

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

Дніпропетровський національний університет імені О. Гончара,
просп. Гагарина, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

СУМІСНА ДІЯ ШТАМІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ І ГРИБІВ

*Із загиблих личинок та імаго колорадських жуків виділено штами ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* і грибів *Beauveria bassiana*. Показано, що сумісне застосування цих мікроорганізмів значно розширює спектр їхньої інсектицидної дії. Отримані результати вказують на можливість використання досліджених штамів для розробки комплексного мікробного препарату для захисту рослин від шкідливих комах та кліщів.*

*Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, комплексне застосування, інсектицидна дія.*

Серед ентомопатогенних мікроорганізмів найбільш перспективними для розробки біоінсектицидів вважаються бактерії *Bacillus thuringiensis*. Проте недостатком біопрепаратів на їх основі є вузький спектр дії, що пов'язано з продукцією бактеріями кристалічних білків, високоспецифічних по відношенню до певних видів комах [4, 5]. Розширити спектр дії препаратів можна за рахунок комплексного використання *B. thuringiensis* з іншими ентомопатогенами. Серед них особливо виділяються мускардинні гриби *Beauveria bassiana*, здатні уражати комах на всіх стадіях розвитку та проявляти виражену післядію на популяції шкідників. Але ці гриби, порівняно з бактеріями, в меншій мірі гальмують трофічну активність шкідників [1]. Вищесказане свідчить про доцільність розробки комплексних препаратів на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* та грибів *B. bassiana*.

Метою даної роботи було виділення високоактивних штамів ентомопатогенних бактерій і грибів із природних джерел та дослідження можливості їх сумісного застосування для захисту рослин.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження служили штами ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* та грибів *B. bassiana*, виділені із загиблих колорадських жуків. Інсектицидну активність визначали в лабораторних умовах при зараженні личинок II-III віку комах шкідників (колорадського жука, листокрутки всеїдної, американського білого метелика, горностаєвої плодової молі) методом вільного поїдання корму, зволоженого суспензією спор та кристалів ендотоксину *B. thuringiensis* чи бластоспор *B. bassiana* (титр суспензії 1×10^8 спор/мл). Корм для контрольних комах зволожували водою. Інсектицидну активність визначали за відсотком загибелі комах на 2–10 добу.



В дослідіах по сумісному зараженню комах загальна концентрація ендоспор і кристалів *B. thuringiensis* та бластоспор *B. bassiana* в суспензії, якою обробляли корм, складала 1×10^7 в одному мілілітрі (співвідношення 1:1). Одночасно проводили зараження кожним із компонентів бактеріально-грибного комплексу в тій же концентрації. Комплексну дію *B. thuringiensis* та *B. bassiana* проти шкідників рослин захищеного ґрунту вивчали у мікровегетаційних дослідіах на личинках II-III віку тютюнового трипса та особинах різного віку звичайного павутинного кліща. Загальна концентрація ендоспор, кристалів ендотоксину *B. thuringiensis* та бластоспор *B. bassiana* складала 1×10^8 в одному мілілітрі (співвідношення 1:1). Розрахунок проводили за формулою: $M=100 \times (1-K_1/K_2 \times P_2/P_1)$, де M — смертність, %; K_1, K_2 — кількість живих особин до і після обробки в контролі; P_1, P_2 — кількість живих особин до і після обробки в досліді [3].

Результати та їх обговорення

Із загиблих личинок та імаго колорадських жуків було виділено чисті культури грампозитивних споро- та кристалоутворювальних бактерій, ідентифікованих як *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* та грибів, які були віднесені до виду *Beauveria bassiana*. Для перевірки вірулентності отриманих культур бактерій проведено зараження личинок колорадських жуків у лабораторних умовах. Відібрано 3 найбільш активних штами і перевірена їхня інсектицидна активність по відношенню до листокрутки всеїдної — представника ряду Лускокрилих комах та колорадського жука — представника ряду жорсткокрилих (табл. 1).

Таблиця 1

Інсектицидна активність штамів *B. thuringiensis* (n = 5)

Table 1

Insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains (n = 5)

Штам	Загибель комах, %			
	Колорадський жук		Листокрутка всеїдна	
	4 доба	7 доба	4 доба	7 доба
<i>B-1</i>	46,6 + 3,0	62,7 + 3,4	25,0 + 3,2	35,0 + 1,7
<i>B-2</i>	61,3 + 2,5	86,7 + 2,1	33,3 + 2,7	51,6 + 3,2
<i>B-3</i>	57,3 + 4,0	78,7 + 2,5	11,7 + 1,7	30,0 + 4,3
Контроль	0	4,0 + 1,6	0	6,7 + 2,7

Найбільшу інсектицидну активність до колорадського жука виявив штам *B. thuringiensis* B-2, який також показав помірну активність проти листокрутки всеїдної. Порівнюючи інсектицидну активність виділених штамів бактерій з наведеними в літературі даними [2] слід зазначити, що рівень інсектицидності досліджених штамів достатньо високий, щоб вважати їх перспективними для розробки біоінсектицидного препарату. Значною перевагою виділених штамів, особливо штаму *B. thuringiensis* B-2 є те, що він виявився активним по відношенню до представників двох рядів комах — Жорсткокрилих та Лускокрилих, що зустрічається не часто. Серед більшості природних ізолятів *B. thuringiensis* переважають специфічні до певного ряду шкідників [4]. Для подальшої роботи було відібрано штам *B. thuringiensis* B-2, проведено мутагенез із застосуванням УФ-опромінення та отримано мутантний штам



B-10, який давав 97 % загибель листокрутки всеїдної, не знижуючи активність проти колорадського жука.

