

<sup>1</sup> Т. І. ПАТИКА, <sup>2</sup> М. В. ПАТИКА, доктори с.-г. наук

<sup>1</sup> О. І. КИТАЄВ, кандидат біол. наук

<sup>1</sup> Ю. Д. ГОНЧАРУК, молодший науковий співробітник

<sup>1</sup> Інститут садівництва Національної академії аграрних наук  
(ІС НААН) України

<sup>2</sup> Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської  
мікробіології Російської академії сільськогосподарських наук  
(ВНДІСГМ РАСГН)

## ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЙ СТВОРЕННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ФІТОЗАХИСНОЇ ДІЇ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

<sup>1</sup> Т. І. ПАТЮКА, <sup>2</sup> М. В. ПАТЮКА, Docs Agr Sci

<sup>1</sup> О. І. КИТАЄВ, PhD

<sup>1</sup> J. D. GONCHARUK, Junior Research Worker

<sup>1</sup> Institute of Horticulture, NAAS of Ukraine

<sup>2</sup> All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, RAAS

## OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGIES FOR THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF THE MICROBIOLOGICAL PREPARATIONS OF THE PHYTOPROTECTIVE ACTION BASED ON THE BACTERIA *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Розглянуто питання оптимізації технологій створення та застосування мікробіопрепаратів на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Селекційний відбір виявив перспективні штами-продуценти *Bt* з різноманітністю морфологічних типів і високою вихідною технологічністю (не менше 2,0 млрд. спор/1 мл культуральної рідини) та рівнем екзотоксигенності ( $LK_{50}$  не більше 3,0 мкл/1 г корму).*

*Рассмотрены вопросы оптимизации технологий создания и применения микробиопрепаратов на основе энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*. Селекционный отбор выявил перспективные штаммы-*

*продуценти Bt с разнообразием морфологических типов и высокой исходной технологичностью (не менее 2,0 млрд. спор/1 мл культуральной жидкости) и уровнем экзотоксигенности ( $ЛК_{50}$  не более 3,0 мкл/1 г корма).*

*The authors have considered the problems of optimizing the technologies for the development and application of the microbiopreparations based on the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. Selective screening revealed the promising strains - producers Bt with the variety of morphological types and high output manufacturability (at least 2.0 billion/1 ml culture medium) and level of exotoxigenity ( $LC_{50}$  no more than 3.0 mcl/1 g of feed).*

У сучасному і майбутньому землеробстві серед першочергових є одночасне вирішення трьох важливих завдань: підвищення продуктивності культурних агроценозів і якості продукції, зростання рівня рентабельності і технологій у рослинництві та охорона довкілля. Щодо першого і другого за багатолітню практику зроблено чимало, але ще недостатньо. Адже рівень виробництва продукції ще значно відстає від швидко зростаючих потреб. Стосовно третього завдання, то воно теж з кожним роком стає все актуальнішим. Дедалі більше фахівців усвідомлюють, що розвиток біологічних методів фітозахисту не лише забезпечує надійний захист сільськогосподарської продукції, але й розв'язує важливе питання збереження навколишнього середовища та природного рівня біологічного різноманіття. Останнім часом вдалося значно розширити й поглибити уявлення про роль мікроорганізмів у землеробстві і рослинництві та сформулювати пріоритетні завдання щодо заміни пестицидів при захисті рослин від шкідників і хвороб на мікробіологічні препарати [1, 7, 9].

Грунтоутворення та рослинництво підпорядковані основному закону ефективності взаємодії системи, що сформувалася у процесі еволюції: ґрунт – мікроорганізми – рослини. Ця система визначає ґрунтову родючість, інтенсивність ґрунтово-мікробіологічних процесів, ріст і розвиток рослин. Завдання полягає в тому, щоб не порушувати, а, навпаки, максимально оптимізувати її. Роль сільськогосподарської мікробіології полягає у вивченні закономірностей ґрунтово-мікробіологічних процесів і оптимізації їх шляхом впливу на взаємовідношення між компонентами вказаної системи. При цьому особливу увагу необхідно приділяти одному з основних і динамічних її компонентів – мікроорганізмам, які є головним чинником процесів ґрунтоутворення, живлення рослин і фітосанітарного стану насаджень. Особливості мікроорганізмів полягають у тому, що при відповідних умовах вони можуть здійснювати біосинтез різних метаболітів, набувати інтенсивного росту й розвитку. При оптимізації систем захисту рослин, які забезпечують значні показники виходу

високоякісної екологічно чистої продукції, особлива увага приділяється методам мікробіологічного контролю чисельності комах-шкідників. На основі мікроорганізмів розроблені та використовуються препарати інсектицидної та фунгіцидної дії.

