

УДК 579.852.11.24

Н. С. Дирда, О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

**СЕЛЕКЦІЯ ВИСОКОПРОДУКТИВНОГО ШТАМУ
ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*,
ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ ЗАХИСТУ ПРИРОДНИХ БІОЦЕНОЗІВ**

За допомогою ультрафіолетового опромінення спор штаму *Bacillus thuringiensis* В-2 отримано варіант В-2-6 із більшою, ніж у вихідного штаму, продукцією спор ($3,93 \times 10^9$ проти $1,94 \times 10^9$ КУО/мл у вихідного штаму) та ендотоксину (10,1 проти 4,0 мкг/мл). Інсектицидна активність отриманого варіанта становила 64,3 % загибелі листовійки всеїдної *Archips podana* на третю добу та 97,3 % на десятю добу після обробки, що на 20,4 % перевищує активність штаму В-2. Розглядається можливість застосування отриманого варіанта для захисту рослин природних біоценозів від листогризувачів.

Н. С. Дырда, О. А. Дрегваль, Н. В. Черевач, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

**СЕЛЕКЦИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОГО ШТАММА
ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*,
ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ ЗАЩИТЫ ПРИРОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ**

С помощью ультрафиолетового облучения спор штамма *Bacillus thuringiensis* В-2 получен вариант с большей, чем у исходного штамма, продукцией спор ($3,93 \times 10^9$ против $1,94 \times 10^9$ КУО/мл у исходного штамма) и эндотоксина (10,1 против 4 мкг/мл). Инсектицидная активность полученного варианта составляла 64,3 % гибели листовёртки всеядной *Archips podana* на третьи сутки и 97 % на десятые сутки после обработки, что на 20,4 % превышает активность штамма В-2. Рассматривается возможность применения полученного варианта для защиты растений природных биоценозов от листогрызущих насекомых-вредителей.

N. S. Dyrda, O. A. Dregval, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University

**SELECTION OF HIGH-YIELD STRAIN
OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS*
PROMISING FOR NATURE PROTECTION**

The strain variation В-2-6 with a higher production of spores ($3,93 \times 10^9$ KFU/ml in that variation vs $1,94 \times 10^9$ KFU/ml in the initial strain) and endotoxin (10.1 mcg/ml vs 4 mcg/ml respectively) was obtained by means of the ultraviolet irradiation of the В-2 strain *Bacillus thuringiensis* spores. Insecticidal activity of the obtained variation is characterized by the deaths of 64.3 % of the great brown twist *Archips podana* at the 3rd day and 97 % at the 10th day after the treatment, which is 20.4 % higher than В-2 strain activity. Possibility of the obtained variation implementation for the natural plants protection against the leaf-eating insects is under discussion.

Вступ

Застосування мікробних інсектицидних препаратів у захисті рослин дозволяє зберегти видове різноманіття лісових біоценозів. Екологічними перевагами мікробних препаратів над хімічними є також висока видова специфічність відносно шкідливих комах і природні механізми розщеплення відмерлих мікроорганізмів, які виробилися в процесі еволюції, у той час як пестициди – чужорідні для довкілля сполуки, здатні накопичуватись у токсичних концентраціях. На відміну від хімічних, біологічні препарати є засобом не знищення, а регуляції чисельності шкідників [2; 3; 5]. Понад 95 % усіх біоінсектицидів розроблено на основі *Bacillus thuringiensis* [7].

Важлива умова виробництва мікробіологічних засобів захисту рослин від комах-шкідників – наявність високоефективних штамів-продуцентів, тому проблема селекції штамів снтомопатогенних мікроорганізмів досить актуальна. Відомо, що за допомогою УФ-опромінення можна отримати варіанти штамів *B. thuringiensis* з підвищеною продукцією ендотоксину. Такі мутації виникають із високою частотою і пов'язані зі зміною метаболічних шляхів регуляції синтезу токсину [6].

