

УДК 632.937

ОТБОР ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОПЕСТИЦИДОВ В УСЛОВИЯХ КАЗАХСТАНА

Дуйсембеков Бахытжан Алишерович (0000-0001-5743-1213)

Адилханкызы Айнура (0000-0001-8048-7987)

Глеубергенов Хамитжан Махсутович (0000-0001-5786-2275)

Балабек Айназ Нургаликызы (0000-0002-0092-4129)

ТОО «Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жиембаева», г. Алматы, Республика Казахстан

Аннотация: в целях сбора природных субстратов и поиска погибших насекомых с признаками бактериоза были проведены маршрутные обследования в лесных массивах и природных парках различных регионов Казахстана.

*Всего было собрано 530 образцов, из них исследовано 498 образца. Выделено в чистую культуру 30 изолятов *Bt*. Выделенные изоляты по физиолого-биохимическим свойствам соответствовали *Bacillus thuringiensis* и были отнесены к трем серотипам: 3a3b3c, подвида *Bt kurstaki*; H4ab – подвида *Bt sotto* и 31 серотип подвида *Bt toguchini*.*

Оценка биологической эффективности 30 штаммов бактерий была проведена на 8 видах вредителей из отряда чешуекрылых.

Ключевые слова: Казахстан, *Bacillus thuringiensis*, микроорганизм, штамм, вредители, чешуекрылые, биоинсектицид.

КАЗАКСТАНДЫН ШАРТТАРЫНДА БИОПЕСТИЦИДДЕРДИ ИШТЕП ЧЫГУУ ҮЧҮН ЖОГОРКУ НАТЫЙЖАЛУУ *BACILLUS THURINGIENSIS* ШТАММДАРДЫ ТАНДОО

Дуйсембеков Бахытжан Алишерович (0000-0001-5743-1213)

Адилханкызы Айнура (0000-0001-8048-7987)

Глеубергенов Хамитжан Махсутович (0000-0001-5786-2275)

Балабек Айназ Нургаликызы (0000-0002-0092-4129)

ТОО "Ж. Жимбаева атындагы өсүмдүктөрдү коргоо жана карантин боюнча Казак илимий-изилдөө институту", г. Алматы, Республика Казакстан

Аннотация: табигый субстраттарды чогултуу жана бактериоз белгилери бар өлгөн курт-кумурскаларды издөө максатында Казакстандын ар кайсы аймактарындагы токой массивдеринде жана жаратылыш парктарында маршрутук изилдөөлөр жүргүзүлдү.

*Жалпысынан 530 үлгү чогултулуп, 498 үлгү изилденген. 30 изоляттын таза культурасы бөлүнгөн. Бөлүнгөн изоляты боюнча физиологиялык-биохимиялык касиеттери келгендей *Bacillus thuringiensis* жана таандык үч серотип: 3a3b3c, подвид *Bt kurstaki*; H4ab – подвид *Bt sotto* жана 31 серотип подвида *Bt toguchini*.*

Бактериялардын 30 штаммынын биологиялык натыйжалуулугун баалоо лепидоптеран ордениндеги зыянкечтердин 8 түрүнө жүргүзүлдү.

Өзөктүү сөздөр: Казакстан, соо, микроорганизм, штамм, зыянкечтер, биоинсектицид.

SELECTION OF HIGHLY EFFECTIVE STRAINS OF BACILLUS THURINGIENSIS FOR THE DEVELOPMENT OF BIOPESTICIDES IN THE CONDITIONS OF KAZAKHSTAN

Duisembekov Bakhytzhан Alisherovich (0000-0001-5743-1213)

Adilkhankyzy Ainura (0000-0001-8048-7987)

Tleubergenov Hamitzhan Makhsutovich (0000-0001-5786-2275)

Balabek Aynaz Nurgalikyzy (0000-0002-0092-4129)

Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine named after Zh. Zhiyembayev LLP. Zh. Zhiyembaev”, Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract: *in order to collect natural substrates and search for dead insects with signs of bacteriosis, route surveys were conducted in forests and natural parks of various regions of Kazakhstan.*

A total of 530 samples were collected, of which 498 samples were examined. 30 Bt isolates were isolated into pure culture. The isolated isolates, according to their physiological and biochemical properties, corresponded to Bacillus thuringiensis and were classified into three serotypes: 3a3b3c, subspecies Bt kurstaki; H4ab – subspecies Bt sotto and 31 serotypes of the subspecies Bt toguchini.

