

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУР *BACILLUS THURINGIENSIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Л.А. ЧИЛ-АКОПЯН, [Б.Д. ХЛИСТОВСКИЙ], М.О. АДАМЯН, М.А. КИНОСЯН

Институт микробиологии НАН и Республиканский Центр депонирования микробов НАН и
Министерства образования и науки РА, 378510, г. Абовян
Северо-Кавказский НИИ фитопатологии, 350039, г. Краснодар

Показана возможность использования гусениц тутового шелкопряда для биотестирования инсектицидных препаратов из культур *B. thuringiensis*. Приводится описание методики для практического применения.

Ցույց է տրված բթևնու շերամի բրթորների օգտագործման հնարավորությունը *B. thuringiensis*-ի կուլտուրաների միջատասպան ակտիվության բիոտեստավորման համար: Բերված է գործնական կիրառման մեթոդի նկարագրությունը:

The possibility of use of silkworm larvae for the bioassay of insecticide activity of *B. thuringiensis* cultures has been shown. The description of method for practical application has been presented.

Тутовый шелкопряд - бактериальные инсектициды - биотестирование.

Для оценки активности производимых инсектицидов из культур *B. thuringiensis* (BT) используется метод биотестирования с применением в качестве тест-объектов различных насекомых [5]. В основе этих способов лежит биологический метод определения минимальной концентрации (или дозы) препаратов, вызывающей 50%-ную гибель тест-насекомых (JK_{50}).

Основным насекомым, используемым в качестве тест-объекта для препаратов, выпускаемых промышленностью СНГ, является непарный шелкопряд (НШ). Источником материала для биотестирования яиц НШ являются их природные популяции. Следствием этого является нестандартность тест-объекта, использование грены, инфицированной латентным вирусом, что приводит к противоречивым результатам в оценке вирулентности препаратов. Кроме того, чрезвычайная аллергогенность НШ затрудняет работу с ним.

Целью настоящей работы являлась разработка методики определения инсектицидной активности культур BT с применением тутового шелкопряда (ТШ).

ТШ имеет ряд существенных достоинств [5]: широкий спектр чувствительности, возможность круглогодичного хранения и оживления стандартной грены (яйцекладок) заводского изготовления, удобные размеры личинок и поверхностное расположение на корме, доступность и дешевизна искусственной питательной среды (ИПС).

Выполненные нами ранее исследования подтвердили достоинства ТШ в качестве тест-объекта [6]. В настоящей работе приведены итоги дальнейших исследований с описанием методики, выполненных в Институте микробиологии НАН Армении (ИНМИА).

Материал и методика. В опытах использована грена тугового шелкопряда гибрида К₁хК₂ (Кавказская1хКавказская2) с гренажного завода г.Георгиевска Ставропольского края. Грену инкубировали в соответствии с правилами ее инкубации на гренажных заводах [3]. Выращивание гусениц проводилось в чашках Петри с ИПС [4] в нашей модификации следующего состава (%): порошок листьев шелковицы-14; порошок зародышей пшеницы-11; пшеничная мука-16; глюкоза-3; смесь минеральных солей Вессона-0,5; аскорбиновая кислота-0,2; пропионовая кислота-0,25. Режимы выращивания гусениц; 23, 26, 29^o ± 1^o; относительная влажность 65-70%.

Для испытаний вирулентности к ТШ использованы штаммы (в виде культуральной жидкости-КЖ), приведенные в табл. 1.

Таблица 1. Испытанные штаммы.

Подвиды и серотипы	Номера штаммов		Название препарата
	оригинальные	по коллекции	
<i>B. thuringiensis</i>			
<i>thuringiensis</i> - 1	202	1135	Битоксибациллин
<i>kurstaki</i> - 3	7-52	1194	Лендодил
<i>dendrolimus</i> - 4	49/8	1138	Центробациллин
<i>galleriae</i> - 5	69/6	1055	Энтобактерия
<i>caucasicus</i> - 10	844	844	БИП

КЖ получали выращиванием штаммов на питательной дрожжевополисахаридной среде- ЛПС (ВВК-3,0%, кукурузная мука-1,5%) до полной споруляции. Титр спор определяли рассевом на МПА в чашках Петри и в счетной камере Горяева.