Виходячи з вищесказаного, мета даної роботи – підвищення біологічної ефективності штаму *B. thuringiensis* В-2 відносно тест-об'єкта – листовійки всхідної (*Archips podana*), поширеного шкідника природних біоценозів.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували штам снтомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* В-2 із колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ДНУ ім. Олесья Гончара. Джерелом УФ-променів була лампа В 15.2 Medicor Budapest. Опромінювали споровий матеріал з концентрацією 1×10^8 спор/мл. Час експозиції складав 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0 хв. Кількість життєздатних клітин у 1 мл суспензії визначали методом висіву на м'ясопептонний агар (МПА). Відсоток виживання опромінених ендоспор підраховували відносно контролю. На основі отриманих даних будували криву виживання. Описували морфологію колоній варіантів на МПА та мікроскопували мазки, фарбовані основним фуксином і амідочорним. Звертали увагу на форму, розташування клітин, наявність спор і кристалів.

Для визначення продуктивності змінних варіантів та вихідного штаму *B. thuringiensis* бактерії культивували у живильному середовищі, розробленому на кафедрі мікробіології та вірусології ДНУ [1]. Інокуляцію здійснювали суспензіями добових культур, вирощеними на МПА, із концентрацією 1×10^9 кл./мл із розрахунку 1 % від об'єму живильного середовища. Культивували за температури +28 °С на мікробіологічній качалці при 200 об./хв протягом 48 годин. Термін завершення культивування визначали за інтенсивністю спороутворення. Кількість колонієтворних одиниць (КУО) на 1 мл визначали методом висіву серійних розведень культуральної рідини на МПА. Кількість δ-ендотоксину визначали методом Яловіцина [4].

Інсектицидну активність визначали в лабораторних умовах шляхом зараження личинок тест-об'єкта методом вільного поїдання корму (листя липи звичайної *Tilia europaea*), зволоженого 5 % концентрацією культуральної рідини вихідного штаму та відібраних варіантів. Корм для контрольних комах зволожували водою. Інсектицидну активність визначали за відсотком загибелі на 3, 6 та 10 добу. Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента на 5 % рівні значимості.

Результати та їх обговорення

На основі підрахунку кількості ендоспор, які вижили, та відсотка виживання після опромінення протягом різного часу відносно неопроміненого контролю була побудована крива виживання (рис. 1). Найбільший відсоток виживання спостерігався при опроміненні протягом 1,5 хв – 90 %, після другої хвилини опромінення відсоток виживання різко знизився і при 2,5 хв становив 1,82 %, а після опромінення протягом 5 хв – 0,01 %.

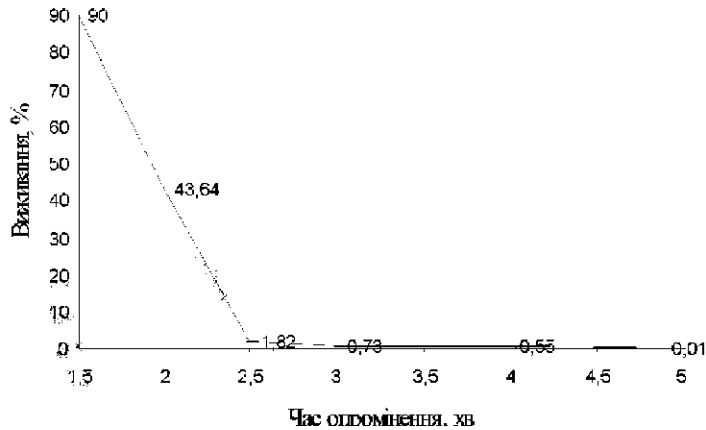


Рис. 1. Крива залежності виживання ендоспор *Bacillus thuringiensis* B-2 від терміну УФ-опромінення

Для відбору колоній змінених варіантів використовували висіви із суспензій, опромінених протягом 3, 4, і 5 хв, з 0,73, 0,55 і 0,01 % виживання відповідно. Ознакою при відборі змінених варіантів слугувала морфологія колоній. Із літературних джерел добре відома морфологічна мінливість у бактерій *B. thuringiensis*, яка полягає в утворенні різних типів колоній (*S*-, *R*-, *O*-, *D*-форми тощо) [4]. *S*-варіант характеризується гомогенним ростом при культивуванні у рідкому живильному середовищі, на твердих середовищах ріст рівномірний, колонії округлі, з рівним краєм, кремові, плоскі, блискучі; споро- та кристалотвірні затримуються до 10–14 діб, часто зустрічаються акристалогенні форми.

