



ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

УДК 57.083.13:579 85 .11

*И.С. Шульга, Д.А. Желябовская,
Л.А. Лаверушина, И.Е. Горбачева*

ИЗМЕНЕНИЕ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ЭТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

*I.S. Shulga, D.A. Zhelyabovskaya,
L.A. Lavrushina, I.E. Gorbacheva*

CHANGING INSECTICIDAL ACTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* DURING LONG-TERM STORAGE

Шульга И.С. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института, г. Благовещенск.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Желябовская Д.А. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института, г. Благовещенск.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Лаверушина Л.А. – науч. сотр. отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института, г. Благовещенск.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Горбачева И.Е. – мл. науч. сотр. отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института, г. Благовещенск.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Shulga I.S. – Cand. Biol. Sci., Leading Staff Scientist, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Far East Zone Research and Development Veterinary Institute, Blagoveshchensk.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Zhelyabovskaya D. A. – Cand. Biol. Sci., Leading Staff Scientist, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Far East Zone Research and Development Veterinary Institute, Blagoveshchensk.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Lavrushina L.A. – Staff Scientist, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Far East Zone Research and Development Veterinary Institute, Blagoveshchensk.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Gorbacheva I.E. – Junior Staff Scientist, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Far East Zone Research and Development Veterinary Institute, Blagoveshchensk.

E-mail: dalznivilabmicro@mail.ru

Препараты на основе Bacillus thuringiensis широко применяют во всем мире благодаря их патогенным свойствам к различным насекомым. Поддержание штаммов в активном состоянии и сохранение их целевых свойств являются неотъемлемой частью работы при создании и производстве биологических препаратов. При периодических пересевах энто-

мопатогенных штаммов Bacillus thuringiensis есть вероятность, что микроорганизмы потеряют свою патогенность в отношении вредителя. Цель исследования – провести сравнительную оценку инсектицидной активности некоторых энтомопатогенных штаммов Bacillus thuringiensis, имеющих в музейной коллекции отдела микробиологии, вирусологии

логии и иммунологии Дальневосточного зонального научно-исследовательского ветеринарного института, по отношению к личинкам большой восковой моли. Представлена сравнительная характеристика инсектицидной активности разных штаммов *Bacillus thuringiensis*, высокопатогенных против личинок большой восковой моли. Культуры сохраняли в течение девяти лет в музейной коллекции института. Инсектицидную активность культур определяли в лабораторных условиях в соответствии с методическими рекомендациями «Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis* var. *galleria*» и методическими указаниями «Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств». Полученные результаты по оценке биологической активности музейных культур позволяют сделать вывод о перспективности их применения для борьбы с восковой молью.

Ключевые слова: микроорганизмы, *Bacillus thuringiensis*, хранение, восковая моль, инсектицидная активность.

The preparations based on *Bacillus thuringiensis* are widely used throughout the world due to their pathogenic properties to various insects. Maintaining strains in active state and preserving their target properties is an integral part of the work in the creation and production of biological drugs. At periodic resowings of entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* there is a probability that microorganisms will lose the pathogenicity concerning the pest. The purpose of the study is to conduct a comparative assessment of insecticidal activity of some entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis*, which are available in the museum collection of the Microbiology, Virology and Immunology Department of the Far East Zone Research Veterinary Institute in relation to the larvae of a large wax moth. Comparative characteristic of insecticidal activity of different strains of *Bacillus thuringiensis*, high-pathogenic against larvae of a big wax moth is submitted. The cultures were preserved for nine years in the museum collection of the institute of Insecticidal Activity of the Cultures, were defined under laboratory conditions in accordance with methodological recommendations "Isolation and selection of highly virulent cultures of

Bacillus thuringiensis var. *galleria* "and methodical guidelines" Identification of *Bacillus thuringiensis* cultures and assessment of their pathogenic properties". Received results on the assessment of biological activity of museum cultures allow drawing a conclusion on the prospects of their application for combating wax moths. The results of the evaluation of biological activity of museum cultures suggest that they are promising for combating wax moths.

Keywords: microorganisms, *Bacillus thuringiensis*, storage, wax moth, insecticidal activity.

Введение. Бактерии *Bacillus thuringiensis* хорошо известны благодаря их патогенности к различным насекомым. Они, обладая широким спектром патогенности по отношению к чешуекрылым, жесткокрылым и двукрылым насекомым, являются в настоящее время основным агентом биологической борьбы с насекомыми [1].

Практическая ценность данных микроорганизмов заключается в способности образовывать белковые кристаллические δ -эндотоксины на стадии споруляции, токсичные для насекомых-вредителей [2]. На основе спорово-кристаллических комплексов *Bacillus thuringiensis* создан ряд энтомопатогенных препаратов, которые применяются в России и за рубежом. Эти препараты используют для защиты сельскохозяйственных растений, лесных насаждений, в борьбе с двукрылыми кровососущими насекомыми [1, 3].

