

О КУЛИЦИДНОМ ДЕЙСТВИИ КУЛЬТУР АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

К. О. ЧИЛИНГАРЯН, В. Ш. МЕЛИКСЕТЯН, Э. К. АФРИКЯН

Изучено инсектицидное действие 219 штаммов разных серотипов *Bac. thuringiensis* и 34 штаммов *Bac. sphaericus* энтомогенного происхождения. Большинство испытанных штаммов *Bac. thuringiensis* в больших концентрациях обладает инсектицидностью к личинкам *Aedes aegypti*. Наибольшая активность обнаружена у штамма *Bac. thuringiensis* var. *israelensis*. Почти половина выделенных из разных насекомых штаммов *Bac. sphaericus* оказывала ларвицидное действие, однако лишь одна культура данного вида имела высокую активность.

Ключевые слова. комары, спорообразующие бактерии.

В последние годы получены обнадеживающие данные об использовании микроорганизмов для борьбы с комарами. Особый интерес вызывает разновидность спорообразующих бактерий *Bac. thuringiensis* var. *israelensis*, оказавшаяся специфически вирулентной к комарам [5]. Культуры этих бактерий относятся к хорошо изученному виду спорообразующих бактерий, являющемуся в настоящее время основой для производства инсектицидных препаратов против многих видов вредоносных насекомых. При испытании культур этой разновидности, трактуемой как серотип 14 *Bac. thuringiensis*, получены перспективные результаты в борьбе с комарами [2].

Другим видом спорообразующих бактерий, заслуживающим большого внимания, является *Bac. sphaericus* [4, 7]. Из погибших комаров различных районов выделены высоковирулентные штаммы данного вида бактерий, эффективные в борьбе против разных родов этого насекомого [7, 8].

Если инсектицидное действие культур *Bac. thuringiensis* обусловлено особыми кристалловидными включениями белковой природы, то механизм энтомоцидного действия бактерий *Bac. sphaericus* пока не выяснен и подробно изучается.

Настоящая работа посвящена изучению инсектицидного действия культур спорообразующих бактерий *Bac. thuringiensis* и *Bac. sphaericus* на личинок комаров.

Материал и методика. Объектами исследований являлись культуры выделенных нами оригинальных штаммов *Bac. thuringiensis* и *Bac. sphaericus*. Идентификация их проводилась на основе комплекса морфо-физиологических и серологических особенно-

штампы в соответствии с их видовой диагностикой [1, 3]. Все испытанные штаммы были выделены из организмов погибших насекомых разных районов страны. Для выделения культур насекомые растирались в капле стерильной воды, затем суспендировались в разных разведениях и высевались на поверхность агаризованной среды (МПА) в чашках Петри. После микроскопии выросших колоний культуры *Bac. thuringiensis* и *Bac. sphaericus* очищались расеем на чашках и высевались в чистую культуру. Серотипизация проводилась агглютинацией к жгутиковому антигену по методике французских авторов [6]. Штаммы бактерий испытывались в виде водных суспензий 3-суточных культур с МПА и культуральной жидкости при росте на мясопептонном бульоне (МПБ).

Инсектицидность определялась по отношению к личинкам желтолихорадочного комара — *Aedes aegypti* L., который избран тест-объектом как удобная лабораторная культура со сравнительно высокой стойкостью к различным микроорганизмам.

Брали 25 личинок *Aedes aegypti* III—IV возраста на 50 мл водной суспензии с различными разведениями испытываемой культуры. Контрольные личинки находились в воде при аналогичных условиях. Учет гибели личинок проводили спустя 1, 2, 3, 6, 24 и 48 часов. Опыты ставились с расчетом определения минимально токсичной летальной дозы испытываемой культуры бактерий. Поэтому тестирование начиналось с культуральных жидкостей бактерий в максимально высоких титрах, а в дальнейшем — при установлении их летальности — проводились их серийные разведения до выявления минимально летальной концентрации.

В предварительных опытах вирулентность бактерий определялась наблюдениями за гибелью личинок в течение одной недели, но в дальнейшем учет был ограничен 48-ю часами, поскольку принципиальных различий в результатах испытаний при этих сроках не было установлено.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 обобщены данные о кулицидной активности 219 штаммов различных серотипов *Bac. thuringiensis* энтомогенного происхождения.

Из указанного числа штаммов *Bac. thuringiensis* лишь 68 не обладали кулицидной активностью к личинкам *Aedes aegypti*, 4 штамма обладали высокой активностью, проявляющейся в быстром действии в слабых титрах порядка 10^4 — 10^5 спор/мл, остальные были активны в различной степени.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что культуры серотипа I (*thuringiensis*) не активны к личинкам испытанного вида комаров. Установленная вирулентность 6-ти штаммов в высоких титрах (2,7 млрд спор/мл) может быть отнесена к действию термостабильного экзотоксина. Испытанные штаммы серотипа 3 также могут быть охарактеризованы как штаммы, лишенные выраженной кулицидной активности, хотя в высоких титрах спор отмечена гибель личинок. Культуры серотипов 4, 5, 6, 10 также должны быть охарактеризованы как разновидности *Bac. thuringiensis*, лишенные выраженной энтомоцидной активности к личинкам *Aedes aegypti*.

