

УДК 579.64+663.18

РАЗРАБОТКА УНИВЕРСАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА-ИНСЕКТИЦИДА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ КОНСОРЦИУМА ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

К.Д. Левитская^{1,2}, Ю.А. Франк^{1,2}, Д.А. Ивасенко^{1,2}

¹*Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия*

²*ООО «Дарвин», Томск, Россия*

В статье отражены результаты экспериментов по разработке биопрепарата-инсектицида для защиты растений от насекомых и их личинок на основе штаммов бактерии *Bacillus thuringiensis*. На основе теоретико-экспериментальных данных отобраны четыре паспортизованных штамма *B. thuringiensis* разных подвидов, подобраны питательные среды для промышленного культивирования каждого из штаммов и длительность культивирования для достижения не менее 10^8 КОЕ/мл в биопрепарате. Протестированы условия хранения препарата, выбраны оптимальные температуры и способы консервации.

Ключевые слова: защита растений, биоинсектициды, *Bacillus thuringiensis*, CRY токсин, биопрепараты

DEVELOPMENT OF A UNIVERSAL INSECTICIDE BIOLOGICAL PREPARATION FOR PLANT PROTECTION CONSISTING OF SEVERAL *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS

K.D. Levitskaya^{1,2}, Y.A. Frank^{1,2}, D.A. Ivashenko^{1,2}

¹*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

²*Darwin LLC, Tomsk, Russia*

The article reflects the results of experiments on the development of an insecticidal biological product for plant protection against insects and their larvae based on strains of the bacterium *Bacillus thuringiensis*. On the basis of theoretical and experimental data, four certified strains of *B. thuringiensis* of different subspecies were selected, growth media for the industrial cultivation of each strain and the duration of cultivation to achieve at least 10^8 CFU/ml in the biological product were chosen. The storage conditions of the preparation were tested and optimal temperatures and preservation methods were selected.

Keywords: plant protection, bioinsecticides, *Bacillus thuringiensis*, CRY toxin, biological preparation

Введение. Насекомые и другие вредители наносят существенный урон сельскому хозяйству, снижая продуктивность растений и угрожая здоровью животных. Для борьбы с вредителями растений широко используются биопрепараты микробного происхождения. Биологические пестициды, в отличие от химических, действуют многоступенчато, вызывая явления заболеваемости-смертности, и являются безопасными для нецелевых организмов, включая человека [1].

Известно около 1500 энтомоцидных микроорганизмов с разнообразной энтомолого-экологической спецификой [3]. Токсинообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) наиболее часто входят в состав биопрепаратов, они представляют собой высокоспецифичный, безопасный и эффективный агент для борьбы с насекомыми-вредителями сельского хозяйства. Продукты Bt активны в отношении личинок насекомых, они убивают насекомое путем разрушения эпителиальных клеток кишечника с последующей септициемией. Основными действующими токсинами являются кристаллические белковые δ -эндотоксины (Cry и Cyt). С точки зрения практического применения наиболее значимы Cry токсины – они активны против

разных групп насекомых: чешуекрылых (Lepidoptera), жесткокрылых (Coleoptera), перепончатокрылых (Hymenoptera) и двукрылых (Diptera) [5].

Цель данного исследования – разработка биопрепарата-инсектицида на основе бактериальных штаммов *Bacillus thuringiensis* с разной специфичностью для защиты растений от насекомых-вредителей и их личинок.

Материалы и методы. Поскольку сгу токсины имеют специфичность воздействия на разные группы насекомых [4], для включения в состав биопрепарата были отобраны четыре потенциальных паспортизированных штаммов Bt, таким образом, чтобы охватить широкий спектр патогенных насекомых:

1. *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (штамм ВТ) – эффективен против чешуекрылых и других насекомых. Штамм из производственной коллекции ООО «Дарвин», депонирован в ВКМ по процедуре Национального патентного депонирования под номером В-3465D;

2. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (штамм В-6066) – эффективен против чешуекрылых, двукрылых и других насекомых. Заказан из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ);

3. *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (штамм В-2972) – эффективен против двукрылых и других насекомых. Заказан из ВКПМ;

4. *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (штамм В-5081) – имеет выраженное действие на жесткокрылых. Заказан из ВКПМ.

Подбор методов промышленного культивирования выбранных штаммов. Технология производства штамма ВТ была разработана ранее, оптимальный выход клеток штамма получают на жидком аналоге агара для количественного учета гетеротрофных бактерий (РСА) в течение 48 ч при температуре 26–28 °С с барботированием.