Інсектицидну активність 12-ти виділених штамів *B. bassiana* вивчали по відношенню до личинок листокрутки всеїдної. Комахи були високочутливими до всіх виділених культур. Загибель гусені складала 6,7 – 36,7 % на 2 добу, 96,7 – 100 % на 5 добу. Оскільки усі штами були високоактивними по відношенню до досліджуваних комах, відбір продуценту проводили за технологічними характеристиками. Для подальших досліджень відібрано штам *B. bassiana* F-6, проростання конідій якого відбувалося на 2 добу, початок споруутворення відмічався на 5 добу, масове утворення конідій закінчувалося на 21 добу. При культивуванні у глибинних умовах культура утворювала значну кількість бластоспор ($1,5\text{--}4,0 \times 10^8$ спор/мл) на 3 – 5 добу.

З метою отримання комплексного біоінсектицидного препарату, ефективного проти широкого кола шкідників, досліджувався вплив бактеріально-грибного комплексу на личинок колорадського жука, американського білого метелика, листокрутки всеїдної, горностаєвої плодової молі. Виявилось, що *B. thuringiensis* та *B. bassiana* можуть підсилювати дію один одного (табл. 2).

Таблиця 2

Комплексна інсектицидна дія *B. thuringiensis* B-10 та *B. bassiana* F-6

Table 2

Combined insecticidal action of *B. thuringiensis* B-10 and *B. bassiana* F-6

Ентомопатогени	Загибель личинок, %			
	Колорадський жук (7 доба)	Американський білий метелик (10 доба)	Листокрутка всеїдна (4 доба)	Горностаєва плодова міль (6 доба)
<i>B. thuringiensis</i>	66,7 + 2,1*	40,0 + 2,7*	92,0 + 0,7	92,8 + 2,7
<i>B. bassiana</i>	64,0 + 1,6*	67,0 + 3,4	68,0 + 3,3*	26,4 + 2,0*
Комплекс <i>B. thuringiensis</i> та <i>B. bassiana</i>	77,3 + 1,6	69,0 + 2,9	93,3 + 2,1	93,6 + 2,7
Контрольні комахи	5,3 + 1,3	7,0 + 2,0	6,7 + 0,6	7,2 + 1,5

Примітка: *- $P < 0,05$ достовірно в порівнянні з комплексом патогенів, $n = 5$.

Note: * – $P < 0,05$ statistically significant in comparison with complex of pathogens, $n = 5$.

Смертність личинок колорадського жука при сумісній дії патогенів (77,3 %) перевищувала смертність, отриману при обробці кожним з компонентів комплексу (66,7 та 64,0 % для *B. thuringiensis* та *B. bassiana*, відповідно). Наші результати узгоджуються з повідомленням С. В. Гораль про високу ефективність комбінованого застосування боверіну з препаратами на основі *B. thuringiensis* (бітоксисабациліном та новодором) проти колорадського жука [1]. При сумісному зараженні *B. thuringiensis* та *B. bassiana* листокрутки всеїдної, американського білого метелика та горностаєвої плодової молі спостерігалось продуктивне співіснування ентомопатогенів, явного пригнічення дії один одного не відмічалось. Американський білий метелик був більш чутливим до *B. bassiana*, а листокрутка всеїдна та горностаєва плодова міль – до *B. thuringiensis*. Суміш мікроорганізмів призводила до отримання того ж результату, що і при зараженні більш сильним із двох патогенів.



Дослідження інсектицидної дії *B. thuringiensis* та *B. bassiana* проти шкідників закритого ґрунту показало, високу ефективність *B. thuringiensis* до павутинного кліща та низьку до трипсу (табл. 3). Згубна дія *B. bassiana* на обох шкідників була високою і приблизно однаковою (близько 71 % смертності). При сумісному застосуванні бактерії та гриби не пригнічували дію один одного (90,2 % загибелі павутинного кліща і 72,2 % – тютюнового трипса).

