчать про високу біологічну ефективність дії препаративної форми Bt 87/3 щодо личинок колорадського жука – 98,4%. Показано, що штам *B. thuringiensis* 87/3 має високу технологічність (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу від 3,6 до 4,8 млрд. в 1 мл культуральної рідини), ентомоцидність (98,4%) та антифунгальну дію, яка проявляється у зменшенні кількості уражених рослин яблуні збудником парші в 1,5–2 рази, порівняно із контрольним варіантом. Встановлено, що обробка рослин яблуні суспензією на основі Bt 87/3, значно зменшувала кількість уражених листків паршею, порівняно із контролем, а саме, у оброблених варіантах відсоток ураження був менше 40 %, тоді як контроль від 55 % (рослини сорту Слава Переможця) до 70 % (сорт Вільмута). Широкий спектр дії ендоевтруюючих бактерій Bt демонструє перспективність їхнього використання для фітозахисту.

Ключові слова: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, біоконтроль, споро-кристалічний комплекс, антифунгальна дія, ентомоцидна активність.

Постановка проблеми

Розробка біотехнологій захисту сільськогосподарських культур з пошуком альтернативних шляхів зниження ризику виникнення та поширення патогенів різної етіології, контролю фітофагів та отримання продукції рослинництва високої якості наразі є пріоритетним і прогресивним напрямком. Особлива увага приділяється методам біоконтролю чисельності комах, що забезпечують високий вихід екологічно чистої сільськогосподарської продукції.

В результаті інтенсивних досліджень останніх років, розробляються та впроваджуються препаративні форми біотехнологічних препаратів для захисту рослин на основі живих спор, антагоністів та їх метаболітів, швидкодіючих токсигенних компонентів тощо. Як основу препаратів для фітозахисту активно використовують ризосферні мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Bacillus* з потенціалом ентомоцидної та антагоністичної активності відносно широкого кола комах-

шкідників та фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу метаболітів різної природи.

Біопрепарати на основі цієї бактерії, характеризуються високою вибірковістю інсектицидної дії та екологічною безпечністю [1]. Дослідження біологічного різноманіття та фітозахисних властивостей природних штамів Bt дозволять розширити та поглибити знання щодо технології використання цих бактерій, як агентів біопрепаратів широкого спектру дії.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

На даний час накопичено певний досвід ефективного використання ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* (Bt) з потенціалом ентомоцидної та 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 їх високе біологічне різноманіття, диференціацію за інсектицидною активністю та токсигенністю

продукуємих білків, метаболітів [2]. Т. Г. Юдіна припустила, що спільність ентомоцидної і антимікробної дії полягає в утворенні іонних каналів у мембранах епітеліальних клітин комах і цитоплазматичних мембранах мікробних клітин [3]. Надалі, в роботах Л.К. Каменек із співавторами, продемонстровано вплив дельта-ендотоксинів *B. thuringiensis* на фітопатогенні бактерії і гриби [4]. Нещодавно вперше показано, що інсектицидний штам *B. thuringiensis* C25 ефективно контролює збудника хвороби шовковиці *Ciboria shiraiana* [5]. Низка робіт присвячена рістостимулюючій активності, яка проявляється *B. thuringiensis*, головним чином, за обробки рослин дельта-ендотоксином [4, 6]. Подальші дослідження поліфункціональних властивостей нових штамів *Bt* є актуальними для розширення можливостей ефективного використання біоагентів у практиці рослинництва.

Мета, завдання та методика досліджень

Мета дослідження – оцінити новий штам бактерій *B. thuringiensis* 87/3 в якості потенційної основи біопрепаратів широкого спектру дії.

Дослідження проводилися на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України, кафедри екобіотехнології та біорізноманіття; ТОВ «Біотех ЛТД», Київської області; Інституту садівництва НААН України, лабораторії фізіології рослин і мікробіології.

В роботі було використано новий відселектований *in vitro* штам ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (*Bt* H₁) №87/3, виділений з личинок природних популяцій листогризух комах *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₄) у природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся. Після аналітичної селекції даний 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 з загальноприйнятими у мікробіології та біотехнології методами [7, 8].

Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м'ясо-пептонний бульон (МПБ), Лурія Бертрані (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 (220 об./хв., температура +30°C) упродовж 48–72 годин. Об'єм середовища 50 мл, кількість інокулюма – не менше 4,0% від об'єму середовища. Титр колонієутворюючих одиниць не менше 3,6 млрд/мл культуральної рідини, який визначали шляхом глибинного посіву в агаризоване середовище, а також за допомогою камери Горяєва.

Вивчення морфології бактеріальних клітин проводили 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 у площині продуктивності аксенічних культур, характеру та швидкості утворення ентомоцидних метаболітів (спорокристалічного комплексу), [1].

У лабораторно-польових дослідках ефективність штаму *Bt* 87/3 визначали на біотесті *Leptinotarsa decemlineata* Say. L₁₋₂. Польові досліди проводили за такою схемою: контроль без обробки; контроль-хімічний інсектицид, варіант обробки рослин культуральною рідиною *B. thuringiensis* 87/3 (розведення 1:1). Досліди закладалися в умовах ТОВ «Біотех ЛТД» (Київська область, Бориспільський район, с. Городище), яке розташоване в зоні Лісостепу України. Загальна площа дослідної ділянки 0,01 га. У досліді використано картоплю сорту Моцарт. Обробка бактеріальною суспензією була проведена у період масової появи личинок 2-го віку. Витрата робочої рідини 300–350 л/га. Ефективність препаративної форми враховували по кількості загиблених личинок на 3,5, 7 і 10-у добу постановки досліда.

Кількість загиблених особин в досліді враховували за формулою Аббота [9]:

$$A = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \times 100, \quad (1)$$

де А – ентомоцидна активність, (%); M_0 – відсоток загиблених особин в досліді; M_k – відсоток загиблених особин в контролі. Загибель в контролі не повинна перевищувати 15,0%.

Антагоністичну дію бактеріальних штамів *Bt* щодо фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia* ssp. визначали у польових дослідженнях на базі Інституту садівництва НААН України, позакореневою обробкою дерев яблуні. Сад закладений у 2001 році на підщепі 54–118. Схема посадки дерев 5×3, система утримання ґрунту у міжряддях – природне задерніння. Для дослідів брали сорти різних груп достигання, а саме: літній сорт Дельбарестіваль, осінній – Слава Переможцям та зимовий – Вільмута. Польові досліді проводили за такою схемою: контроль-обприскування дерев водою; варіанти обробки рослин *Bacillus thuringiensis* 87/3; *B.subtilis* 0016; *B.pumilis* 0097. Для обробки дерев застосовували культуральну рідину бактерій, з розрахунку 20

л/га. Витрата робочої рідини 1000 л/га. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою пакета програм MS Excel.

Результати досліджень

Результати дослідження біологічної ефективності штаму *Bt* 87/3 на личинок колорадського жука L_{1-2} в умовах ТОВ «Біотех ЛТД» показали, що вже через 8–12 годин після обробки жуки перестають харчуватися. В перші дні після обробки процес зниження чисельності личинок шкідника відбувався повільно, але при цьому рослини не пошкоджувались, що обумовлено антифідантним ефектом. Загибель шкідників настає на третю добу після обробки, а максимальний ефект – після семи днів. Варіанти дослідів і результативність наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Ефективність препаративної форми *Bt* 87/3 на личинок колорадського жука L_{1-2} (2016–2018 рр.)

Варіанти дослідів	Загибель личинок за добою обліку, %				НІР _{0,95}
	3	5	7	10	
Контроль (без обробки)	0	0	0	1,5±0,3	0,44
Когінон	38,4±0,4	69,1±0,15	96,3±0,33	98,9±0,6	17,70
<i>Bt</i> 87/3	32,8±0,08	49,5±0,11	94,6±0,08	98,4±0,04	18,52

Результати досліджень свідчать про високу біологічну ефективність дії препаративної форми *Bt* 87/3 щодо личинок колорадського жука – 98,4%.

За результатами попередніх модельних досліджень встановлено, що досліджувані біоагенти-продуценти *Bt* 87/3 володіють високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia* ssp. Лабораторні досліді показали, що під впливом споро-кристалічного комплексу *Bt* 87/3 відбуваються значні зміни морфогенезу тест-культури в усіх варіантах, а саме: прояв характерних зон лізису, міняються щільність, товщина та напрямок росту міцелію, а також ступінь інгібування проростання конідій у межах 86,0–93,0 %. [10].