The biological efficacy of 30 bacterial strains was evaluated on 8 species of pests from the Lepidoptera order.

Keywords: *Kazakhstan, Bacillus thuringiensis, microorganism, strain, pests, Lepidoptera, bioinsecticide.*

1. Введение

В последние десятилетия во всем мире большую актуальность приобретают вопросы, связанные с производством экологически безопасной сельскохозяйственной продукции. Одним из наиболее проблемных направлений является защита растений от вредных членистоногих, поскольку основным способом подавления их численности является химический метод. Однако хорошо известно, что широкомасштабное применение синтетических пестицидов приводит не только к накоплению токсичных веществ в продуктах питания растительного и животного происхождения,

но и нарушению экологического равновесия в экосистемах, появлению резистентных форм вредителей и губительному действию на нецелевую фауну (насекомых – энтомофагов и опылителей, птиц, рыб и др.) (Монастырский О.А., 2008).

Преимущества использования биологических препаратов в сельском хозяйстве очевидны. Они являются более безопасными для окружающей среды и здоровья человека, поскольку не содержат токсических веществ. Кроме того, они более специфичны в своих действиях, то есть направлены только на вредителей. Биологические препараты также более устойчивы к развитию резистентности

вредителей, поскольку они воздействуют на них различными механизмами (Кандыбин Н.В.).

Около 1% мирового рынка средств защиты растений составляют биопестициды. Особое место среди микроорганизмов, которые служат основой биопрепаратов, занимают энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* (Монастырский О.А., 2008).

Представители группы *B. thuringiensis* широко распространены в природе благодаря способности эффективно адаптироваться к различным экстремальным условиям. Эти бактерии выделяют из почвенных образцов, из больных насекомых и их трупов. Выявлено более 70 разновидностей, эффективных против фитофагов из отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* и *Hymenoptera*. После обработки растений бактерии *Bt* длительное время сохраняют жизнеспособность (Belousova M.E., 2017).

В Республике Казахстан были проведены исследования по выделению и идентификации эффективных микроорганизмов, способных контролировать численность вредных насекомых на сельскохозяйственных культурах. Эти микроорганизмы в дальнейшем использовались в создании микробиологических биопрепаратов.

В результате проведенных исследований были разработаны и проверены эффективные биопрепараты для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур. Они включают в себя бактерии, грибы и вирусы, которые специфически атакуют вредных насекомых и заболевания растений. Эти биопрепараты экологически безопасны и не наносят вреда окружающей среде, животным и человеку.

Целью настоящего исследования было выделение бактерий, принадлежащих к группе *thuringiensis*, их идентификация и отбор штаммов, перспективных в качестве продуцентов биопрепаратов энтомоцидного действия в отношении вредных насекомых.

2. Материалы и методы

исследований

Культурально-морфологические свойства бактерий изучали на плотных питательных средах различного состава по общепринятым методам в микробиологии (Бехер К., 1961), (Лабинская А.С. 1978).

Для изучения свойств колоний бактерии культивировали в чашках Петри на «А» среде. Колонии характеризовали по следующим признакам: величине, форме, прозрачности, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции (de Barjak H., 1967).

Для оценки специфичности действия споро-кристаллических смесей на насекомых штаммы выращивались на среде «А» в течение 6 суток при 30°C, до полного высыпания спор и кристаллов.

Биохимическую активность бактерий изучали по характеру и количеству тех ферментов, которые микробная клетка продуцирует и выделяет во внешнюю среду. Для диагностики микробов наибольшее значение имеет определение сахаролитических и протеолитических ферментов, активирующих, соответственно, расщепление углеводов и белков (Бехер К., 1961)-(de Barjak H., 1967).

Серология. Работа по серологической идентификации складывается из следующих этапов: получения антигена изучаемых и типовых культур, приготовление разведений антисывороток, проведение реакции агглютинации антигена антисывороткой соответствующего разведения.

Для изучения антигенного строения выделенных из природы кристаллообразующих бактерий были использованы специфические внутривидовые сыворотки, находящиеся в музее лаборатории патологии насекомых Института систематики и экологии животных СО РАН.

Жгутиковый Н-антиген типовых культур и выделенных аборигенных штаммов получали по методикам Баржак-Бонфуа (de Barjak H., 1967), Талалаевой, Покровской (Талалаева Г.Б., 1978) и Покровской (Покровская Л.А., 1982).

