

**В.О. Іваниця, Н.М. Непомяща, С.П. Ужевська, О.С. Багаєва,
Т.М. Кривицька, Н.С. Бобрешова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: grass_snake@ukr.net

МЕТОДИ ОЦІНКИ ЕНТОМОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ЩОДО ЛИЧИНОК ГРИБНОГО КОМАРИКА (*SCIARIDAE*)

*Описано методи експрес-оцінки ентомоцидної дії та оцінки метатоксичної дії бактеріальних препаратів щодо грибного комарика (*Sciaridae*) – основного шкідника їстівних грибів (гливи та печериць) та постановки пілотних і виробничих випробувань. Показано доцільність їх використання для відбору активних штамів, а також розробки та визначення ефективності ентомопатогенних мікробних препаратів для захисту їстівних грибів як у лабораторних так і виробничих умовах.*

*Ключові слова: ентомоцидна активність, бактерійні препарати, грибний комарик *Bradisia pilisriata*, метод.*

В сучасному агропромисловому комплексі України зростає виробництво їстівних грибів у першу чергу гливи та печериць. У зв'язку з цим зростає актуальність боротьби з комахами-шкідниками грибів та виробництва екологічно чистих продуктів харчування. Основну шкоду врожаю їстівних грибів наносять представники двокрилих комах грибні комарика *Bradisia pilisriata* Frey., які також завдають шкоди рослинам закритого ґрунту (овочам, декоративним рослинам тощо) [1]. У практиці сільського господарства для боротьби з комахами-шкідниками широкого застосування набули ентомопатогенні мікроорганізми.

Для пошуку та розробки активних штамів необхідна розробка методики визначення інсектицидної активності мікроорганізмів та мікробних препаратів проти грибних комариків [2, 3], що і було метою цієї роботи.

В основу розробленої методики було взято рекомендації щодо вивчення шкідників сільськогосподарських рослин [3, 4, 5]. Методика визначення інсектицидної активності мікроорганізмів та мікробних препаратів проти грибних комариків складається з декількох етапів: підготовка комах, підготовка бактерій та препарату, підготовка поживного субстрату для комах, постановка експерименту, аналіз результатів.



Матеріали і методи

Підготовка тест-культури грибного комарика.

Модельним об'єктом методик є грибний комарик (рис. 1) найбільш поширений представник родини Sciaridae (*Bradisia pilisriata* Frey.), для якого добре вивчено цикл розвитку.



Рис. 1. Грибний комарик (*Bradisia pilisriata* Frey.)
а) – самець, б) – самка.

Fig. 1. Fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.)
а) – male, б) – female.

Розвиток личинки грибного комарика (рис. 2.) триває 8–12 діб, лялечки – 4–7 діб. Цикл індивідуального розвитку за температури 18–25 °С становить 19–27 діб. Самиця комахи відкладає до 50 яєць. Живляться личинки переважно міцелієм та загниваючими рештками субстрату [6].

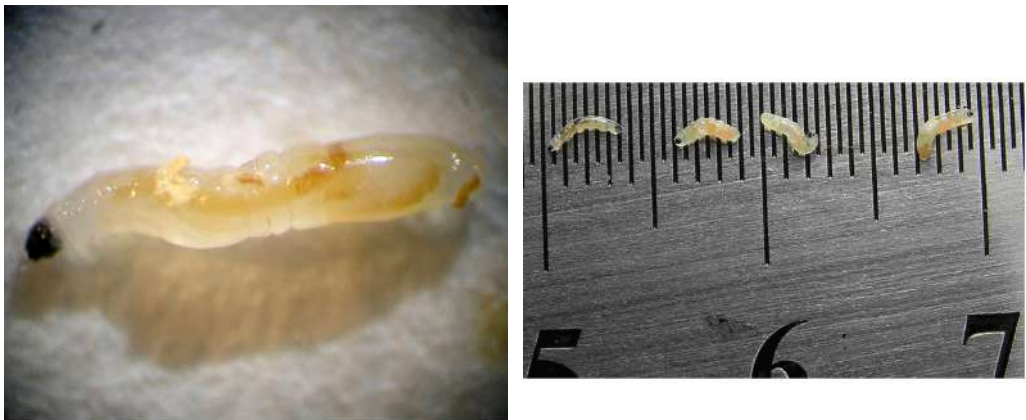


Рис. 2. Личинки грибного комарика (*Bradisia pilisriata* Frey.)
Fig. 2. Fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.) larvae