R-варіант утворює дрібнозернистий осад у рідких середовищах на твердих середовищах, колонії матові, сухі, щільні, шореткі, іноді зморщені, округлі або з ризоїдними краями, сірувато-білого кольору; утворює крупні кристали на 14–15-ту добу культивування на МПА. *O*-форма на щільних середовищах утворює округлі або неправильної форми колонії, сірувато-білі, припідняті до центру, матові, дрібнозернисті. На сьому добу росту на МПА відмічається синхронне споро- та кристалоутворення. Крім цих основних форм, виділяють карликові *D*-форми.

Колонії вихідного штаму B-2 належали до *R*-типу. Після опромінення спор виявлено всі основні типи колоній та відібрано для подальшої роботи 10 варіантів, які належали до різних морфологічних форм. У результаті мікроскопічного дослідження добових та 7–10-добових культур, вирощених на МПА, встановлено, що клітини варіанта B-2-1 (*S*-типу) та B-2-6 і B-2-8 (*O*-типу) були невеликого розміру (3,0–4,5 × 0,8–1,0 мкм), розташовані поодинокі або короткими ланцюжками по 2–3; у варіанта B-2-1 невелика кількість кристалів, у B-2-6 та B-2-8 – досить висока. Для варіанта B-2-9 (*O*-тип) характерне розташування паличок у довгих ланцюжках по 5–6 та більше і висока кількість кристалів. Варіант B-2-5 (*R*-тип) має близьку до вихідного штаму

продукцію кристалів та розмір клітин ($4,0\text{--}6,0 \times 1,0\text{--}1,2$), що розташовувались у ланцюжках по 3–4. Варіанти В-2-2 та В-2-3 характеризувались затримкою споро- та кристалоутворення. За кількістю кристалів у мазках, пофарбованих амідочорним, із десяти варіантів для подальших досліджень відібрано три (В-2-6, В-2-8, В-2-9).

Наступний етап досліджень – визначення продуктивності вихідного штаму *B. thuringiensis* В-2 та змінених варіантів. Як видно з даних таблиць 1 та 2, усі змінні варіанти виявились продуктивнішими, ніж вихідний штам, який накопичував $(1,9 \pm 0,38) \times 10^9$ КУО/мл та 4,0 мкг/мл ендотоксину у культуральній рідині.

Таблиця 1

Продуктивність штаму *Bacillus thuringiensis* В-2 і змінених варіантів

Варіант	Вихідний штам В-2	В-2-6	В-2-8	В-2-9
Тип, $\times 10^9$ КУО/мл	$1,94 \pm 0,38^*$	$3,93 \pm 0,28^*$	$3,12 \pm 0,12^*$	$4,02 \pm 0,08^*$

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з вихідним штамом *B. thuringiensis* В-2.

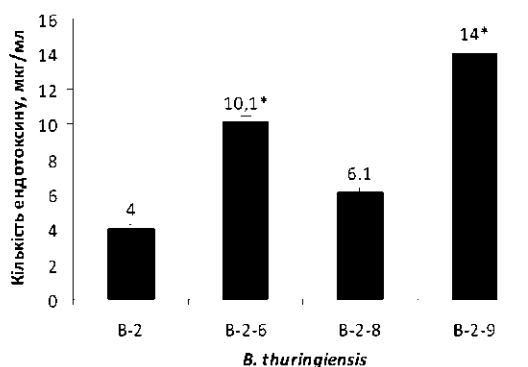


Рис. 2. Кількість δ -ендотоксину штаму *Bacillus thuringiensis* В-2 та змінених варіантів:

* – $p < 0,05$ порівняно з вихідним штамом *B. thuringiensis* В-2

Найпродуктивнішим був варіант В-2-9 – $(4,0 \pm 0,08) \times 10^9$ КУО/мл та 14 мкг/мл ендотоксину. Дещо менша кількість спор і ендотоксину накопичувалась у культуральній рідині варіанта В-2-6 – $(3,9 \pm 0,28) \times 10^9$ КУО/мл та 10,1 мкг/мл відповідно.