Перспективность и широкое использование препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* связаны с рядом особенностей энтомопатогенных бактерий, важными из которых являются: безопасность для нецелевых объектов, в первую очередь для человека и теплокровных животных, и специфичность действия разных серотипов и штаммов *Bacillus thuringiensis* [3].

Общеизвестно, что качество препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* зависит от сохранности основных биологических свойств штамма-производителя в условиях лаборатории. Поэтому поддержание штаммов в рабочем состоянии и сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами [4].

Большинство авторов считают наиболее оптимальными методы долгосрочного хранения

штаммов, такие как криоконсервация и лиофильное высушивание [5, 6]. С целью гарантированного сохранения жизнеспособности и высокой активности культур В.П. Ермолова с соавт. рекомендуют использовать одновременно несколько способов хранения [3, 4].

По мнению ряда исследователей, при периодических пересевах энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis* есть вероятность, что микроорганизмы потеряют свою патогенность в отношении вредителя [7].

Однако выбор метода для сохранения музейных культур зависит не только от целей, для которых используется микроорганизм, а также от имеющегося в распоряжении оборудования [8].

В ФГБНУ ДальЗНИВИ сохраняется музейная коллекция, состоящая из нескольких штаммов *Bacillus thuringiensis*, высокопатогенных в отношении личинок большой восковой моли. Один из штаммов был запатентован [9] и на его основе разработан биоинсектицид для борьбы с большой восковой молью [10].

Цель исследований. Сравнительная оценка инсектицидной активности некоторых энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis*, имеющих в музейной коллекции отдела микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБНУ ДальЗНИВИ, по отношению к личинкам большой восковой моли.

Материалы и методы исследований. Испытание инсектицидной активности культур проводили в лабораторных условиях в соответствии с методическими рекомендациями «Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis* var. *galleria*» [11] и методическими указаниями «Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств» [12].

Для проведения эксперимента по изучению инсектицидной активности в качестве тест-объекта использовали личинок большой восковой моли 4–6-суточного возраста.

Были сформированы контрольная и пять опытных групп по 10 личинок в каждой. Для получения статистически достоверных данных эксперимент проведен в трех повторностях.

Заражение личинок проводили перорально, методом свободного поедания воскового сырья, предварительно обработанного испытуемым штаммом. Обработанный и высушенный корм в

количестве 3–5 г помещали в чашки Петри и подсаживали в каждую по 10 личинок восковой моли одного возраста. В контроле гусеницам скармливали необработанное восковое сырье. Гибель гусениц учитывали в течение 10 суток.

Инсектицидную активность испытуемого штамма рассчитывали по формуле Аббота [11].

Всего в эксперименте было использовано 180 личинок лабораторной популяции восковой моли.

Полученные экспериментальные данные по инсектицидной активности коллекционных штаммов в 2018 г. сравнили с результатами, полученными в опытах с этими же штаммами и в этой же лаборатории в 2010 г. при изучении патогенной активности полевых изолятов *Bacillus thuringiensis*.

На протяжении девяти лет культуры сохраняли методом субкультивирования, или периодических пересевов на свежий мясо-пептонный агар. Для уменьшения высыхания культур использовали пробирки с резиновыми пробками. Для снижения скорости метаболизма микроорганизмов культуры хранили в бытовом холодильнике при температуре 4–6° С. Кратность пересевов была ежеквартальной.

В процессе пересевов проводили оценку кристаллообразующей функции культур. Для этого после очередного посева на 7–8-е сутки инкубирования изготавливали мазки культуры, окрашивали водным раствором карболового фуксина и методом световой микроскопии определяли способность культуры к образованию белковых кристаллов [12].

Результаты исследований и их обсуждение. Гибель личинок большой восковой моли во всех опытных группах началась на второй-третий день после постановки эксперимента.

В контрольной группе личинки активно потребляли корм, сохраняли подвижность, через некоторое время превращались в куколки, из которых впоследствии выводились бабочки большой восковой моли. Гибели тест-объектов в контроле не наблюдали.

Анализ таблицы показал, что в 2010 году 100%-й инсектицидной активностью обладали штаммы Bt RCAM 00045, Bt 850, Bt 851 и Bt 859. Штамм Bt 804_{x2} также имел высокую инсектицидную активность – 90 %. Все перечисленные штаммы являлись перспективными для создания биопрепарата против восковой моли.