Грибні комарики потрапляють у приміщення для культивування грибів у стадії імаго. Яйця відкладають у прорізи в блоках. Після виходу через 7–8 діб личинки проникають в верхні шари субстрату з пророслим міцелієм і завдають суттєвої шкоди гливі (рис. 3.), печерицям, аурикулярії, а на початку обростання субстрату міцелієм можуть шкодити шийткам та ганодермі.



Рис. 3. Ушкодження міцелію личинками грибного комарика виробничого блоку з субстратом для вирощування гливи

Fig. 3. The damage of mycelium made by fungous midge larvae from the production block with the substrate for pleurotus cultivation

Грибних комариків збирають та постійно вирощують в інсектарії на субстраті з міцелієм гливи (рис. 4).



Рис. 4. Культура грибного комарика (*Bradisia pilisriata* Frey.)

Fig. 4. The culture of fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.)

Личинок грибних комариків відбирають препарувальною голкою або пензликом на шматок вологого фільтрувального паперу, який переносять потім в підготовлені заздалегідь для проведення випробування склянки з міцелієм гливи.

Підготовка поживного субстрату для комах

Для культивування комах використовують зерновий міцелій гливи *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm, який вирощують за загальною методикою і надають у продаж [7]. Блок в стерильних умовах фасують в малі пакети, закривають і зберігають при температурі 4–5 °С у холодильнику. За потреби відбирають необхідну кількість міцелію для дослідів.

Підготовка бактерій і препарату

Для випробування дії мікробних препаратів проти личинок грибних комариків мікробні препарати готують у вигляді бактеріальної суспензії, отриманої шляхом змиву з МПА біомаси бактерій стерильною водою (вік мікробної культури — 7–10 діб) або використовують рідкі препарати отримані при культивуванні бактерій на рідких поживних середовищах в колбах чи в біореакторах. Перед проведенням випробувань визначають концентрацію мікробних клітин та спор традиційними методами [8]. Суспензію бактеріальних клітин доводять стерильною водою до кінцевої концентрації не менше $2 \cdot 10^9$ мікробних клітин та $n \cdot 10^7$ – 10^8 спор [9, 10, 11]. Сухі бактерійні препарати розчиняють у стерильній воді і доводять до вказаної вище концентрації.

Скринінг-метод лабораторних випробувань

Базуючись на загальних рекомендаціях [4] і проведених попередніх дослідженнях пропонується скринінг-метод визначення ентомоцидної дії мікроорганізмів при роботах з масового відбору активних ентомопатогенних штамів.

Досліди проводять в чашках Петрі, в яких попередньо вирощено міцелій з 10–15 зерняток інокульованих гливою та розміщених на зволоженому фільтрувальному папері (рис. 5). Субстрат дослідного варіанту обробляють підготовленою суспензією бактерій з розрахунку 1 мл на чашку способом дрібнодисперсного розпилювання. Контрольний варіант обробляють стерильною водою з такого ж розрахунку.

У кожному чашку на міцелій гливи поміщають по 10–20 личинок II і III віків. Препарат потрапляє у кишечник личинок при поїданні субстрату. Оптимальними умовами для випробування є температура 20 ± 1 °С та відносна вологість повітря 80–90%. Кількість повторів — не менше трьох. Ларвіцидну дію бактерій визначають на третю добу. Для порівняння ларвіцидної активності різних штамів бактерій та визначення ентомоцидної активності підраховують відсоток смертності личинок в дослідних та контрольних варіантах. Розрахунки здійснюють за формулою Еббота: $E = (A - B / 100 - B) \cdot 100\%$, де А — відсоток смертності в досліді; В — відсоток смертності в контролі; Е — ефективність дії препарату в % (з поправкою на контроль) [4].