Методика испытаний вирулентности культур на ТШ, изложенная ниже, разработана с учетом методик биотестирования на других насекомых (ГУ на бактериальные инсектицидные препараты).

Инсектицидная активность определялась по ЛК₅₀ от КЖ штаммов и ее четырех последовательных десятикратных разведений, %: 100; 10; 1; 0,1; 0,01.

Опыты проводились на однородных личинках, появившихся на третий возраст. Гусеницы по 10 или 15 особей раскладывались в чашки Петри на листок бумаги и оставались без корма в течение 16-18 часов. Испытуемые суспензии КЖ, в количестве 0,5мл, тщательно смешивались с 5г ИПС и в виде ломтиков подкладывались гусеницам. Повторяемость опытов 3-5-кратная. В контрольном опыте вместо КЖ в ИПС добавлялось соответствующее количество стерильной воды.

Инсектицидная активность определялась по гибели гусениц ежедневно в течение 6 дней. После подкормки препаратом гибель гусениц определялась по формуле Аббота. По полученным данным гибели гусениц методом Кербера определялась ЛК₅₀ [2]. Доверительный интервал вычислялся по методу Де Вейра [1].

С целью выяснения корреляции степени вирулентности штаммов к ТШ и насекомому вредителю поставлен сравнительный опыт. Эксперимент с ТШ проводился одновременно на ИПС и листе шелковицы, а с кольчатым шелкопрядом (КШ)- на листе яблони. Листья брались в равном с ИПС весовом отношении. Испытуемая суспензия наносилась на лист также в равном количестве, из расчета 0,1мл на 1г корма. Отличие состояло в том, что суспензия вносилась в 5г ИПС однократно и корм подавался в течение всего времени наблюдения. Листья, в количестве 1г, смачивались суспензией (0,1мл) и скормливались ежедневно. В сумме вес скормленного листа равнялся весу ИПС в опыте.

Результаты и обсуждение. Данные, представленные в табл. 2, убеждают, что при внесении КЖ и его разведений в 1г корма в количестве 1мл достигается гибель гусениц ТШ в пределах 0-100%.

Для определения оптимальной температуры при оценке инсектицидности бактерий гусеницы ТШ выращивались в разных температурных условиях. Полученные данные свидетельствуют о том, что температура 29^o наиболее благоприятна для ускоренного выявления результатов гибели личинок (табл.3).

ИНСЕКТИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ

Таблица 2. Динамика гибели гусениц при испытании различных концентраций КЖ штамма 844 (средние данные трех повторностей; 26°).

Концентрация КЖ, %	Концентрация КЖ, млн спор/г корма	Гибель гусениц по дням, %					
		1	2	3	4	5	6
100	350	82	89	95	97	97	97
10	35	44	55	69	93	97	97
1	3,5	0	2	4	20	22	22
0,1	0,35	0	0	0	9	11	22
0,01	0,035	0	0	2	2	2	2
Контроль (без КЖ)	-	0	0	2	2	4	4
млн спор/г субстрата		60,2	38,0	25,1	7,9	7,2	5,5

Таблица 3. Биологическая активность штамма 844 при выращивании гусениц ТШ в разных температурных условиях.

Температура, °С	Число повторностей в опыте	Показатели гибели гусениц	Результаты опытов по дням					
			1	2	3	4	5	6
23	3	1*	57,5	39,8	16,8	14,9	9,1	5,3
		2**	0	0	0	10,6	10,6	10,6
26	3	1	60,2	38,0	25,1	7,94	7,24	5,49
		2	0	0	2	2	4	2
	3	1	95,4	34,1	19,6	10,6	7,3	6,4
		2	0	0	0	0	0	0
29	3	1	28,8	14,1	8,91	3,46	2,18	1,81
		2	0	0	2	2	2	4
	4	1	21,05	12,3	9,7	8,3	5,93	5,93
		2	0	0	0	0	0	0
	5	1	22,3	15,5	10,0	7,7	-	-
		2	0	4	5,3	8	-	-
31	3	1	42,3	23,2	12,8	8,5	6,5	4,6
		2	0	2	4	4	6,6	6,6

Примечание: * ЛК₅₀, млн спор/г корма; ** гибель гусениц в контроле, %; (-) - данные отсутствуют.