Из 165-ти изученных культур неидентифицированных серотипов *Bac. thuringiensis* нами обнаружено 4 высокоактивных штамма к личинкам *A. aegypti*, причем 2 из них вызывали их гибель спустя 15 мин, а 2 других — через одни сутки. Интересно отметить, что среди несеротипируемых культур *Bac. thuringiensis* 53 штамма в высоких концентрациях оказались лишенными какой-либо кулицидной активности при наблюдениях в течение 2-х суток. Этот факт свидетельствует о

Таблица 1

Кулицидная активность культур *Bac. thuringiensis* разных серотипов к личинкам *Aedes aegypti*

Серотипы	Происхождение	Количество штаммов	Титр, млрд спор/мл	Гибель личинок, % спустя			
				1 ч	3 ч	6 ч	24 ч
H-1, <i>thuringiensis</i>	большой подкорный клоп, озимая совка	6	2,7	100			
H-3, <i>alesti</i>	гроздевая листовертка, большая восковая моль	3	2,0	0	100		
H-4, <i>dendrolimus</i>	большой подкорный клоп, паразит яблонной моли	1	2,1	100			
		2	2,4	0	0	100	
		4	2,4	0	0	0	0 20
H-5, <i>galleriae</i>	гроздевая листовертка, озимая совка, хищник яблонной моли	3	1,9	100			
		3	2,9	0	100		
		9	0,7	0	0	0	70 90
	паразитированные гусеницы яблонной моли, большая восковая моль	5	1,2	0	0	0	0
H-6, <i>entomocidus</i>	совка	1	2,1	100			
H-10, <i>caucasus</i>	колорадский жук, вола из местообитания комаров, совка - псилон, яблонная моль, паразит яблонной моли, плодовая моль	2	2,3	100			
		3	2,0	0	0	0	80 100
		11	2,0	0	0	0	0
H-14, <i>israelensis</i> (типовой штамм)	личинка комара	1	0.000001	100			
Несеротипируемые	гусеницы совки, личинки комаров, слепни, совки, личинки комара	2	0.000003	100			
		8	0,7	100			
		4	3,0	0	100		
	вола из местообитания комаров, блохи	3	1,9	0	0	100	
		2	0,00002	0	0	0	80-100
	различные насекомые	93	2,0	0	0	0	50-100
	различные насекомые	53	2,0	0	0	0	0

том, что среди культур *Bac. thuringiensis*, образующих кристаллоподобные энтомоцидные токсины, имеются штаммы, лишенные какой-либо энтомоцидной активности к личинкам изученного вида комаров. С другой стороны, по-видимому, среди бактерий указанного вида имеются разновидности, отличающиеся от серотипа *israelensis* и могущие представить практический интерес в аспекте использования их в борьбе с комарами.

Обобщенные данные наших опытов, представленные в табл. 2, показывают, что из 34-х испытанных культур *Bac. sphaericus* 13 штаммов проявляют кулицидное действие на личинок *A. aegypti*, из них 5 штаммов высокоактивны. Как правило, гибель личинок при скармливании им спор *Bac. sphaericus* наступает—за редким исключением—спустя 24 ч, в отличие от *Bac. thuringiensis*, при применении которых обнаруживается обратная картина. Действующее начало и механизм энтомоцидного действия бактерий указанных видов, что подтверждается приведенными данными наших опытов, различны. Анализ полученных ре-

Таблица 2

Кулицидная активность культур *Bac. sphaericus* к личинкам *A. aegypti*
(минимальная летальная доза в расчете титра спор на 1 мл водной суспензии)

Источник выделения	Количество культур	Титр спор, млрд/мл	Гибель личинок, %, спустя		
			2 ч	24 ч	48 ч
Coleoptera					
Личинки колорадского жука, Украинская ССР	1	0,0007	100		
	1	1,7	0	100	
Diptera					
Слепни, Армянская ССР	1	1,7	0	100	
Личинки комаров, Тюм. обл.	7	2	0	0	0
	2	0,001	0	100	
Личинки комаров, Индия	1	2,2	0	100	
Мухи, Литовская ССР	3	1,5	0	0	0
Lepidoptera					
Гусеницы совок, Армянская ССР	2	1,3	0	100	
	2	0,00025	0	0	100
	2	1	0	0	20
Гусеницы совок, Украинская ССР	1	1,5	0	100	
	1	6	0	100	
Гусеницы пядениц, Литовская ССР	3	2	0	0	0
Гусеницы грозлевой листовертки, Армянская ССР	1	1	0	100	
Гусеницы листоверток, Литовская ССР	2	2	0	0	0
Гусеницы непарного шелкопряда, Литовская ССР	2	2	0	0	0
Гусеницы яблонной плодожорки, Армянская ССР	2	2	0	0	0

результатов не вскрыл какой-либо закономерности в зависимости от источника энтомогенного происхождения и специфической кулицидной активности изученных штаммов *Bac. sphaericus*. Лишенные вирулентности культуры данного вида выделены нами из погибших комаров, непарного шелкопряда, яблонной плодожорки, листоверток, пядениц и других насекомых. С другой стороны, активные к личинкам комаров штаммы были выделены также из этих видов насекомых.

