

Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужевська, Н.М. Непом'яща,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, e-mail: grass_snake@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* З ЛАРВІЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ ДО ГРИБНИХ КОМАРИКІВ *BRADYSIA PILISTRATA* FREY (SCIARIDAE)

Виділено 32 ізоляти спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* з джерел можливої дислокації ентомопатогенних бактерій. Ентомоцидна активність по відношенню до личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) була виявлена у 6 ізолятів *Bacillus* sp. Найбільша ларвіцидна активність відмічена у *Bacillus* sp. 14 та *Bacillus* sp. 15, які за своїми ознаками попередньо віднесені до виду *Bacillus thuringiensis*. Визначено їх морфологічні, культуральні та фізіолого-біологічні характеристики.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, ларвіцидна активність, грибний комарик.

При культивуванні грибів виникає проблема боротьби зі шкідниками — грибними комариками. Розвиток личинок міцетофагів, які пошкоджують міцелій та плодові тіла, призводить до суттєвої втрати врожаю, імаго є розповсюджувачами кліщів, цвілевих грибів, вірусів та бактерій, що викликають захворювання грибів. [1].

Відомо, що для знищення комах-шкідників використовуються мікробні препарати, діючою основою яких є ентомопатогенні бактерії роду *Bacillus* та продукти їх метаболізму. Позитивні риси таких препаратів — вибірковість дії проти комах-шкідників та безпечність для людини і довкілля [2, 3, 4]. Конкретних даних щодо використання мікробних препаратів для знищення шкідників грибів, ефективності дії біозасобів в грибівництві, впровадження ентомопатогенних біопрепаратів при вирощуванні грибів в наявних публікаціях нема [1]. Згідно літературних даних, для боротьби з грибними комариками може бути використано бактокулідид (біопрепарат на основі *Bacillus thuringiensis* var. *israilensis*), який призначено для боротьби з личинками кровосисних комарів. Аналогічну ларвіцидну дію на двокрилих комах, шкідників грибівництва, можна очікувати при вико-



ристанні інших відомих препаратів, призначених для знищення двокрилих комах, наприклад, сфероларвіциду (основа — *Bacillus sphaericus*) [2].

Метою роботи був пошук бактерій роду *Bacillus* з наявністю ентомопатогенної дії по відношенню до грибного комарика та вивчення біологічних властивостей найбільш активних штамів.

Матеріали і методи

В роботі використана культура грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) і розроблена раніше методика визначення ентомопатогенної активності бактерій по відношенню до личинок грибного комарика [5, 6].

Для визначення ларвіцидної активності використано виробничі штами, діючі інгредієнти біопрепаратів бактокуліциду (*B. thuringiensis* var. *israilensis* ВКМП В-3313, *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВНДІСГМ 7-1/23 та сфероларвіциду (*B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795). Штами отримано з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (Москва) та з ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург). В роботі також випробувано ларвіцидну активність препарату бактокуліциду серійного виробництва Бердського заводу.

Виділення ентомопатогенних штамів бактерій здійснено з відпрацьованого субстрату для вирощування гливи після зняття врожаю, кишечника загиблих личинок грибного комарика, нижньої частини гриба печериці разом із субстратом. Виділення бактеріальних ізолятів з вказаних джерел проведено методом безпосереднього виділення та накопичувальної культури на середовищах: МПА, МПБ, агаризований грибний бульйон (ГА) (табл. 2).

Інкубацію здійснено за 30 °С. З виділених культур готували бактеріальні суспензії щільності на рівні $1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$ кл / мл, якими оброблялися личинки грибного комарика *Bradysia pilistriata* та субстрат для вирощування грибів. Морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки штамів визначали за допомогою стандартних методів [7–11]. Після виділення чистих культур та визначення ступеня їх ентомоцидної активності проводили ідентифікацію штамів згідно визначника Бергі [9].

Личинок грибного комарика по 30 одиниць разом із субстратом для вирощування грибів поміщали у склянку (0,5 л, повторність 3-кратна) та інкубували у термостаті при температурі 25 ± 2 °С. Дослідження та оцінку ентомоцидної дії виділених штамів проводили з першої доби після зараження до трьох тижнів після початку досліду. Результати обробляли з використанням формули Еббота: $E = (A - B / 100 - B) \cdot 100\%$, де А — відсоток смертності в досліді; В — відсоток смертності в контролі; Е — ефективність дії штаму мікроорганізмів чи мікробного препарату в % (з поправкою на контроль) [12]. Отримані результати оброблені статистично [13].