С целью подбора условий промышленного культивирования остальных штаммов, отобранных для включения в биопрепарат, изучали их рост в жидкой культуре на четырех вариантах питательной среды: (1) питательная среда на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ); (2) ½ ГРМ; (3) РСА; (4) ½ РСА. Данные среды выбраны исходя из доступности их ингредиентов и удобства приготовления в промышленных масштабах.

Каждый штамм высевали на соответствующую жидкую питательную среду в объеме 15 мл, добавляя инокулят из расчета 5 % (v/v), инкубировали при 28 °С на шейкере (120 об./мин). Эксперименты провели в пяти биологических повторностях. Число клеток учитывали в каждой повторности каждого варианта эксперимента, используя камеру Горяева для вычисления численности клеток на 1 мл. Клетки учитывали через 24, 48 и 72 ч культивирования.

Подбор консерванта для сохранения и продления жизнеспособности бактерий в составе биопрепарата. Для определения эффективности применения консервантов и выбора температурных условий хранения биопрепарата вырастили жидкие культуры каждого штамма в оптимальных условиях в объеме 600 мл. Далее жидкие культуры смешали в стерильных сывороточных флаконах в пропорции 1:1:1:1 (по 25 мл культуры каждого штамма). Таким образом, подготовили 24 флакона со смесью клеток четырех штаммов Bt (прототип биопрепарата).

В качестве консервантов, основываясь на литературных источниках [2, 6], для тестирования выбрали NaCl 5 % (w/v), сорбат К 0.3 % (w/v), бензоат Na 0.5 % (w/v). Сухие соли добавляли во флаконы. Также закладывали контрольный вариант эксперимента – без добавления консерванта. В каждом флаконе был проведен учет исходной численности клеток (0 суток) с помощью камеры Горяева. Хранение биопрепарата испытывали при температурах 10 °С, 23 °С и 36 °С. Итого тестировали 12 комбинаций в двух параллельных повторностях. Учет клеток проводили также с помощью камеры Горяева через 7, 14, 30 и 60 суток.

Результаты и обсуждение. **Подбор методов промышленного культивирования выбранных штаммов.** Результаты учета клеток штаммов В-6066, В-2972 и В-5081 показаны на

рис. 1 в виде среднего арифметического, рассчитанного по пяти параллельным повторностям посева каждого штамма на каждой из четырех тестируемых сред (\pm стандартная ошибка среднего). При принятии решения о выборе той или иной среды руководствовались следующими критериями: (1) достижение кондиционной численности клеток Вt не менее 10^8 кл/мл; (2) минимальная стоимость питательной среды; (3) минимальные затраты на электроснабжение и минимальная занятость ферментеров.