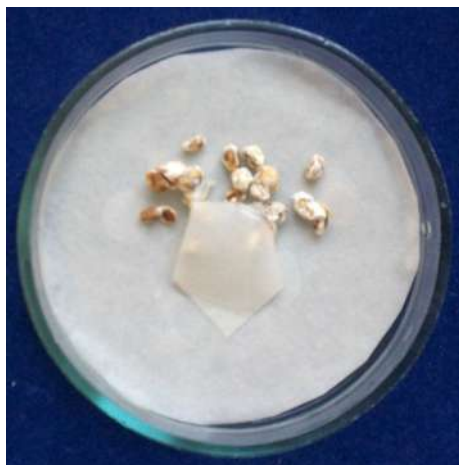


Рис. 5. Зерна пшениці, що обросли міцелієм гливи, нанесені на зволожений фільтрувальний папір у чашці Петрі

Fig. 5. Wheat grains with pleurotus mycelium on wet filter paper in Petri dish

Лабораторний метод визначення метатоксичної дії препаратів

Для визначення віддалених наслідків дії препарату (метатоксичної дії) під час розробки та дослідження нових препаратів підраховується кількість особин, що закінчили свій розвиток, тобто кількість імаго, які з'являються через 7–14 діб. Це потребує більших ємкостей та кількості субстрату, тому випробування проводять в ємкостях, де комахи будуть мати умови розвиватись з личинки до імаго, а досліднику в свою чергу буде досить легко зробити облік імаго (склянках місткістю 0,25–0,5 л). На дно ємкості розкладають целюлозний субстрат для вирощування гливи: шар фільтрувального паперу та бавовняної вати (рис. 6.).



Рис. 6. Ємкості для визначення метатоксичної дії бактеріальних препаратів проти грибних комариків

Fig. 6. The cans for determination of bacterial preparation metatoxic action against fungous midges

Після зволоження субстрату водою на нього рівномірно наносять приблизно 15–20 г зернового міцелію гливи. Склянки залишають для проростання міцелію на 1–2 доби при температурі 20 °С. Після утворення суцільного шару міцелію на поверхню субстрату з гливою в склянці аерозольним способом наносять приблизно 1 мл суспензії мікробного препарату (в контролі стерильної води). Після цього з тест-культури відбирають личинок грибних комариків II–III віків (20–30 екз.), поміщають на шматок вологого фільтрувального паперу та переносять в підготовлені дослідні чи контрольні склянки. Склянки покривають сіткою і ставлять до термостату (20 °С). Кількість повторів — не менше 3. Визначення метатоксичної дії препарату проводять через 2 тижні. Підраховують кількість отриманих імаго протягом тижня і проводять розрахунки ефективності дії за формулою Еббота як описано вище [4].

Метод пілотного випробування

Визначення ефективності використання мікробного препарату для знищення грибних комариків при вирощуванні гливи проводиться в камері (рис. 7), в якій штучно створюють високий інсектиційний фон шляхом внесення значної кількості імаго грибних комариків. Дослідження проводять на промислових грибних блоках з субстратом, засіяним міцелієм гливи.



Рис. 7. Камера (інсектарій) для проведення пілотних випробувань

Fig. 7. Camera (insectarium) for pilot tests

В промислових грибних блоках вагою 15 кг з субстратом роблять 15–16 технологічних прорізів для надходження повітря та утворення примордіїв. В дослідних варіантах обробляють грибні блоки мікробним препаратом, який перед обробкою ретельно перемішують. Мікробний препарат наносять у вигляді аерозолю переважно в надрізи, з розрахунку 1–2 мл на один проріз. На обробку грибного блока витрачається біля

20 мл мікробного препарату. В контрольних варіантах наносять на грибні блоки у такий же спосіб адекватну кількість води.

Після обробки мікробним препаратом на дно камери поміщають відкриту склянку з культурою комариків (біля 100 особин імаго). Температура повітря близько 20 ± 2 °С, відносна вологість — 70–90%. Кількість повторів (грибних блоків) — не менше 3.