Крім основного діючого інгредієнту, біопрепарати мають у своєму складі наповнювачі, стабілізатори та ін. [2, 12, 14]. Мікробіологічні біопрепарати являють собою живі клітини відселектованих за корисними властивостями мікроорганізмів, які знаходяться або в культуральній рідині, або адсорбовані на нейтральному носії. У високоефективному та високоякісному біопрепараті, як правило, міститься в одиниці маси максимум активних клітин біоагенту з відповідними властивостями, зберігається життєздатність клітин протягом тривалого часу. До цих характеристик додаються добра персистентність, технологічність і економічність у виготовленні та застосуванні препаратів.

Науково-теоретичні та практичні розробки нових препаратів, рекомендації стосовно їх раціонального впровадження і системи біозахисту рослин знаходять широке застосування у практиці управління фітосанітарним станом агроєкосистем – від етапу створення високоефективного асортименту засобів захисту рослин на основі малотоннажного та промислового виробництва до використання в закритому і відкритому ґрунті. Вчені-мікробіологи з провідних наукових установ і центрів різних країн володіють значним потенціалом у напрямку розробок мікробіопрепаратів для використання в аграрному секторі. Світовий асортимент сучасних біопрепаратів фітозахисного призначення широкий та різноманітний. Крім цього, в результаті застосування науково-методологічного досвіду, практичних та наукових підходів і розробок вітчизняних та російських науковців виробництву запропоновано препарати ентомопатогенної дії різних форм та з різним спектром призначення (Бітоксикацилін, Бікол, Лепідоцид, Бактокуліцид, Бацикол, Дендробацилін, Децимід та ін.) [2, 10, 12]. Цілеспрямовані дослідження біологічного потенціалу природних метаболітів, екологічно безпечних ентомопатогенних бактерій (як продуцентів біологічно активних речовин та агентів біопрепаратів) з комплексом властивостей, корисних для агрофітоценозів, відіграють важливу роль і дуже актуальні у забезпеченні екологічно збалансованого аграрного виробництва.

Ключовими умовами досягнення успіху є всебічна раціоналізація хімічного методу і послідовне впровадження фундаментально-прикладних розробок стосовно використання біоагентів, які досліджуються та культивуються в умовах біолабораторій. Ці два процеси взаємозв'язані, оскільки в умовах підвищеного пестицидного навантаження на плодові насадження (за високого рівня екологічної безпеки) не завжди вдається домогтися стабільного ефекту від використання біоагентів (наприклад,

ентомофагів або мікробіопрепаратів). І навпаки, при організації диференційної за культурами та шкідниками послідовної заміни пестицидів на регулювальні біозасоби можна активізувати і застосовувати в інтересах практичного захисту рослин природну біоту. Як свідчить досвід, скорочення кількості пестицидних обробок незмінно веде до накопичення та підвищення регулюючих функцій усього різноманіття паразитів і хижаків. У міру відновлення балансу корисних і шкодочинних видів в агроценозах зони природного біоконтролю розширюються і в них формуються трофічні ланцюжки, що об'єднують біоту в єдину систему біоценотичної регуляції.

**Методика досліджень.** З метою розробки та оптимізації технологій виробництва і застосування мікробіопрепаратів на основі ентомопатогенних бактерій групи *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) протягом 2002–2012 рр. були проведені дослідження в наукових установах України та Росії: в Інституті сільськогосподарської мікробіології (ІСГМ, Чернігів), Інституті садівництва (ІС) НААН України (Київ) та Всеросійському науководослідному інституті сільськогосподарської мікробіології РАСГН (ВНДІСГМ, Санкт-Петербург).