Оценка биологической эффективности.

Определение биологической эффективности штаммов проводили в лабораторных условиях. Каждый вариант опыта закладывали в 4 повторностях. В одной повторности – 10 экземпляров тест-насекомого (для лабораторных исследований).

3. Результаты исследований

В ходе настоящего исследования, нацеленного на сбор природных субстратов и поиск погибших насекомых с признаками бактериоза, нами были проведены маршрутные обследования ленточных боров Государственного лесного природного резерватов «Ертис орманы», расположенного в Павлодарской области, и «Семей орманы», находящегося в Абайской области. Также были обследованы участки лесного массива Буровое в Акмолинской области и лесные массивы восточного Казахстана.

В условиях Алматинской области были обследованы природные резерваты Иле Алатауского государственного национального парка, лесополосы Кегенского, Енбекшиказахского и Карасайского районов.

Всего нами было собрано 530 образцов, из них исследовано 498 образца: 277 природных субстратов (почва, опад листы, кора деревьев) и 221 погибших насекомых с признаками бактериоза.

В ходе данных маршрутных обследований были найдены погибшие гусеницы яблонной моли (*Hypomeuta malinella*), листоверток (*Tortricidae*), совок (*Noctuidae*), репной белянок (*Pieris rapae*) и др. предположительно с признаками бактериоза.

Выделенные изоляты по физиолого-биохимическим свойствам соответствовали *Bacillus thuringiensis*. По результатам серологической идентификации выделенные нами бактерии были отнесены к трем серотипам: 3a3b3c, подвида *Bt kurstaki*; H4ab – подвида *Bt sotto* и 31

серотип повида *Bt toguchini*.

Определение круга чувствительных насекомых-вредителей

Важным элементом при разработке биопрепаратов является определение круга чувствительных насекомых-вредителей к штаммам энтомопатогенной бактерий.

В связи с этим нами была проведена оценка биологической эффективности 30 штаммов бактерий на 8 видов вредителей из отряда чешуекрылых – *Hypomeuta malinella*, *Archips crataegana*, *Archips rosana*, *Erannis defoliaria*, *Operophtera brumata*, *Malacosoma neustria*, *Hypanthria cunea*, *Pieris brassicae*.

Наблюдения показали значительную вариабельность штаммов по признаку вирулентности. Восемь культур бактерии (k-Ym07/KOX, k-Ym07/CB, ОЗШ-07, k-Ym07/К, ЗПТ-07, ОЗШ-07/1, k-Ym07/ЗР1, k-Ym07/АК) проявили высокую биологическую активность в отношении гусениц яблонной моли. На пятые сутки после инокуляции уровень смертности гусениц для этих штаммов достиг 90-100%. По итоговому уровню смертности и скорости гибели хозяина лучшими в данной выборке культур являются k-Ym07/KOX, k-Pr07, k-Ym07/CB, k-Ym07/К, k-Ym07/АК. Для данных штаммов уже на четвертые сутки после заражения погибло от 90 до 97,5% зараженных особей. Оставшиеся культуры на четвертые сутки показали меньшую биологическую активность (до 90%).

Аналогичные эксперименты были проведены и в отношении гусениц американской белой бабочки. как и в экспериментах, поставленных ранее в отношении гусениц яблонной моли, так и в данных опытах не все штаммы достигли высоких результатов. Штаммы 4Cr-06, k-Ym07/ЗР, Кж-07, Кж-07/1, ЧМ-07, ЧМ-07/1, k-Ym07/ЗР, ЧМ-07/4, СШ-1/07, и k-Ym07/ЗР-3 оказались низковирулентными и в отношении гусениц АББ. 100%-ю гибель при заражении титром 1×10^7 спор / мл на пятые сутки показали штаммы k-Pr07, k-Ym07/КБ и эталонный штамм-продуцент

отечественного препарата Ақ көбелек, с.п. 2127-3к. По итоговому уровню смертности и скорости гибели хозяина, лучшим в данной выборке культур является k-Ym07/КБ, уже на 4-е сутки смертность достигла 100%. Вирулентность остальных штаммов достигла более 70%.