Ефективність обробки визначають через 14, 28, 32 доби. Реєструють цілі та ушкоджені личинками грибних комариків надрізи у грибних блоках, де спостерігається оголення субстрату, зникає міцелій, не утворюються плодові тіла. Оцінку ушкодження грибних блоків в камері виставляють у балах за такою шкалою: 1 бал — ушкодження до 25% прорізів; 2 бали — ушкодження до 50% прорізів; 3 бали — ушкодження до 70% прорізів; 4 бали — ушкодження до 100% прорізів. Визначають площу субстрату, пошкодженого личинками (в технологічних прорізах). Як і в виробничих умовах для розрахунків ступеню ушкодження грибних блоків (У) використовують формулу Еббота [4]:

$$У = (a_1 \times b_1 + \dots + a_n \times b_n) / Н,$$

де а — кількість грибних блоків з відповідним балом пошкодження; б — відповідний пошкодженню бал; Н — загальна кількість ушкоджених грибних блоків.

Метод виробничого випробування

За схемою схожою з пілотними випробуваннями проводять обробку грибних блоків мікробним препаратом при випробуваннях у виробничих умовах, де визначається інсектицидність препаратів для усіх шкідників, що зустрічаються в блоках. У випробуваннях ефективності промислового застосування мікробних препаратів у грибівництві нами модифіковано методику [4, 5], що рекомендована для оцінки ефективності застосування ентомоцидних препаратів у рослинництві.

Випробування проводять в одному виробничому приміщенні. Дослідні блоки обробляються препаратом, контрольні водою. Обробку дрібнодисперсним обприскуванням препаратом проводять після обростання субстрату міцелієм, тобто приблизно через два тижні після встановлення блоків, одразу після здійснення прорізів у блоках. На одну обробку одного грибного блока використовують 30–40 мл мікробного препарату. Кількість повторів (грибних блоків) — не менше 10.

Для оцінки дієвості препарату здійснюють контроль чисельності личинкових стадій у субстраті (відбираються зразки із прорізів на блоках з глибини 3 см і площі 5·10 см² (5 блоків) [12] та літаючих особин імаго (на липких стрічках на 1 дм²/добу) [13]. Через два тижні рахують наявність оголень на блоках. Після збору першого врожаю визначають остаточну кількість оголень на блоках, рахують ступінь ушкодження в балах і визначають ефективність використання препарату [4]. Оцінка економічної ефективності застосування досліджуваного мікробного препарату проводиться з врахуванням врожайності гливи за весь час використання дослідних і контрольних блоків.



У роботі випробовувалися відомі виробничі штами ентомопатогенних мікроорганізмів *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23, *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313, *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючі інгредієнти препаратів) та штами отримані на кафедрі мікробіології і вірусології Одеського національного університету *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020. Досліджувані штами культивували на середовищах МПА та МПБ.

Результати та їх обговорення

Для демонстрації відпрацьованих протягом дворічних досліджень в лабораторних та виробничих умовах методик проведено оцінку ентомоцидної активності промислових штамів *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючі інгредієнти препаратів бактокуліциду та сфероларвіциду) та штамів *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020. Проведені дослідження показали (табл. 1), що промислові штами *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795, які активні проти кровосисних комарів, по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata* не виявили ларвіцидної активності.

Таблиця 1
Ларвіцидна активність штамів проти грибного комарика

Table 1
Strains' larvaecide effect against fungous midges

Штами	Смертність личинок, %	Ефективність, %
<i>B. thuringiensis var. israelensis</i> ВКМП В-3313	6,3 ± 2,4	3
<i>B. sphaericus</i> ВКМП В-3296	1,8 ± 1,6	0
<i>B. sphaericus</i> ВНДІСГМ В-1795	1,2 ± 1,1	0
<i>B. thuringiensis var. israelensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23	34,8 ± 6,9	29
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10019	78,0 ± 4,0	75
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10020	80,0 ± 4,2	77
<i>Bacillus sp. 3</i>	69,6 ± 3,4	67
<i>Bacillus sp. 6</i>	73,7 ± 4,3	71



Лише штам *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 показав ефективність на рівні 29%. Бактеріальні штами *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 через три доби показали високу (69,6–80,0%) ларвіцидну активність та 67–77% ефективності ентомоцидної дії проти грибного комарика (рис. 8).