В роботі використовувалися референтні екзотоксигенні штами ентомопатогенних бактерій *Bt* з колекції мікроорганізмів ВНДІСГМ РАСГН *Bt*H1 800, а також нові штами ентомопатогенів природного типу, що виділяли з популяцій хворих і загиблих комах різних еколого-географічних регіонів України та Росії (*Bt*H<sub>1</sub> 14, *Bt*H<sub>1</sub> 20). Скринінг і селекцію цих штамів виконували загальноприйнятими в мікробіології методами з використанням прийомів, описаних у працях ряду авторів [3-6, 8, 10-13].

**Результати досліджень.** В роботі з підвищення ефективності мікробіоконтролю чисельності комах-шкідників першочерговим етапом є вибір конкурентоздатного активного технологічного штаму бактерій та, безумовно, якісні показники інокулянта (високий титр, функціональна активність клітин бактерій при їх зберіганні).

Встановлено, що на розвиток, синхронність розмноження та споротворення культури *Bt* впливають, перш за все, форма посівного матеріалу – інокулянта (вегетативна або спорова) та його вікова стадія, тоді як доза істотного значення не має. Роль селекційних процедур для штамів добре відома. Тому при відборі останніх обов'язково враховували явище спонтанної мінливості. В результаті багатоступінчастої аналітичної селекції відібрано оптимальні варіанти штамів-продуцентів *Bt* в ряді генерацій з аналізом біологічних і господарсько цінних властивостей морфотипів у відповідності з селекційними критеріями [12]. Виявлено широке різноманіття морфолого-колоніальних фенотипів. Серед основних типів колоній виділено такі:

- 1) тип: круглі сірувато-білі колонії, з матовою дрібно-шорсткою по-

верхню, діаметр 6-10 мм;

2) тип: округлі з нерівними краями, білувато-сірі, шорсткі, діаметр 4-6 мм;

3) тип: сірувато-білі колонії, матові, з різoidними краями, шорсткі та зморшкуваті, діаметр 8-12 мм.

Співвідношення типів колоній у популяції *Bt* першого серотипу (H1) наведено в таблиці 1.

*1. Склад популяції  $BtH_1$  за морфологічним типом колоній*

Типи колоній	Співвідношення типів колоній, %	
	$BtH_1-14$	$BtH_1-20$
1	86,6	87,8
2	11,9	10,1
3	1,5	2,1

Результати свідчать, що основу популяції складали клітини, які утворювали колонії першого типу. Крім цього, виявлено різницю у фізіологічному стані культури (у типах клітин популяції), табл. 2.

*2. Склад популяції *Bt* першого серотипу за морфолого-колоніальним фенотипом при мікроскопічному аналізі*

Тип колоній	Результати мікроскопічного аналізу на сьому добу росту	Співвідношення типів колоній, %					
		1		2		3	
		$BtH_1$ 14	$BtH_1$ 20	$BtH_1$ 14	$BtH_1$ 20	$BtH_1$ 14	$BtH_1$ 20
1	98-100% спор, співвідношення «спори-кристали» – 1:1	9	10	2	4	1	2
2	98-100% спор, співвідношення «спори-кристали» – 1,5:1–2:1	9	7	9	9	5	3
3	30% спор і кристалів; 20% проспору; 50% вегетативних клітин	2	3	9	7	14	15

Препаративна форма кожного штаму потребує індивідуальних технологічних підходів. Відповідно до вимог щодо створення біопрепаратів на основі високоактивного штаму визначено технологічні показники, тобто здатність нагромаджувати доволі високий титр у поживних середовищах [2]. Результати визначення технологічності перспективних штамів *Bt* показали, що за параметрами та умовами культивування вони можуть бути різними. Це обумовлюється особливостями метаболізму, лабільністю складу клітин, динамікою росту, розвитком і спороутворенням конкретного штаму.

Досліджені ізоляти *Bt* першого серотипу характеризувались активним спороутворенням, високими кількісними показниками продуктивності, а

са́ме: титр спор не менше 2,0 млрд в 1 мл культуральної рідини, що узгоджується із селекційними критеріями відбору варіантів бактерій групи *Bt*.

В ході багаторічних досліджень розроблено науково-методичні підходи до підбору перспективних і високоактивних штамів-продуцентів біопрепаратів фітозахисної дії при біотестуванні на інсектарних інтактних і контактних популяціях комах. Ці підходи дозволяють у лабораторних і природних умовах проводити оцінку ентомоцидної активності штамів. Таким чином, відкривається можливість оптимізувати і підвищити результативність селекційних процедур і методів біологічної оцінки за токсигенністю і вірулентністю.