При 29° и прочих ранних условиях ЛК₅₀ более чем вдвое ниже, чем при других испытанных температурах, что свидетельствует о преимуществе постановки опытов при этой температуре. В результате получены равнозначные температурные оптимумы для ВТ и развития ТШ.

Для выяснения влияния антисептика - пропионовой кислоты - на вирулентность испытываемых штаммов проведены сравнительные испытания ИИС с добавлением полной дозы - 0,5%, рекомендуемой авторами [4], половины дозы и без антисептика (табл.4).

Таблица 4. Биологическая активность штамма 844 при разных дозах антисептика (средние данные 4-х повторностей; 29°).

Дозы антисептика, %	ЛК ₅₀ , млн спор/г корма по дням					
	1	2	3	4	5	6
0,5	19,1	13,5	8,7	6,5	4,8	4,3
0,25	21,1	12,3	9,7	8,3	5,9	5,9
Контроль (без антисептика)	33,1	7,0	4,8	Опыт не учтен		

Приведенные данные свидетельствуют об отсутствии ингибирующего действия антисептика на вирулентность испытываемой культуры. Разницы между применяемой полной и половинной доз антисептика не отмечено. Для дальнейших работ принято применение половинной дозы антисептика.

В следующей серии опытов показано, что наравне с гусеницами III возраста ТIII, могут быть использованы в равной мере, и почти с аналогичными показаниями ЛК₅₀, также и гусеницы IV и V возрастов (табл.5). Однако испытания на гусеницах III возраста целесообразнее и экономичнее.

Таблица 5. Биологическая активность штамма 844 для гусениц ТIII разных возрастов (средние данные 3-х повторностей, 29°).

Возраст гусениц	ЛК ₅₀ , млн спор/г корма по дням					
	1	2	3	4	5	6
III	19,05	13,5	8,7	6,45	4,78	4,3
IV	13,8	7,7	6,9	4,3	2,45	2,45
V	12,3	4,7	2,3	1,7	1,3	1,02

В динамике летального действия на гусениц КIII и ТIII отмечены индивидуальные особенности. Однако на пятые сутки этот показатель выравнивается. Эти данные свидетельствуют о равноценности получаемых данных летальности тутового шелкопряда и других вредителей от культур ВТ (табл.6).

Таблица 6. Вирулентность штамма 844 к тутовому и кольчатому шелкопрядам (средние данные 3-х повторностей, 26°).

Наскомые	Корм	ЛК ₅₀ , млн спор/г корма по дням					
		1	2	3	4	5	6
Тутовый шелкопряд (III возраста)	ИПС	28,8	14,1	8,91	3,16	2,18	1,81
	Лист шелковницы	31,6	10,96	6,91	4,1	2,12	0,99
Кольчатый шелкопряд (V возраста)	Лист яблони	0	370,9	86,96	20,07	6,6	3,2

Для выбора оптимального дня учета проанализированы данные таблиц. Установлено, что наиболее целесообразным является учет на третьи сутки. Ускорение учета вдвое является также преимуществом при сравнении с НИИ, следовательно, описываемый метод можно рекомендовать как экспресс-метод. Более того, учитывая скорость гибели гусениц с первого дня, можно оценивать штаммы через двое и одни сутки, приняв за стандарт показатели ЛК₅₀ соответствующих дней для каждого штамма.

В табл. 7 приведены сведения о биологической активности к ТIII штаммов,

Таблица 7. Сравнительная вирулентность промышленных штаммов ВТ к гусеницам ТIII (шаг разведения КЖ 1:10, средние данные 5-ти повторностей, 29°).