За результатами польових досліджень встановлено, що позакоренева обробка дерев яблуні різних термінів достигання, розчином із використанням бактерій *Bt* 87/3 сприяла зменшенню кількості уражених листків паршею яблуні в 1,5–2 рази, порівняно із контрольним варіантом, а саме, у оброблених варіантах

відсоток ураження був менше 40 %, тоді як контроль – від 55 % (рослини сорту Слава Переможцям) до 70 % (сорт Вільмута). Аналогічну закономірність відмічали і при позакореновому використанні *Bacillus pumilis*, за винятком сорту Дельбарестіваль, відсоток ураження листків був на рівні контролю. Відзначено, що позакореневе використання робочого розчину приготованого із культурою бактерій *Bacillus subtilis* не мало впливу на зміни кількості уражених паршею листків яблуні досліджуваних сортів.

Отже, встановлено, що обробка рослин яблуні суспензією на основі *Bt* 87/3, значно зменшувала кількість уражених листків паршею, порівняно із контролем.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Проведені дослідження дозволили оцінити ефективність дії штаму *Bt* 87/3 щодо личинок колорадського жука, а також фітопатогенів *Venturia* ssp, що розширює можливості його використання. Показано, що культура штаму *Bt*

87/3 має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу складає від 3,6 до 4,8 млрд/мл культуральної рідини), ентомоцидності (98,4%) та антифунгальної дії, яка проявляється у зменшенні кількості уражених листків паршею яблуні в 1,5–2 рази, порівняно із контрольним варіантом.

Таким чином, поліфункціональність штаму Bt 87/3 демонструє перспективи ефективного його використання у агропромисловості.

References

1. Kandibyn, N. V., Patika, T. Y., Ermolova, V. P. & Patika, V. F. (2009). Mykrobiyokontrol chyslennosti nasekomikh u yeho domynanta *Bacillus thuringiensis*. [Microbiological of insects and its dominant *Bacillus thuringiensis*]. Sankt-Peterburh [in Russian].
2. Bravo, A., Gomez, I. & Porta H. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnol*, 6, 17–26.
3. Yudina, T. G. (2006). Antimikrobnaya aktivnost i ekologicheskaya rol belkovykh vklucheniye bakteriy – predstaviteley rodov *Bacillus* [Antimicrobial activity and ecological role of protein inclusions of bacteria - representatives of *Bacillus* genera] (Dissertatsiya doktora biologicheskikh nauk). Moskovskiy gosudarstvennyy universitet im. M.V. Lomonosova, Moskva [in Russian].
4. Kamenek, L. K., Kamenek, D. V., Tyulpineva, A. A. & Terpilovskiy, M. A. (2008). Deystvie delta-endotoksina *Bacillus thuringiensis* v otnoshenii fitopatogennykh gribov rodov *Phytophthora* i *Fusarium*. [The action of Delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against plant pathogenic fungi of the genera *Phytophthora* and *Fusarium*]. *Biotechnologiya*, 5, 76–83 [in Russian].
5. Sultana, R. & Kim, K. (2016). *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraiana* in mulberry (*Morus australis* L.). *Biocontr. Sci. Technol*, 26 (2), 145–162.
6. Korobov, Y. A., Kamenek, D. V. & Kamenek, L. K. (2014). Rostostimuliruyushchiy effekt delta-endotoksina v otnoshenii yuvenilnykh rasteniy pertsy struchkovogo [Growth-stimulating effect of Delta-endotoxin on juvenile pepper plants]. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 11 (121), 14–19 [in Russian].
7. Smirnov, V. V., Reznik, S. R. & Sorokulova, I. B. (1983). Metodicheskie rekomendatsii po vyideleniyu i identifikatsii bakteriy

roda *Bacillus* iz organizma cheloveka i zhivotnykh [Guidelines for the isolation and identification of bacteria of the genus *Bacillus* from the human body and animals]. Kiev: Naukova dumka [in Russian].

8. Smirnov, W. A. (1962). A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Pathol*, 3, 384–386.

9. Abbot, W. & Econ, J. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Entomol*, 18, 265–267.

10. Patyka, T. I., Boiko, M. V. & Patyka, M. V. (2017). Biotekhnologichna polifunktsionalnist metabolitnoho sporo-krystalichnoho kompleksu ta osoblyvosti kultyvuvannya *Bacillus thuringiensis* [Biotechnological polyfunctionality of the metabolic spore-crystal complex and peculiarities of *Bacillus thuringiensis* cultivation]. *Mikrobiologichnyi zhurnal*, 79 (2), 77–84 [in Ukrainian].