**Сравнительная характеристика инсектицидной активности коллекционных штаммов
*Bacillus thuringiensis***

Испытуемый штамм	Повторность	Количество насекомых в опыте, 2010 г. / 2018 г.	Учет гибели за 7 суток, 2010 г. / 2018 г.	Инсектицидная активность по Абботу, % 2010 г. / 2018 г.
Bt RCAM 00045	1	10 / 10	10 / 10	100 / 100
	2	10 / 10	10 / 10	
	3	10 / 10	10 / 10	
Bt 804 _{x2}	1	10 / 10	9 / 9	90 / 70
	2	10 / 10	9 / 6	
	3	10 / 10	9 / 6	
Bt 850	1	10 / 10	10 / 8	100 / 73,3
	2	10 / 10	10 / 6	
	3	10 / 10	10 / 8	
Bt 851	1	10 / 10	10 / 10	100 / 100
	2	10 / 10	10 / 10	
	3	10 / 10	10 / 10	
Bt 859	1	10 / 10	10 / 10	100 / 93,3
	2	10 / 10	10 / 9	
	3	10 / 10	10 / 9	
Контроль	1	10 / 10	0 / 0	~
	2	10 / 10	0 / 0	
	3	10 / 10	0 / 0	

В процессе хранения коллекционных штаммов, через девять лет, 100%-я инсектицидная активность сохранилась только у двух штаммов: Bt RCAM 00045 и Bt 851. У штамма Bt 859 инсектицидная активность снизилась в 1,1 раза, у Bt 804_{x2} – в 1,3 и у Bt 850 – в 1,4 раза. Перспективность применения для борьбы с восковой молью актуальна для штаммов Bt RCAM 00045, Bt 851 и Bt 859.

Следует отметить, что способность музейных культур к образованию кристаллов δ-эндотоксина всегда оставалась на высоком уровне – от 70 % и выше по отношению к спорам.

Заключение. Метод периодических пересевов относится к традиционным методам поддержания и сохранения бактериальных культур. Как и любой метод, он имеет свои преимущества и недостатки. К преимуществам можно отнести то, что данный метод прост в исполнении, общедоступен, не требует дорогостоящего обо-

рудования и позволяет легко контролировать чистоту штаммов. Недостатками метода являются необходимость соблюдения регламентов пересевов, потребность в посуде, питательных средах, значительные затраты времени, риск загрязнения культуры, ошибки при обозначении штаммов, риски потери культур из-за их гибели, изменения биологических свойств микробных культур или снижения способности к выработке целевых продуктов. По этим причинам метод относят к методам непродолжительного хранения [5].

Таким образом, недостатки метода периодических пересевов в определённой степени отразились на инсектицидной активности некоторых музейных культур, что, вероятно, связано с биологическими особенностями отдельных штаммов, при этом кристаллообразующая функция оставалась неизменной.

Несмотря на снижение инсектицидной активности некоторых штаммов *Bacillus thuringiensis*,

она является достаточно высокой, поэтому перспективность их применения для борьбы с восковой молью остается актуальной.

Литература

1. Каменек Л.К., Каменек Д.В. *Bacillus thuringiensis*: механизм действия и пути использования. – Ульяновск: УлГУ, 2015. – 198 с.
2. Григорьева А.С., Вятчина О.Ф. Сохранение свойств музейных штаммов *Bacillus thuringiensis* после длительного хранения // Молодые лидеры – 2016: мат-лы I международного конкурса выпускных квалиф. и курсовых работ (науч.-образ. центр «Знание»). – Казань, 2016. – С. 130–135.
3. Ермолова В.П., Гречишкина С.Д. *Bacillus thuringiensis* – продуценты биопрепаратов // Агротехнический метод защиты растений от вредных организмов: мат-лы VIII международного науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию Кубанского гос. аграр. ун-та. – Краснодар: Изд-во Кубан. гос. аграр. ун-та им. И.Т. Трубилина, 2017. – С. 143–146.
4. Ермолова В.П., Гречишкина С.Д., Нижников А.А. Активность энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* при разных методах хранения // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т.53. – № 1. – С. 201–208.
5. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.
6. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов / А.А. Цуцаева, А.Е. Ананьина, Л.М. Бальбердина [и др.] // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 696–700.
7. Крыжко А.В., Кузнецова Л.Н. Выделение и изучение новых высокоактивных штаммов *Bacillus thuringiensis* // Таврический вестник аграрной науки. – 2016. – № 4(8). – С. 30–36.
8. Нусипжан А.К., Кукишева А.А. Применение энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* против вредителей сельскохозяйственных культур и древесины // Знание. – 2017. – № 1-2 (41). – С.15–20.
9. Пат. 2453595 Российская Федерация, МПК С12N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus thuringiensis* для получения биоинсектицида для борьбы с большой восковой молью / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, В.А. Серебрякова; заявитель и патентообладатель Дальневосточный зон. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. – № 201110498/10; опубл. 20.06.2012, Бюл. № 17. – 4 с.
10. Пат. 2603271 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N63/02, С12R 1/07 Биоинсектицид для борьбы с большой восковой молью / И.С. Шульга, В.А. Рябуха, Н.Н. Шульга, Л.А. Лаврушина, В.А. Коноплев, А.В. Куразеева; заявитель и патентообладатель Дальневосточный зон. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. – № 2015130407/10; заявл. 22.07.2015; опубл. 27.11.2016, Бюл. № 33. – 4 с.
11. Выделение и отбор высоковирулентных культур *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*: метод. рекомендации / А.Г. Кольчевский [и др.]; ВНИИ защиты растений. – Л., 1987. – 21 с.
12. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств: метод. указания / А.Я. Лескова [и др.]; ВНИИ защиты растений, ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. – Л., 1984. – 20 с.