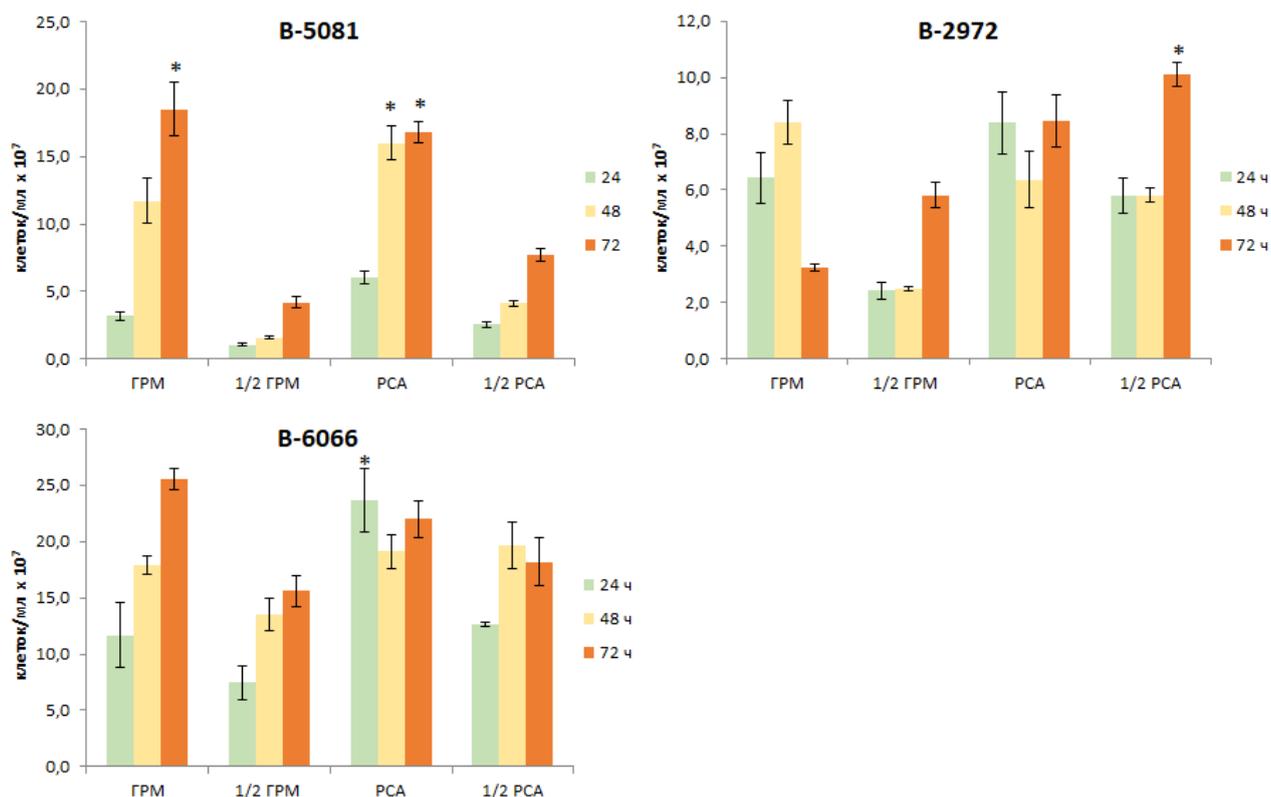


Рис. 1. Число клеток штаммов *Bacillus thuringiensis* В-5081, В-2972 и В-6066 в 1 мл жидкой культуры при культивировании на разных питательных средах. Знаком * отмечены варианты с максимальной численностью клеток

Максимальная средняя численность клеток штамма В-6066 отмечена на среде ГРМ через 72 ч и составила 2.55×10^8 кл/мл. Однако на среде РСА через 24 ч культивирования достигнуто 2.36×10^8 кл/мл и статистически значимых различий между этими вариантами при оценке U-критерием Манна-Уитни не выявлено ($p > 0.05$). Так как культивирование на среде РСА в течение 24 ч значительно дешевле, чем на ГРМ в течение 72 ч, выбран первый вариант сочетания питательной среды и времени культивирования.

В случае эксперимента со штаммом В-2972 кондиционная численность клеток достигнута только на питательной среде $\frac{1}{2}$ РСА через 72 ч культивирования.

Для штамма В-5081 максимальная средняя численность клеток (1.85×10^8 кл/мл) отмечена на ГРМ через 72 ч, на среде РСА через 72 ч получено в среднем по пяти параллельным повторностям 1.68×10^8 кл/мл, а через 48 ч – 1.60×10^8 кл/мл. Между значениями численности клеток штамма В-5081 во всех трех перечисленных вариантах культивирования статистически значимых различий не выявлено (U-критерий, $p > 0.05$). Исходя из критериев стоимости питательной среды и минимальных затрат на культивирование выбран вариант выращивания штамма на среде РСА в течение 48 ч.

Подбор консерванта для сохранения и продления жизнеспособности бактерий в составе биопрепарата. Вопреки ожиданиям, NaCl в концентрации 5 % (w/v) не обеспечивал

должного хранения биопрепарата (рис. 2): при температурах 23 и 36 °С через 14–30 суток отмечена контаминация.

При использовании в качестве консервантов сорбата К и бензоата Na (рис. 2) клетки Вt проявляли чувствительность к этим веществам, их численность при хранении при всех исследованных температурах была нестабильной, а прогноз сохранения численности при хранении до 180 суток даже при 10 и 23 °С – не оптимистичным.

Без добавления консерванта суспензия клеток Вt хранилась значительно лучше и даже увеличивала численность на определенном этапе (в период до 30 суток) (рис.2). Прогноз долгосрочного сохранения численности Вt благоприятный для температур 10 и 23 °С, хранение при 36 °С не обеспечивает сохранности биопрепарата.