ENTOMOPATHOGENS BACILLUS THURINGIENSIS AS A BASIS OF MICROBIAL PREPARATIONS OF A WIDE SPECTRUM OF ACTION

M. Boiko, M. Patyka, T. Patyka

e-mail: maryaulina@gmail.com

National University of bioresources and nature management of Ukraine

Heroes of Defense str., 13, Kyiv, 03041, Ukraine

*The aspects of using microbial preparations based on *Bacillus thuringiensis* for the plants protection against harmful organisms was discussed. The aim of researches was to evaluate bacteria *B. thuringiensis* 87/3 new strain as a potential basis for broad spectrum biological preparations.*

*The efficacy of the *Bacillus thuringiensis* 87/3 strain was demonstrated in laboratory and field conditions using *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₁₋₂), as well as phytopathogenic micromycetes *Venturia* ssp. The results of biological effectiveness Bt 87/3 strain study on the larvae of colorado potato beetle L₁₋₂ showed that in the first days after treatment, the process of reducing the number of larvae occurred slowly, but the plants were not damaged due to the antifidant effect. Expressive maximum of the *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₁₋₂) larvae death recorded on the tenth day with an infectious load of 1,1. The results research indicate a high biological efficacy of the Bt 87/3 preparation action on the colorado potato beetle larvae – 98,4%. It has been established the high adaptability of 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. It was established that the treatment of apple trees with a suspension based on Bt 87/3 significantly reduced the number of scabbed leaves compared with the control, namely, in the treated variants, the percentage of lesion was less than 40%, while the control ranged from 55% (Glory Winners) to 70% (Wilmot variety). A wide range action of endoforming bacteria Bt demonstrates the prospects of their use for phytoprotection.

Keywords: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, biocontrol, spore-crystal complex, antifungal action, entomocidal activity.

ЕНТОМОПАТОГЕНЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

М. В. Бойко, Н. В. Патыка, Т. И. Патыка
e-mail: maryaulina@gmail.com

Национальный университет биоресурсов и природоиспользования Украины
ул. Героев Оборона, 13, г. Киев, 03041, Украина

Освещены аспекты применения микробных препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* для защиты растений от вредоносных организмов. Целью исследования было оценить новый штамм бактерий *B. thuringiensis* 87/3 в качестве потенциальной основы биопрепаратов широкого спектра действия.

Эффективность действия штамма *Bacillus thuringiensis* 87/3 доказана в лабораторных и полевых условиях с использованием биотеста *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L_{1-2}), а также фитопатогенных микромицетов рода *Venturia* ssp. Результаты исследования биологической

эффективности штамма Bt 87/3 на личинки колорадского жука L_{1-2} показали, что в первые дни после обработки процесс уменьшения численности личинок вредителя происходил медленно, но при этом растения не повреждались, что обусловлено антифидантным эффектом. Выразительный максимум гибели личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L_{1-2}) зафиксирован на десятый день при инфекционной нагрузке 1:1. Результаты исследований свидетельствуют о высокой биологической эффективности действия препаративной формы Bt 87/3 на личинки колорадского жука – 98,4%. Показано, что штамм *B. thuringiensis* 87/3 имеет высокую технологичность (титр метаболитного споро-кристаллического комплекса от 3,6 до 4,8 млрд. в 1 мл культуральной жидкости), энтомоцидность (99,4%) и антифунгальное действие, которое проявляется в уменьшении количества пораженных растений яблони возбудителем парши в 1,5–2 раза, по сравнению с контрольным вариантом. Установлено, что обработка яблонь суспензией на основе Bt 87/3, значительно уменьшала количество пораженных паршой листьев, по сравнению с контролем, а именно, в обработанных вариантах процент поражения был меньше 40 %, тогда как контроль от 55 % (сорт Слава Победителям) до 70 % (сорт Вильмута). Широкий спектр действия эндообразующих бактерий Bt демонстрирует перспективность их использования для фитозащиты.

Ключевые слова: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, биоконтроль, споро-кристаллический комплекс, антифунгальное действие, энтомоцидная активность.