Слід зазначити, що біологічні особливості штамів *Bt* (нерідко і в межах одного серологічного варіанту) значно різняться за інсектицидною активністю і токсичністю білків та інших метаболітів, що продукуються ними. Патогенність штамів мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин – є необхідною умовою для подальшого депонування та використання їх на біотехнологічних виробництвах. Використовуються такі штами зазвичай після доведення їх активності до рівня, що забезпечував би рентабельність виробництва цільових продуктів мікробного синтезу.

Патогенна дія штамів *Bt* на комах пов'язана з токсинами та іншими метаболітами, котрі вони продукують. Токсини є важливими факторами патогенності, які виробляються мікроорганізмами та реалізують основні механізми інфекційного процесу. Кристалічні білки  $\delta$ -ендотоксини розглядаються як головні токсикологічні компоненти біоінсектицидів на основі бактерій *Bt*, хоча штами цих бактерій продукують ще й інші фактори активності щодо фітофагів, наприклад, термостабільний водорозчинний  $\beta$  – екзотоксин нуклеотидної природи, фосфоліпази,  $\alpha$  – ,  $\gamma$  – екзотоксини, лецитинази, протеази та ін. [3, 4, 10, 15]. Патогенність не є виключною властивістю бактерії, тим більше при оцінці ентомопатогенних *Bt*. Це видова властивість мікроорганізму, що виявляється по відношенню до організму певного виду за звичайних умов їх взаємного впливу один на одного. Вірулентність – ступінь патогенності, яка може змінюватися в залежності від штаму, в тому числі отриманого штучно, а також від імунності чутливого хазяїна.

Оцінка екзотоксиногенності штамів *BtH<sub>1</sub>* на інсектарній популяції кімнатної мухи (*Musca domestica L.*) (табл. 3) показала переважну загибель личинок (від 86,0 до 100%) при інфікуванні їх *BtH<sub>1</sub>* в розведеннях культуральної рідини 1:4 та 1:8 (відповідно 25 і 12,5 мкл/г корму). За продуктивністю і рівнем екзотоксиногенності для личинок кімнатної мухи нові штами не поступаються перед референтним штамом *BtH<sub>1</sub>* 800.

Таким чином, у ході послідовних генерацій були відібрані перспективні штами *BtH<sub>1</sub>* 14 і *BtH<sub>1</sub>* 20, які поєднують практично цінні властиво-

### 3. Оцінка рівня екзотоксिनогенності *BtH1* на личинках *Musca domestica L.*

Штам	Титр спор, млрд./мл культуральної рідини	% загибелі личинок при інфікуванні у концентрації екзотоксину, мкл/г корму				ЛК <sub>50</sub> , мкл/г корму
		25	12,5	6,25	3,12	
<i>BtH</i> , 14	3,09	100±0,0	100±0,0	85,0±1,6	75,0±1,3	3,0
<i>BtH</i> , 20	3,27	100±0,0	100±0,0	81,9±1,5	72,9±1,0	3,0
<i>BtH</i> , 800	2,62	100±0,0	86,3±1,6	80,4±1,3	77,9±1,3	3,4

сті: висока вихідна технологічність (стабільний титр спор 3,0 млрд/мл культуральної рідини) та екзотоксिनогенність (за показниками ЛК<sub>50</sub> для личинок другого віку *Musca domestica L.* – до 3,0 мкл/г корму).

У результаті лабораторних експериментів підібрано поживні середовища різного складу, які можуть бути використані для регіонального та промислового виробництва біопрепаратів на основі *Bt*. Розроблено науково-методичні підходи до біотехнологічного одержання різних препаративних форм на основі високоактивних штамів *Bt*, що забезпечують максимальну продукцію ентомопатогенних компонентів. Оптимізація основних параметрів і факторів росту, якісна оцінка цільових продуктів синтезу, визначення ефективності технологічного процесу дозволяють отримувати вихідні стандартні дані для складання нормативної документації.