Результати досліджень та їх обговорення

В попередніх дослідженнях встановлено, що в грибівницьких господарствах на Одещині, що культивують гливу, найпоширенішим шкідником є грибний комарик *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) [5, 6].

Результати виявлення ларвіцидної дії на личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* порошкового препарату бактокуліциду та виробничих штамів *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВНДІСГМ 7-1/23, *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючих інгредієнтів бакпрепаратів бактокуліциду та сфероларвіциду) показали їх неефективність, статистично достовірних розходжень в контролі і в дослідних зразках по показнику смертності не виявлено (табл. 1).

Такий низький рівень ентомопатогенної дії ініціював до пошуку ларвіцидних штамів з різних джерел та на різних середовищах. У результаті пошуку нами відібрано 32 штами, які за своїми ознаками віднесені до роду *Bacillus* (табл. 2).

Таблиця 1

Ларвіцидна дія виробничих штамів роду *Bacillus*, продуцентів бактокуліциду та сфероларвіциду, на грибного комарика *Bradysia pilistriata* (експозиція 120 год.)

Table 1

Larvaecyde action of industrial strains of genus *Bacillus*, derivative of bactoculicyde and spherolarvaecyde on a fungus midge *Bradysia pilistriata* (display 120 h)

Виробничі штами	Смертність личинок, %
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israilensis</i> ВКМП В-3313	2,2±1,1
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israilensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23	3,2±0,7
<i>B. sphaericus</i> ВКМП В-3296	1,8±0,5
<i>B. sphaericus</i> ВНДІСГМ В-1795	2,0±0,3
Контроль	1,8±0,7

Проведені дослідження дозволили визначити 6 найбільш активних штамів (*Bacillus* sp. 3, 5, 6, 11, 14, 15) по відношенню до личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* (табл. 3). Ларвіцидна дія досліджуваних ізолятів бактеріальних культур по відношенню до *Bradysia pilistriata* обраховувалась після 22- та 36- годинної експозиції. На 22 годину смертність тест-об'єкту була на рівні від 3,0% для ізоляту *Bacillus* sp. 6, до 56,7% для ізоляту *Bacillus* sp. 3. Після 36-годинної експозиції для всіх ізолятів, крім *Bacillus* sp. 6, реєструвалась 100% загибель грибного комарика *Bradysia pilistriata*. Для *Bacillus* sp. 6 смертність та ефективність дії складала 91,0% та 90,3%, відповідно. Подальші дослідження показали,



що штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 мали пролонговану інсектицидну дію, яка виявлялась як на стадії личинок, так і на стадії лялечок, тобто мали найбільшу метатоксичну ентомоцидну дію.

Результати досліджень культуральних та морфологічних ознак наведені у табл. 4. При рості на МПА штами, що досліджували, утворювали ендоспори. Реакція на каталазний тест була позитивною. Ці ознаки дають змогу віднести ці штами до роду *Bacillus*.

Таблиця 2
Джерела, середовища та способи виділення штамів роду *Bacillus*

Table 2
The sources, environments and methods of strains selection of the genus *Bacillus*

Джерело виділення	Середовище та спосіб виділення	Кількість штамів	№№ ізолятів
Відпрацьований субстрат для вирощування грибів гливи	МПА, МПБ, ГА	2	1, 2
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	1	3
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату, грибний відвар + 0,5% дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	1	4
Кишечник личинки комарика	МПА, МПБ, ГА	2	5, 6
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	3	7, 8, 9
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату, грибний відвар + 5% дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	4	10, 11, 12, 13
Нижня частина ніжки печериць з субстратом	МПА, МПБ, ГА	6	14, 15, 16, 17, 18, 19
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	6	20, 21, 22, 23, 24, 25
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + грибний відвар + дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	7	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32

Бактерії роду *Bacillus* відповідно морфолого-культуральним та фізіолого-біохімічним ознакам об'єднані у дві групи [11]. Штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 утворювали спори еліпсоподібної форми з центральним розташуванням спор усередині клітин; розміри спори не перевищують розміри клітини, які не збільшені, тобто досліджувані культури відносяться до бактерій I групи.