Випробування методики експрес-оцінки ларвіцидної активності засобів регуляції чисельності сциарид показало, що за наявності тест-культури комариків отримати результати можливо через 3 доби при температурі 20 ± 1 °C.



Рис. 8. Личинки, що загинули від дії бактеріального препарату

Fig. 8. Died larvae as a result of the bacterial preparation effect

Метатоксичну дію визначали за описаною методикою при дослідженні отриманих нами штамів мікроорганізмів *Bacillus thuringiensis* ONU 10019 та *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 (табл. 2). Через три тижні спостережень досліджувані штами продемонстрували метатоксичну активність на рівні 84% та 85% загибелі комариків, відповідно. Ці штами показали стабільну дію проти *Bradysia pilistriata* протягом дворічних лабораторних випробувань.

Таблиця 2

Метатоксична дія ларвіцидних штамів *Bacillus* по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata*

Table 2

Metatoxic action of larvaecyde strains *Bacillus* to fungous midges *Bradysia pilistriata*

Штам	Загибель комариків, %
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10019	84,4 ± 3,1
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10020	85,7 ± 1,7
Контроль	8,6 ± 1,9

Виробничі випробування проведено в господарстві, що вирощує гливу (рис. 9) в пристосованих приміщеннях, де є вільний доступ для шкідливих комах. Обробка мікробним препаратом була проведена після обростання блоків міцелієм (через 2 тижні після встановлення блоків). В приміщенні за одну добу реєструвались імаго брадисії у кількості $4,2 \pm 1,6$ екз. на 100 см^2 липкої стрічки.



Рис. 9. Промислове вирощування гливи *Pleurotus ostreatus* в умовах фермерського господарства

Fig. 9. Production of *Pleurotus ostreatus* under farm condition

Після нанесення бактерійного препарату личинки в прорізах з'являлись, досягали I–II віків і гинули. Ступінь ушкодження в дослідному варіанті після обробки мікробним препаратом на основі *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 зареєстрована на рівні 1–2 балів. Через 21 добу в контролі показано розростання площі ушкодження міцелію більше, ніж в досліді на 25%. В блоках, оброблених препаратом, зареєстрована значна смертність личинок комариків. Результати випробувань через 21 добу представлені в табл. 3.

Через місяць після обробки проведено аналіз складу безхребетних в грибних блоках, який показав, що кількість личинок брадисії в контролі складала 8 екз/100 г повітряно-сухої ваги субстрату. В дослідних зразках личинки були відсутні. Плодові тіла на оброблених препаратом блоках не були ушкоджені личинками комариків. Зареєстровано збільшення урожайності грибів на 44,8–55,2%.

Таблиця 3

Ефективність виробничого використання ларвіцидного препарату на основі штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 для регуляції чисельності грибних комариків на гливі

Table 3

Efficiency of the production use of larvaecide preparation based on *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 strain for the regulation of fungous midges quantity on pleurotus

Варіант обробки грибних блоків	Ступінь ушкодження грибних блоків			Середній врожай з одного блоку, кг
	бали	%	Показник Еббота, бали	
Нанесення мікробного препарату на всю поверхню блоку	1-2	14	1,64	4,2 ± 0,7
Внесення мікробного препарату в прорізи на поверхню блоку	1-2	11	1,45	4,5 ± 0,8
Контроль (без обробки)	3-4	53	3,40	2,9 ± 0,8

Випробування бактеріальних препаратів має ряд особливостей, які залежать від їх форми. Препарати, що мають дієвим компонентом тільки кристали та токсини повинні наноситися у великій кількості і бути доступними для поїдання личинками, що не завжди можна здійснити (личинки на поверхні субстрату не перебувають, вони заглиблюються в субстрат на 2–3 см).

Отже проведені випробування запропонованих методик експрес-оцінки інсектицидної дії та оцінки метатоксичної дії бактеріальних препаратів на грибно-го комарика (брадисій) та постановка пілотних і виробничих випробувань показали доцільність їх використання для розробки та визначення ефективності біологічних препаратів як у лабораторних так і виробничих умовах.

Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (проекти ДБ 421 та М/64-2008).