Штаммы во НИИМИА	Титр КЖ, млрд/мл	Показатель гибели гусениц*	ЛК ₅₀ , млн спор/г корма по дням					
			1	2	3	4	5	6
			1135	2,8	1	100	100	100
1194	2,83	1	6,12±0,06	6,1±0,09	3,6±0,39	2,6±0,18	2,04±0,19	1,17±0,29
		2	3,71±0,6	2,1±1,6	1,5±0,2	1,12±0,22	0,87±0,1	0,89±0,1
1138	5,5	1	94,6	97,3	97,3	98,6	98,6	100
		2	144,5±0,19	117±0,24	91,2±0,2	69,1±0,03	50,1±0,07	35,5±0,37
1055	3,3	1	97,3	100	100	100	100	100
		2	13,91±0,2	6,91±0,14	5,12±0,15	3,98±0,14	3,55±0,13	1,77±0,17
844	3,5	1	90,6	97,3	100	100	100	100
		2	28,8±0,45	14,1±0,21	8,91±0,2	3,46±0,31	2,1±0,02	1,81±0,17

Примечания: 1-средний % погибших гусениц от наивысшей испытанной концентрации - КЖ; 2-среднее значение ЛК₅₀, млн спор/г корма (средняя ошибка с вероятностью 95%, гибель в контроле составляла не более 4%).

являющихся основой производства бактериальных инсектицидных препаратов против вредителей-чешуекрылых. Данные получены при проведении опыта в полном соответствии с условиями разработанной методики. Аналогичные данные получены при разведении КЖ с шагом 1:2.

Проведенные исследования позволяют рекомендовать тутовый шелкопряд в качестве тест-объекта для оценки активности бактериальных инсектицидных препаратов из культур *Bt*, используемых против вредоносных насекомых отряда чешуекрылых.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантом ИНТАС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. 180, Л., 1962.
2. Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А. Идентификация культур *B. thuringiensis* и оценка их патогенных свойств. Методические указания. Л., 1984.
3. Основные правила по приготовлению промышленной грены тутового шелкопряда на гренажных заводах. М., 1984.
4. Руднев Е.Д., Хлистовский Е.Д., Шаболта О.М., Кондратьева Л.А. А.С. СССР 1106457, Бюлл. N29, 1984.
5. Хорходин Е.Г., Шагов Е.М. Сельхоз. биология, 4, 37-43, 1987.
6. Чил-Акопян Л.А., Кондратьева Л.А., Хлистовский Е.Д., Адамян М.О., Киносян М.А., Арутюнян Е.Г. Биолог. журн. Армении, 41, 11, 938-940, 1988.

Поступила 17.VIII.1995.

Биолог. журн. Армении, 1-2 (49), 1996

УДК 579.66:632.951

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И РЕПРОДУКЦИЯ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ЛАРВИЦИДНЫХ КУЛЬТУР *BACILLUS THURINGIENSIS* И *BACILLUS SPHAERICUS* В ПОЧВЕ

К.О. ЧИЛИНГАРЯН

Республиканский Центр депонирования микробов НАН
и Министерства образования и науки РА, 378510, г. Абовян

Изучалась степень сохранения жизнеспособности и инсектицидной активности культур, рекомендуемых в качестве пролупецтов новых бактериальных препаратов против комаров в трех типах почв.

Показано резкое снижение титра культур во всех типах почвы в течение первого месяца, в дальнейшем, от 5 месяцев до года, отмечалось повышение титра у культур *B. thuringiensis* в черноземной почве, а у *B. sphaericus* во всех типах почв. Вирулентность культур сохранялась в течение всего срока наблюдений на высоком уровне.

Ուսումնասիրվել են նոր բակտերիալ մոնակասայան պրեպարատների համար երաշխավորված կոլտուրաների կենսունակության պահպանման աստիճանը և ինսեկտիցիդային ակտիվությունը երեք տիպի հողերում:

Ցույց է տրվել, որ բոլոր տիպի հողերում առաջին ամսվա ընթացքում հետազոտված կոլտուրաների տիտրը կտրուկ իջել է: Հետագայում հինգերորդ ամսից մինչև 1 տարվա ընթացքում նկատվել է *B. thuringiensis* կոլտուրաների տիտրի բարձրացում սնահողում, իսկ