Інсектицидну активність штаму В-2 та змінених варіантів визначено на гусені листовійки всеїдної III–IV віку (табл. 2). Найбільшою інсектицидною активністю характеризувався варіант В-2-6, який спричинив 64,3 % загибелі на третю та шосту добу та 97,3 % на десятю добу після обробки. Інсектицидна активність варіанта В-2-8 перебувала на рівні вихідного штаму, а в варіанті В-2-9 була нижчою за нього.

Таблиця 2

Інсектицидна активність штаму *Bacillus thuringiensis* В-2 і змінених варіантів

Варіант	Загибель листовійки всеїдної, %		
	3 доби	6 діб	10 діб
Вихідний штам В-2	$26,7 \pm 3,0$	$28,6 \pm 2,5$	$76,9 \pm 3,9$
В-2-6	$64,3 \pm 3,4^*$	$64,3 \pm 3,4^*$	$97,3 \pm 1,6^*$
В-2-8	0	$14,3 \pm 1,6^*$	$77,3 \pm 2,7$
В-2-9	$13,3 \pm 2,7$	$14,3 \pm 3,0^*$	$53,8 \pm 3,4^*$
Контрольні комахи	0	$6,7 \pm 1,9$	$13,3 \pm 1,3$

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з вихідним штамом *B. thuringiensis* В-2.

Оскільки застосований тест-об'єкт – листовійка всеїдна (*Archips podana*) – належить до одного з найпоширеніших шкідників рослинних угруповань, отримані високі показники інсектицидної активності варіанта В-2-6 вказують на необхідність проведення подальших досліджень можливості застосування цього варіанта у природних біоценозах проти листовідних комах.

Висновки

Отримано високопродуктивний варіант В-2-6 штаму *B. thuringiensis*, інтенсивність спороутворення та продукція ендотоксину якого більше ніж удвічі перевищує ці показники вихідного штаму В-2. Інсектицидна активність отриманого варіанта відносно листовійки всеїдної на 20,4 % перевищує активність вихідного штаму.

Бібліографічні посилання

1. Дрегваль О. А. Підбір оптимальних режимів кислотності середовища та аерації при глибинному культивуванні *Bacillus thuringiensis* і *Beauveria bassiana* / О. А. Дрегваль, Н. В. Черсвач, А. І. Вінніков // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2010. – Вип. 18, т. 1. – С. 15–19.
2. Дятлова К. Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 5. – С. 17–22.
3. Патыка В. П. Екологічні основи застосування біологічних засобів захисту рослин як альтернативи хімічним пестицидам / В. П. Патыка, Т. Г. Омелянець // Агроекологічний журнал. – 2005. – № 2. – С. 21–23.
4. Патыка В. Ф. Экология *Bacillus thuringiensis* / В. Ф. Патыка, Т. И. Патыка. – К. : Изд-во ПДАА, 2007. – 216 с.
5. Федоренко В. О. Биологическая защита растений: успехи, проблемы, перспективы / В. О. Федоренко, Ю. А. Гниненко // Карантин і захист рослин. – 2005. – № 7. – С. 1–2.
6. Ghribi D. Improvement of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by u.v. and nitrous acid affecting metabolic pathways and/or delta-endotoxin synthesis / D. Ghribi, N. Zouari, S. Jaoua / J. Appl. Microbiol. – 2004. – Vol. 97, N 2. – P. 338–346.
7. Sarvjeet K. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2000. – Vol. 16. – P. 781–793.

Надійшла до редакції 14.07.2011