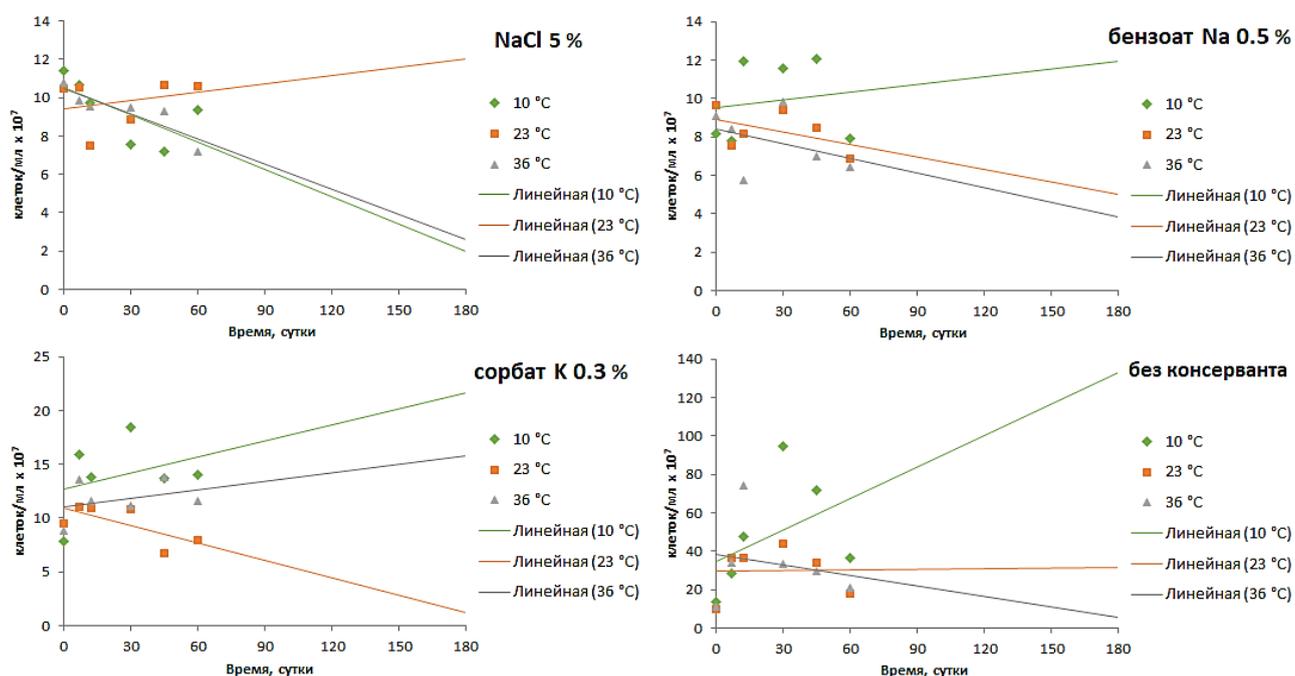


Рис. 2. Изменение численности клеток в смеси штаммов Вt при хранении при температурах 10, 26 и 36 °С через 7, 14, 30 и 60 суток и прогноз на 180 суток

Заключение. На основе теоретико-экспериментальных данных составлен консорциум бактериальных штаммов *Bacillus thuringiensis* для разработки биопрепарата-инсектицида широкого действия: *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (штамм ВТ), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (штамм В-6066), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (штамм В-2972) и *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (штамм В-5081). Определены оптимальные условия для промышленного культивирования каждого штамма: ВТ – питательная среда РСА, длительность культивирования – 48 ч; В-6066 – РСА, 24 ч; В-2972 – ½ РСА, 72 ч и В-5081 – РСА, 48 ч. А также определены условия хранения готового биопрепарата – без добавления консервантов при температурах 10–23 °С.

В дальнейшем планируется провести исследование длительного хранения (1.5 год) биопрепарата при разных температурах без добавления консервантов и провести испытание активности биопрепарата в отношении различных насекомых-вредителей растений.

Библиографический список

1. Гольдин Е.Б. Биологическая защита растений в свете проблем XXI века. Геополитика и экогеодинамика регионов. 2014. Т. 10. № 2. С. 99-107.
2. Ermolova V.P., Grischechkina S.D., Rakhman A.M., Antonets K.S., Belousova M.E., Yakhno V.V., Nizhnikov A.A. Insecticidal properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. I. The activity

spectrum of a larvicidal preparation based on industrial strain 7-1/23a. *Agricultural Biology* 2019, 54 (6). PP. 1267-1280.

3. Khachatourians G.G. Insecticides, Microbial. In: *Encyclopedia of Microbiology*, 2009. PP. 95-109.

4. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*. 2014, 6 (12). PP. 296-325. doi: 10.3390/toxins6123296.

5. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-Leroux C, Lereclus D, Crickmore N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 2010, 18 (5). PP. 189–194.

6. Surekha M., Reddy S.M. Preservatives: Classification and Properties In book *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. 2014, V.3. PP. 69-75. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00257-3.