Таблиця 3

Комплексна дія *B. thuringiensis* B-10 та *B. bassiana* F-6 проти шкідників захищеного ґрунту

Table 3

Combined action of *B. thuringiensis* B-10 and *B. bassiana* F-6 against greenhouse pests

Ентомопатогени	Смертність, %	
	Павутинний кліщ	Тютюновий трипс
<i>B. thuringiensis</i>	91,2 ± 1,0	39,9 ± 1,9*
<i>B. bassiana</i>	70,7 ± 1,6*	71,1 ± 3,0
Комплекс <i>B. thuringiensis</i> та <i>B. bassiana</i>	90,2 ± 1,8	72,2 ± 4,0

Примітка: * P<0,05 достовірно в порівнянні з комплексом патогенів, n = 5.

Note: * P<0,05 statistically significant in comparison with complex of pathogens, n = 5.

Підводячи підсумки випробувань, можна узагальнити, що суміш *B. thuringiensis* та *B. bassiana* є високоефективною по відношенню до всіх 6 досліджених видів шкідників, тоді як кожен з компонентів суміші ефективно вражав меншу кількість шкідників: *B. bassiana* була високоактивною до двох, а *B. thuringiensis* – до трьох видів шкідників (рис.1).

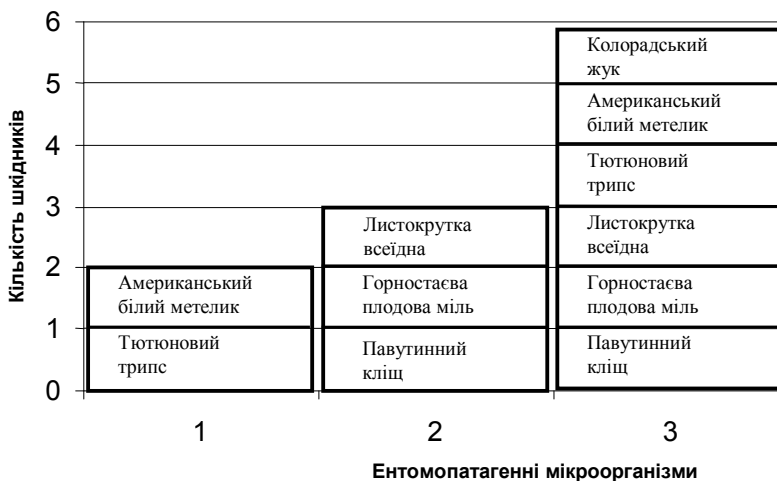


Рис. 1. Шкідники, які найбільш чутливі до дії *B. bassiana* F-6 (1) *B. thuringiensis* B-10 (2) та суміші цих мікроорганізмів (3).

Fig.1. Pests mostly susceptible to *B. bassiana* F-6 (1) *B. thuringiensis* B-10 (2), and their mixture

Таким чином, проведені дослідження показали, що сумісне застосування *B. thuringiensis* B-10 і *B. bassiana* F-6 дозволяє розширити спектр інсектицидної дії цих мікроорганізмів за рахунок поєднання декількох інсектицидних факторів цих патогенів, що дає підставу виділені та досліджені штами використати як основу для розробки комплексного мікробіологічного препарату для захисту рослин від шкідливих комах та кліщів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гораль С. В. Обґрунтування прийомів оптимізації малотоннажної технології виробництва грибних і бактеріальних засобів захисту рослин: Автореф. дис. канд. с.-г. наук. К., 1998. — 17 с.
2. Патыка Т. И., Татарин Л. Н., Кузнецова Л. Н., Шерстобоева Е. В., Патыка В. Ф. О технологичности высокоактивных штаммов *Bacillus thuringiensis* как основы для производства битоксибациллина // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. — 1999. — № 4. — С. 33 — 35.
3. Патыка Т.И., Машко Н. О., Надкерничний С. П. Біологічний контроль колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*) на посівах картоплі // Агроекологічний журнал. — 2003. — № 2. — С. 61 — 64.
4. Kaur S. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides // World Journal of microbiology and Biotechnology. — 2000. — № 16. — P. 781 — 793.
5. Navon A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection — reality and prospects // Crop Protection. — 2000.- Vol. 19. P.— 669 — 676.

УДК 632.937.1:663.18

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

Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ

Реферат

Из погибших личинок и имаго колорадских жуков выделены штаммы энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* и грибов *Beauveria bassiana*. Показано, что совместное использование этих микроорганизмов значительно расширяет спектр их инсектицидного действия. Полученные результаты указывают на возможность использования исследуемых штаммов для разработки комплексного микробного препарата для защиты растений от вредных насекомых и клещей.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, комплексное применение, инсектицидное действие.



УДК 632.937.1:663.18

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

O. Gonchar Dnipropetrovsk National University, Gagaryna Pr., 72,
Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

COMBINED ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIAL AND FUNGAL STRAINS

Summary

Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* bacteria and *Beauveria bassiana* fungi have been isolated from the dead Colorado potato beetle larvae and adults. It has been shown the combined using of these microorganisms widen the spectrum of their insecticidal effect. The obtained results suggest the possibility of using the investigated strains for the development of a complex microbial bioinsecticide to protect the plants against the insect pests and mites.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, combined using, insecticidal influence.