Штаммы бактерии *Vt* к гусеницам американской белой бабочки оказались менее вирулентны. Так, при заражении вредителя всего пять культур (k-Ym07/КОХ, ХС-07р, k-Pr07, k-Ym07/КБ, k-Ym07/ЗР) из тридцати проявили высокую биологическую активность (90-100%). Количество средневирulentных штаммов составило 40% и слабовирulentных 43,3%.

Лидерами по биологической активности против гусениц боярышниковой листовёртки и садовой пяденицы оказались штаммы k-Ym07/КОХ, k-Pr07, k-Ym07/КБ. Гибель гусениц составила 85, 92 и 95%, соответственно.

Из всех штаммов максимальную биологическую активность против вредителей из отряда чешуекрылых показали 2 штамма из коллекции – k-Ym07/КБ и 2127-3к (эталон).

4. Дискуссия

Изучение потенциала использования и механизмов действия штаммов *Vt*, поиск и описание свойств вновь выделяемых изолятов как возможных агентов в биоконтроле вредителей и болезней растений остаются крайне актуальными. Полученные нами результаты указывают на перспективность штамма k-Ym07/КБ в качестве продуцента биопрепарата против вредителей чешуекрылых. Таким образом, наши исследования в очередной раз подтверждают, что энтомопатогенные кристаллообразующие бациллы *Bacillus thuringiensis* встречаются в почве, листьях, больших насекомых и их трупах, в местах обитания насекомых. Идентификация и биотестирование показали, что выделенные нами изоляты, относящиеся к серовариантам *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, по биологическим свойствам

и практической значимости близки к типовым штаммам данного подвида. Очевидно, что с помощью аналитической селекции, подбора питательных сред и режимов культивирования можно усилить практически ценные свойства этих изолятов и с успехом использовать их в качестве продуцентов биопрепаратов для контроля численности вредных насекомых. Микробные препараты могут составить конкуренцию химическим пестицидам не только с точки зрения экологической безопасности, но и по экономическим показателям, учитывая защитный эффект против вредителей и болезней.

5. Выводы

Полученные материалы свидетельствуют о том, что среди выделенных и изученных штаммов *B. thuringiensis* 86,6% были отнесены к *B. thuringiensis* *kurstaki* (3a3b3c) и большинство из них по своей инсектицидной активности по отношению к некоторым вредителям из отряда чешуекрылых (*Hurometeuta malinella*, *Archips crataegana*, *Archips rosana* и др.) оказались достаточно высокоэффективными. Таким образом у большего количества штаммов одного серотипа определены важные показатели для создания биоинсектицидов. Так нами после проведенного скрининга в отношении 8 видов чешуекрылых для дальнейшей работы был отобран 1 штамм (k-Ym07/КБ).

6. Благодарности

Исследования выполнены в рамках грантового финансирования КОКНВО МНВО РК ИРН АР14871184 «Создание отечественного биоинсектицида на основе бактерии *Bacillus thuringiensis* для контроля чешуекрылых вредителей в условиях Казахстана».

7. Использование литературы

1. Монастырский О.А. Состояние и перспективы развития биологической защиты растений в России. Защита и карантин растений, 2008, №12, С. 41-44

2. Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка В.Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. СПб-Пу

3. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2020) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol*:107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>

4. Belousova M.E., Dolzhenko T.V. Vozmozhnost' kristalloobrazovaniya razlichny'mi shtammami *Bacillus thuringiensis* // *Izvestiya SPbGAU*. – 2017. – №4(49). – S. 46-51.

5. Бехер К. Микробиология. 1961. Т. 30. –С. 673-678

6. Лабинская А.С. Практикум по микробиологическим методам исследования. Москва, 1978.

7. de Barjak H., Bonnefoi A. Classification des souches de *Bacillus thuringiensis* // *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1967, 204, –P.1811

8. Талалаева Г.Б., Покровская Л.А. Некоторые методические особенности изучения серологических свойств бактерий *Bacillus thuringiensis* // *Микроорганизмы в защите растений от вредных насекомых*. – Иркутск, 1978. –С.51-60.

9. Покровская Л.А. Агглютинобильность Н и О-антисывороток к типовым штаммам *Bacillus thuringiensis* при длительном их хранении // *Энтомопатогенные микроорганизмы и их применение в сельском и лесном хозяйстве* // Сб. научных трудов. –Иркутск, 1982. –С. 103-114.

e-mail: bduisembekov@mail.ru,
adilhan_ainura@mail.ru

ц