Literatura

1. Kamenek L.K., Kamenek D.V. *Bacillus thuringiensis*: mekhanizm dejstviya i puti ispol'zovaniya. – Ul'yanovsk: UIGU, 2015. – 198 s.
2. Grigor'eva A.S., Vyatchina O.F. Sohranenie svojstv muzejnyh shtammov *Bacillus thuringiensis* posle dlitel'nogo hraneniya // Molodye lidery – 2016: mat-ly I mezhdunar. konkursa vypusknyh kvalif. i kursovyh rabot (nauch.-obraz. centr «Znanie»). – Kazan', 2016. – S. 130–135.
3. Ermolova V.P., Grechishkina S.D. *Bacillus thuringiensis* – producenty biopreparatov // Agrotekhnicheskij metod zashchity rastenij ot vrednyh organizmov: mat-ly VIII mezhdunar.

- nauch.-prakt. konf., posvyashch. 95-letiyu Kubanskogo gos. agrar. un-ta. – Krasnodar: Izd-vo Kuban. gos. agrar. un-ta im. I.T. Trubilina, 2017. – S. 143–146.
4. *Ermolova V.P., Grichishkina S.D., Nizhnikov A.A.* Aktivnost' entomopatogennyh shtammov *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pri raznyh metodah hraneniya // *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*. – 2018. – T.53. – № 1. – S. 201–208.
 5. *Pohilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V.* Metody dlitel'nogo hraneniya kollekcionnyh kul'tur mikroorganizmov i tendencii razvitiya // *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region. Medicinskie nauki*. – 2009. – № 4 (12). – S. 99–121.
 6. Opyt dolgosrochnogo hraneniya promyshlennyh shtammov mikroorganizmov / *A.A. Cucaeva, A.E. Anan'ina, L.M. Balyberdina* [i dr.] // *Mikrobiologiya*. – 2008. – T. 77. – № 5. – S. 696–700.
 7. *Kryzhko A.V., Kuznecova L.N.* Vydelenie i izuchenie novyh vysokoaktivnyh shtammov *Bacillus thuringiensis* // *Tavricheskij vestnik agrarnoj nauki*. – 2016. – № 4(8). – S. 30–36.
 8. *Nusipzhan A.K., Kukisheva A.A.* Primenenie entomopatogennyh bakterij *Bacillus thuringiensis* protiv vreditelej sel'skohozyajstvennyh kul'tur i drevesiny // *Znanie*. – 2017. – № 1-2 (41). – S.15–20.
 9. Pat. 2453595 Rossijskaya Federaciya, MPK C12N 1/20. Shtamm bakterij *Bacillus thuringiensis* dlya polucheniya bioinsekticida dlya bor'by s bol'shoj voskovoju mol'yu / *N.E. Gorkovenko, Yu.A. Makarov, V.A. Serebryakova*; zayavitel' i patentoobladatel' Dal'nevostochnyj zon. nauch.-issled. veterinar. in-t. – № 201110498/10; opubl. 20.06.2012, Byul. № 17. – 4 s.
 10. Pat. 2603271 Rossijskaya Federaciya, MPK C12N 1/20, A01N63/02, C12R 1/07 Bioinsekticid dlya bor'by s bol'shoj voskovoju mol'yu / *I.S. Shul'ga, V.A. Ryabuha, N.N. Shul'ga, L.A. Lavrushina, V.A. Konoplyov, A.V. Kurazeeva*; zayavitel' i patentoobladatel' Dal'nevostochnyj zon. nauch.-issled. veterinar. in-t. – № 2015130407/10; zayavl. 22.07.2015; opubl. 27.11.2016, Byul. № 33. – 4 s.
 11. Vydelenie i otbor vysokovirulentnyh kul'tur *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*: metod. rekomendacii / *A.G. Kol'chevskij* [i dr.]; VNII zashchity rastenij. – L., 1987. – 21 s.
 12. Identifikaciya kul'tur *Bacillus thuringiensis* i oценка ih patogennyh svojstv: metod. ukazaniya / *A.Ya. Leskova* [i dr.]; VNII zashchity rastenij, VNII sel'skohozyajstvennoj mikrobiologii. – L., 1984. – 20 s.