Испытания на ларвицидную активность к *A. aegypti* проводились с суспензией хорошо заспорированных культур *Bac. sphaericus*, начиная с высоких титров порядка 1—2 млрд спор/мл. С некоторыми наиболее вирулентными штаммами нами были проведены специальные опыты по изучению минимальной летальной дозы в расчете на количество спор, вызывающих 100-процентную гибель личинок. Среди испытанных нами

штаммов *Bac. sphaericus* был выделен лишь один, вызывавший в течение 2-х часов 100-процентную гибель личинок при титре 1×10^5 спор/мл.

На материале изученных штаммов можно заключить, что, за исключением одной культуры *Bac. sphaericus*, выделенной из личинок колорадского жука, остальные вирулентные штаммы оказывают ларвицидное действие спустя 24 ч после испытания их во взвеси с бактериями этого вида. Два штамма вызвали полную гибель личинок спустя 48 часов. Приведенные данные, по-видимому, указывают на развитие токсикоза у личинок комаров после заглатывания ими испытанных бактерий.

Проведенное исследование морфо-физиологических особенностей культур *Bac. sphaericus* выявило их неоднородность по многим признакам. Коррелятивной зависимости между кулицидностью и тем или иным комплексом этих свойств нам не удалось обнаружить. Вместе с тем микроскопия живых и окрашенных препаратов культур этого вида в цикле развития не выявила в спорулирующих клетках кристалловидных включений.

Указанный факт также подтверждает различный характер механизма энтомопатогенного действия культур *Bac. sphaericus* и *Bac. thuringiensis* на личинок комаров.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 27.VII 1981 г.

ԱՒՐՈՐ ՍՊՈՐԱՎՈՐ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՄՈՍԿԻՏԻՑԻԿԱՆԻԶ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Կ. Ն. ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ, Վ. Շ. ՄԵԼԻՔՍԵՏԻԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է մոծակասպանիչ ակտիվության առկայությունը միջատային ծաղում ունեցող *Bac. sphaericus*-ի 34 շտամի և *Bac. thuringiensis*-ի տարբեր սերոտիպների 219 շտամի մեջ:

Փորձարկված *Bac. thuringiensis*-ի շտամների մեծ մասը բարձր խտության դեպքում օժտված է միջատասպանիչ հատկությամբ *Aedes aegypti*-ի թրթուրների նկատմամբ: Մեծազույն ակտիվություն հայտնաբերվել է *Bac. thuringiensis*, var. *israelensis*-ի շտամների մեջ: *Bac. sphaericus*-ի շտամների գրեթե կեսը օժտված է մոծակասպանիչ հատկությամբ, բայց միայն մի կուլտուրա ունի բարձր ակտիվություն:

ON THE MOSQUITOCIDE ACTIVITY OF AEROBIC SPOREFORMING BACTERIA

K. N. CHILINGARIAN, V. SH. MELIKSETIAN, E. G. AFRIKIAN

The screening of mosquito-cide activity of *Bac. thuringiensis* and *Bac. sphaericus* cultures have been carried out. Mosquitocide action against *Aedes aegypti* larvae in high concentrations has been observed in *Bac. thuringiensis* cultures belonging to different serotypes. The strain of *Bac. thuringiensis* var. *israelensis* which was very active to *A. aegypti* larvae has been isolated.

Almost half of *Bac. sphaericus* cultures isolated from various insects has revealed mosquitocide activity but the only strain had strong larvicide action.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- 1 Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
- 2 Дубицкий А. М., Саубенова О. Г., Черкашин А. Н., Лухменева О. П., Рахимбаева К. Т. РЖБ. № 11Л, 67, 419. Деп., 1980
- 3 Buchanan R. E., Gibbons N. E. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8-th ed., Williams a. Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 4 Davidson E. W., Singer S., Briggs J. D. J. Invertebr. Pathol., 25, 179-184, 1975.
- 5 De Barjac H. C. R. Acad. S. D., 286, 797-800, 1978.
- 6 De Barjac H., Bonnesol A. Entomophaga, 7, 5, 1972.
- 7 Singer S. Dev. Ind. Microbiol., 20, 117-122, 1979.
- 8 Singer S. Biotechnology a. Bioengineering, 22, 1335-1355, 1980.