Таблиця 3

Ларвіцидна дія ізольованих бактеріальних штамів на *Bradysia pilistriata*

Table 3

Larvaecyde action of the isolated bacterial strains on *Bradysia pilistriata*

Штам	22 год.		36 год.	
	Смертність личинок, %	Ефективність дії штаму, %	Смертність личинок, %	Ефективність дії штаму, %
<i>Bacillus sp. 3</i>	56,7+4,0	56,7+4,0	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 5</i>	44,8+3,9	44,8+3,9	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 6</i>	3,0+2,2	3,0+2,2	91,0+8,9	90,3+9,4
<i>Bacillus sp. 11</i>	15,0+3,9	15,0+3,9	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 14</i>	6,0+3,3	6,0+3,3	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 15</i>	26,0+4,2	26,0+3,3	100,0	100,0
Контроль	0	-	7,5+2,5	-

На МПА штами швидко ростуть та утворюють спори через 12–15 годин; спостерігалось утворення колоній з поверхнею R-форми. На МПБ спостерігався рівномірний ріст по всьому об'єму середовища без утворення плівки. Штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 утворюють великі клітини завширшки більше 1 мкм, що забарвлюються за Грамом позитивно, рухливі, капсул не утворюють.

Основні фізіолого-біохімічні властивості ізольованих штамів *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 вивчали згідно визначника Бергі [9] у порівнянні з штамом *Bacillus thuringiensis* ВНДСГМ 7-1/23 (табл. 5). Досліджувані штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 є гетеротрофними мікроорганізмами. Як джерело вуглецю і енергії вони використовують пептон, глюкозу, сорбіт, цитрат натрію, дріжджовий екстракт, ростуть на МПА та МПБ.



Таблиця 4
Культурально-морфологічні ознаки ізолюваних і промислового штамів *Bacillus*Table 4
Cultivated and morphological signs of isolated and industrial strains of *Bacillus*

Ознаки	Ізолювані штами		Промисловий штам
	<i>Bacillus sp. 15</i>	<i>Bacillus sp.14</i>	<i>B. thuringiensis 7-1/23</i>
Рухливість клітин	+	+	+
Наявність спор	+	+	+
Розташування спор у клітині	Ц	ц	ц
Форма спор	Е	Е	Е
Наявність капсули	-	-	-
Розміри клітин, мкм: довжина ширина	4,71±0,38 1,13±0,09	3,62±0,39 1,12±0,09	4,26±0,41 1,26±0,09
Забарвлення за Грамом	+	+	+
Поверхня колоній на МПА	R	R	R
Характер росту на МПБ	рівномірна мутність по всьому об'єму середовища	рівномірна мутність по всьому об'єму середовища	мутність по всьому об'єму середовища з утворенням плівки

Примітка: Ц — спори розташовані у центрі клітини; Е — еліпсоподібна форма спори, R — поверхня шорстка

Диференціальна діагностика видової належності штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15* показала наявність окиснювального типу метаболізму. Штами утворюють кислоту і ацетоїн з глюкози без виділення газу. При рості на L-арабінозі, D-ксилозі, D-маніті кислоту не утворюють; розщеплюють тирозин, мають лецитиназу, відновлюють нітрати до нітритів, гідролізують казеїн і крохмаль; на цитратно-сольовому агарі Симонса залужують середовище. Здатні до росту у широкому діапазоні температур — від 10,0 °C до 45,0 °C. Оптимальні значення для росту — 30,0–32,0 °C.

Сукупність культуральних, морфологічних (табл. 4) та фізіолого-біохімічних (табл. 5) ознак, а також ідентичність властивостей ізолюваних штамів з властивостями штаму *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 дозволяє попередньо віднести їх до виду *Bacillus thuringiensis*.



Таблиця 5
Фізіолого-біохімічні властивості штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15*Table 5
Physiological and biochemical properties of the strains of *Bacillus sp. 14* and *Bacillus sp. 15*

Ознаки	<i>Bacillus sp.15</i>	<i>Bacillus sp.14</i>	<i>B. thuringiensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23
Реакція Фогес-Проскауера	+	+	+
Утворення кислоти з:			
D-глюкози	+	+	+
L-арабінози	-	-	-
D-ксилози	-	-	-
D-маніту	-	-	-
Продукти розщеплення глюкози:			
газ	-	-	-
ацетоїн	+	+	+
Гідроліз крохмалю	+	+	+
Кристали білка	+	+	+
Утворення лецитинази	+	+	+
Розщеплювання:			
тирозину	+	+	+
казеїну	+	+	+
Утворення луку на цитратно- сольовому агарі	+	+	+
Використання цитрату	+	+	+
Редукція нітратів	+	+	+
Ріст на анаеробному агарі	+	+	+
Температура росту, °С			
максимальна	40,0	40,0	40,0–45,0
мінімальна	10,0	10,0	10,0–20,0
оптимальна	30,0–32,0	30,0–32,0	30,0–32,0

Таким чином, проведені дослідження дозволили виділити 32 ізоляти споруутворюючих бактерії роду *Bacillus*, визначити між них активні (*Bacillus sp.* №№ 3, 5, 6, 11, 14, 15), показати ступінь їх ларвіцидної дії по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata*. Для штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15* визначено, що за сукупністю культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак, а також за ідентичністю властивостей ізольованих штамів з колекційним *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 їх можна віднести до виду *Bacillus thuringiensis*, що потребує підтвердження молекулярно-біологічними методами.