ЛІТЕРАТУРА

1. Багаєва О.С., Ужєвська С.Ф., Кривицька Т.Н., Непом'яща Н.Н., Бобрєшова Н.С., Бєляєва Т.А., Багаєв А.К., Ракитська С.И., Іваниця В.А. Микробиологическая защита вешенки от личинок грибных комариков // Информационный бюллетень ВПРС МОББ, Киев: Колобiг, 2009. — № 39. — С. 12–16.



2. *Кандыбин Н.В.* Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. — М.: Агропромиздат, 1989. — 167 с.

3. *Прищепя Л. И., Кондратенко Т. П.* Методика выявления и учета фитофагов из отряда двукрылых (Сем. *Sciaridae*, *Psychodidae*, *Ephydriidae*): Методическое пособие. — Беларусь, Институт защиты растений, 2009. — 20 с.

4. *Методики* випробування і застосування пестицидів // С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун, О.О. Іващенко та ін. За ред. проф. С.О. Трибеля. — К.: Світ. — 2001. — 448 с.

5. *Дядечко М.П., Падій М.М.* Біологічний захист рослин. — Біла Церква, 2001. — 12 с.

6. *Непомяца Н.М., Ужєвська С.П.* Грибний комарик *Bradysia pilistriata* Frey (*Sciaridae*) — основний шкідник гливи на Одещині// Карантин і захист рослин. — 2010. — № 11. — С. 18–20.

7. *Основы* биотехнологии высших грибов: Учебное пособие./ Н.А. Заикина, А.Е. Коваленко, В.А. Галынкин, Ю.Т. Дьяков, А.Д. Тищенко. — СПб.: Проспект Науки, 2007. — 336 с.

8. *Руководство* к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. // Методы общей бактериологии. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 221 с.

9. *Гар К.А.* Методы испытания токсичности и эффективности инсектицидов. Ред Э.Э. Савдарг М: Изд сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов., 1963. — 288 с.

10. *Патогены* насекомых: структурные и функциональные аспекты/ Отв ред. Глухов В.В. — М.: Круглый год, 2001. — 736 с.

11. *Гиляров М.С., Стриганова Б.А.* Количественные методы в почвенной зоологии. — М.: Наука, 1987. — 288 с.

12. *Фурсов В.Н.* Как собирать насекомых-энтомофагов (сбор, содержание и выведение паразитических перепончатокрылых насекомых), Киев: Изд-во Логос, 2003. — Отд. Изд. № 1. — 66 с.



**В.А. Иваниця, Н.Н. Непом'яща, С.Ф. Ужєвская, О.С. Багаева,
Т.Н. Кривицькая, Н.С. Бобрєшова**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, тел.: +38(0482) 68 79 64,
e-mail: grass_snake@ukr.net

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭНТОМОЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛИЧИНОК ГРИБНЫХ КОМАРИКОВ (SCIARIDAE)

Реферат

Описано методики экспресс-оценки энтомоцидного воздействия и оценки метатоксического действия бактериальных препаратов на грибного комарика (*Sciaridae*) — основного вредителя съедобных грибов (вешенки и шампиньонов) и постановки пилотных и производственных испытаний. Показана целесообразность их применения для разработки и определения эффективности микробных препаратов как в лабораторных так и производственных условиях.

Ключевые слова: энтомоцидная активность, бактериальные препараты, грибной комарик *Bradisia pilisriata*, методика.

**V. Ivanytsia, N. Nepomiashcha, S. Uzhevskaya, O. Bagaeva,
T. Kryvytska, N. Bobreshova**

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: grass_snake@ukr.net

METHODS FOR THE STUDY OF MICROBIAL ENTOMOCIDE ACTIVITY AGAINST FUNGOUS MIDGE LARVAE (SCIARIDAE)

Summary

Express methods of entomocide effect estimation and methods for the evaluation of metatoxic effect of bacterial preparations against fungous midges (*Sciaridae*) — the main pest of edible mushrooms (pleurotus and champignons) — were described. Methods of pilot and industrial tests were elucidated. The expediency of their use in active strains selection and in development of entomopathogenic microbial preparations and estimation of their effectiveness was shown both under laboratory and production conditions.

Key words: entomocide activity, bacterial preparations, fungous midge *Bradisia pilisriata*, method.