Успіх використання мікробних біопрепаратів (включаючи вироблені на основі *Bt*) залежить, у першу чергу, від їх форми та якості, тобто від технологічних параметрів виготовлення і не меншою мірою від правильної раціональної технології їх застосування, на ефективність якого, у свою чергу, впливає цілий ряд інших технологічних екологічних видоспецифічних чинників і характер об'єкта, де мешкає шкідливий агент (рослина, ґрунт, водоймище і т. д.). Просте перенесення рекомендацій із застосування хімічних засобів захисту рослин у галузь використання біопрепаратів неприйнятне, оскільки останні, кожен окремо, мають свою специфіку та вимагають спеціальних досліджень і розробок. Тому важливим є удосконалення методології досліджень з урахуванням більшого числа біотичних і абіотичних факторів. Тільки в цьому випадку можна достовірно прогнозувати можливі зміни в системі «паразит – хазяїн», приймати ефективні тактичні рішення і попереджати небезпечно для оброблюваних культур збільшення чисельності шкідливих видів.

Для ефективного використання мікробіопрепаратів на основі *Bt* – основних сучасних продуцентів різних препаративних форм для контролю чисельності комах-шкідників на сільськогосподарських, садових, декоративних, лісових культурах – розробляється комплекс науково-методичних підходів і рекомендацій. Відомості про селективність, гігієнічну та екологічну безпеку *Bt* є обґрунтуванням для широкого впро-

вадження мікробіологічних препаратів на їх основі.

**Висновки.** Тенденції останніх років у всьому світі свідчать, що завдяки своїй екологічній безпеці, біопрепарати будуть все активніше витісняти інсектициди хімічного синтезу для контролю чисельності фітофагів, хоча мова йде про розумну заміну найбільш небезпечних синтетичних пестицидів, а не про повне їх усунення. Розробці та застосуванню мікробіологічного препарату передують комплексні фундаментальні дослідження, що включають цілеспрямований скринінг, ідентифікацію та відбір стабільних і вірулентних штамів як основи препаратів. Розуміння механізмів взаємодії ентомопатогенів з організмом комахи-хазяїна, різних аспектів впливу факторів навколишнього середовища на агенти біологічного контролю фітофагів є необхідною умовою оптимізації технологій створення та застосування біопрепаратів у фітозахисті.

### *Список використаної літератури*

1. Агроекологія / под. ред. В. А. Черникова, А. И. Чекереса. – М.: Колос, 2000. – 536 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., 2005. – 154 с.
3. Барбашова Н. М., Владимирова Г. А. Антагонистические свойства и продуцирование экзотоксина *B.thuringiensis* // Тр. ВНИИСХМ. – 1981. – Т. 51. – С. 151-158.
4. Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми (Болезни насекомых) / под ред. М. С. Гилярова. – М.: Колос, 1972. – 640 с.
5. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. – Т. 2. – М.: Мир, 1984. – 466 с.
6. Диссоциация у *Bacillus thuringiensis* как проявление мутагенеза стационарной фазы / В. И. Чемерилова, О. А. Секерина, Е. В. Кравец, Л. В. Маланушенко // Экологическая генетика. – 2006. – Т. IV, № 1. – С. 28-35.
7. Екологія мікроорганізмів / В. П. Патика, Т. Г. Омелянець, І. В. Гриник, В. Ф. Петриченко. – К.: Основа, 2007. – 192 с.
8. Звягинцев Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
9. Землеробство з основами екології, ґрунтознавства та агрохімії / Петриченко В. Ф., Бомба М. Я., Патика М. В., Періг Г. Т., Іващук П. В.. – К.: Аграрна наука, 2011. – 492 с.
10. Кандыбин Н. В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика. – М.: Агропромиздат, 1989.–172 с.
11. Лескова А. Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценке их патогенных свойств. – Л., 1984. – С. 17-19.



12. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* / Н. В. Кандыбин, Т. И. Патыка, В. П. Ермолова, В. Ф. Патыка. – Санкт-Петербург – Пушкин: Инновационный центр защиты растений, 2009. – 254 с.
13. Рекомендации к практикуму по бактериозам насекомых. – Саранск, 1985. – 118 с.
14. *Тихонович И. А., Проворов Н. А.* Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты // Сельскохозяйственная биология: сер. биология растений. – 2011. – № 3. – С. 3-9.
15. *Crickmore N., Zeigler D. R., Feitelson J.* [et. all.] Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins // *Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, № 3. – P. 807-813.

*Одержано редколлегією 01.11.12*