Робота виконана відповідно до проектів ДБ 421, ДБ 393 та М/64-2008, що фінансувалися Міністерством освіти і науки України.



ЛІТЕРАТУРА

1. Морозов А.И. Современное промышленное грибоводство. — М.: АСТ; Донецк: Стакер, 2007. — 222 с.
2. Кандыбин Н.В., Барбашова Н.М., Ермолова В.П. Эффективность бактокулицида (*Bacillus thuringiensis* H₁₄) в борьбе с личинками кровососущих комаров // Труды всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии. — 1983. — № 53. — С. 104–112.
3. Orth P., Zalunin I.A., Gasparov V.S., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. Insecticidal toxin *Bacillus thuringiensis* // Journal of Protein Chemistry. — 1995. — № 14. — P. 241–249.
4. Патогенны насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. — 736 с.
5. Ужевская С.Ф., Непомящая Н.Н., Багаева О.С., Кривицкая Т.Н., Беляева Т.А, Бобрешова Н.С., Иваница В.А. Перспективы применения штаммов рода *Bacillus* против грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) // Интегрированная защита садов и виноградников. Международная научно-практическая конференция (8–13 сентября 2008 г.), Одесса, 2008 — С. 204–208.
6. Ужевська С.П., Непомяща Н.М., Багаєва О.С., Іваниця В.О. Комахи-шкідники культивованих грибів та розробка методики визначення активності мікробних ентомопатогенних препаратів // Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології»: Тез. доп. 21–22 жовтня 2010 року, Київ, 2010. — С. 117–119.
7. Логинов Е.В., Лескова А.Я. Метод трехцветной дифференциальной окраски спор, кристаллов, вегетативных клеток энтомопатогенных кристаллообразующих бацилл. // Бюлетень ВНИИСХ микробиол. — 1983. — Вып. 38. — С. 50–52.
8. Методы общей бактериологии / Ред. Герхарт Ф.Т. — Т. 1–3. — М.: Мир, 1983. — 264 с.
9. Гибсон Т., Гордон Р. Палочки и кокки, образующие эндоспоры // Руководство Берги по определению бактерий. — под ред. Дж. Хоулта, 8-е изд. — 1980. — С. 286–289.
10. Харвуд К. Бациллы. Генетика и биотехнология. — М.: Мир, 1992. — 531 с.
11. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. — К.: Наук. думка, 1983. — 51 с.
12. 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.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов. — 4-е изд. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.



Т.Н. Кривицкая, О.С. Багаева, С.Ф. Ужєвская, Н.Н. Нєпомящая,
В.А. Иваница

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

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* С ЛАРВИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ К ГРИБНЫМ КОМАРИКАМ *BRADYSIA PILISTRIATA* FREY (SCIARIDAE)

Реферат

Выделены 32 изолята спорообразующих бактерий рода *Bacillus* из источников возможной дислокации энтомопатогенных бактерий. Энтомцидная активность к личинкам грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) была выявлена у 6 изолятов *Bacillus sp.* Максимальная ларвицидная активность отмечена у *Bacillus sp.* 14 и *Bacillus sp.* 15, которые по своим признакам предварительно отнесены к виду *Bacillus thuringiensis*. Определены их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические характеристики.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Bacillus thuringiensis*, ларвицидная активность, грибной комарик.

T. Krivitska, O. Bagaeva, S. Uzhevskya, N. Nepomyascha, V. Ivanytsia

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

THE CHARACTERISTIC OF BACTERIAL STRAINS OF GENUS *BACILLUS* WITH LARVAECYDE ACTION TO FUNGUS MIDGES *BRADYSIA PILISTRIATA* FREY (SCIARIDAE)

Summary

It was allocated 32 bacterial isolates forming disputes of the genus *Bacillus* from the sources of possible disposition of entomopathogenic bacteria. It was discovered the entomocid activity in relation to the larvae of mushroom mosquito of *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) at 6 isolates of *Bacillus sp.* The greatest larvicid activity is determined at *Bacillus sp.* 14 and *Bacillus sp.* 15 identified as *Bacillus thuringiensis*. There were defined their morphological, cultivated, physiological and biochemical characteristics.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, larvicid activity, fungus midge.

