

## ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИНСЕКТИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ж.Х. ОРМАНЯН, П.Е. ТАТЕВОСЯН, М.А. КИНОСЯН, Э.К. АФРИКЯН

Республиканский Центр депонирования микробов НАН Армении, 378510, г.Абовян

Проведен микробиологический анализ 82 насекомых из различных отрядов, собранных из различных экологических регионов мира. Результаты анализов показали более обильную энтомопатогенную микрофлору образцов из Армении, представленную аэробными спорообразующими бактериями. Изучено энтомопатогенное действие 55 штаммов *Bacillus thuringiensis*, 74 штаммов *Bacillus sphaericus* и 118 штаммов неидентифицированных культур бацилл. Большая часть штаммов была выделена из мертвых насекомых *Coleoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera*, собранных в Армении.

Высокая инсектицидная активность культур была установлена против личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say., *Pieris brassicae* L., *Pieris rapae* L., *Plutella maculipennis* Curt., *Hyponomeuta padellus* L., *Recurvaria nanella* Hb. К испытанным 8 видам комаров *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Uranotaenia* обнаружен 31 новый штамм *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* с высокой москитоцидной активностью.

Վատարվել է միջատների 82 նմուշների հետազոտություն տարբեր կարգերից, որոնք հավաքված էին աշխարհի տարբեր եկոլոգիական շրջաններից: Վերլուծության արդյունքները ցույց տվեցին, որ ավելի առատ ենթոնոպաթոգեն միկրոֆլորա նկատվում է Հայաստանից ստացված նմուշներում, որը ներկայացված է աերոբ սպորառաջացնող բակտերիաներով: Հետազոտվել է *Bacillus thuringiensis*-ի 55 շտամի, *Bacillus sphaericus*-ի 74 շտամի և չիդենտիֆիկացված բացիլների 118 շտամի ենթոնոպաթոգեն ազդեցությունը: Շտամների մեծամասնությունը անջատվել էր հետևյալ մահացած միջատներից՝ *Coleoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera*, որոնք հավաքվել էին Հայաստանում:

Հաստատվել է հետազոտված կուլտուրաների բարձր միջատասպան ակտիվություն հետևյալ միջատների թրթուրների դեմ *Leptinotarsa decemlineata* Say., *Pieris brassicae* L., *Pieris rapae* L., *Plutella maculipennis* Curt., *Hyponomeuta padellus* L., *Recurvaria nanella* Hb.: Փորձարկված *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Uranotaenia* մոծակների 8 տեսակների նկատմամբ հաստատվել են 31 նոր, բարձր մոծակասպան ակտիվությամբ *B. thuringiensis*-ի և *B. sphaericus*-ի շտամներ:

The microbiological analysis of 82 specimens of insects of various orders, collected from different ecological regions all over the world, have been carried out. The samples analysed from Armenia revealed more abundant entomopathogenous microflora represented by aerobic spore-forming bacteria. As the result of researches 55 strains of *Bacillus thuringiensis*, 74 strains of *Bacillus sphaericus* and 118 strains of non-identified cultures of bacilli have been isolated and studied for entomopathogenous action. The most part of the strains have been isolated from the dead insects of *Coleoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera* collected from Armenia.

High insecticide activity among the cultures tested has been established against the larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say., *Pieris brassicae* L., *Pieris rapae* L., *Plutella maculipennis* Curt., *Hyponomeuta padellus* L., *Recurvaria nanella* Hb., and eight species of mosquitoes *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Uranotaenia*. They have revealed 31 new strain of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* with high mosquitoicide activity.

*Энтомопатогенные бациллы - ларвициды - колорадский жук*

Идея использования микроорганизмов против вредоносных насекомых возникла на заре развития микробиологии. Наблюдения над эпизоотиями у насекомых и выявление микрорганйзмов - возбудителей этих инфекций -

явились основой работ по использованию микроорганизмов для борьбы с вредоносными насекомыми.

Микробиологический метод охватывает использование против насекомых микроскопических нематод, простейших, грибов, бактерий, риккетсий и вирусов. Однако практическое применение до настоящего времени нашли в основном бактерии, в особенности спорообразующие. В настоящее время они являются наиболее признанной и перспективной группой энтомоцидных микроорганизмов. Особый интерес вызывают виды, образующие специфические энтомоцидные токсины.

Представители энтомоцидных бактерий *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus sphaericus* сейчас широко используются для борьбы с вредителями растений - чешуекрылых, двукрылых, жесткокрылых, прямокрылых и др. [12]. Наиболее перспективные из них явились основой для производства микробиологических средств борьбы с вредными насекомыми [2, 8, 10]. Несмотря на накопленный в микробиологической литературе большой объем исследований по энтомоцидным спорообразующим бактериям, интерес к ним не пропадает до наших дней [4, 6, 9, 11].

В результате многолетних работ Института микробиологии и Республиканского Центра депонирования микробов (РЦДМ) НАН Армении выделено и изучено большое число энтомопатогенных микроорганизмов, в особенности спорообразующих бацилл-продуцентов инсектицидных токсинов. В настоящее время в РЦДМ сохраняется обширная коллекция (более 2000 штаммов) энтомоцидных бацилл, выделенных из погибших насекомых и других субстратов различных регионов мира. Большинство выделенных штаммов идентифицированы как представители *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*, продуцирующих специфические энтомоцидные кристаллы [7].

Целью нашей работы явилось изучение экологии энтомоцидных бацилл в разных отрядах насекомых из разных регионов мира, с поиском новых перспективных штаммов, вирулентных против колорадского жука, кровососущих комаров и вредителей овощных, плодовых культур.

Учитывая анализ насекомых, отражающих большие эколого-географические условия их обитания, нами была поставлена задача выявления биоразнообразия энтомопатогенных спорообразующих бактерий как ведущей группы микробов для производства инсектицидных препаратов.

**Материал и методика.** Объектами исследований служили в основном погибшие насекомые, собранные в Армении (Абовян, Агверан, Анкаван, Бюракан, Веди, Гарни, Гегард, Гукасян, Джржеж, Ерсван, Масис, Нурнус, Птхни, Сараландж, Хосровский лес), а также из Австралии, Вьетнама, Заира, Индонезии - остров Бали и Сулавеси, Китая, Колумбии, Мозамбика, Новой Гвиней - Соломоновы острова, Сингапура, Средней Азии, Филиппин.

Всего было обследовано 82 образца различных видов насекомых, принадлежащих к отрядам стрекоз (*Odonoptera*), таракановых (*Blattoptera*), богомоловых (*Mantoptera*), палочников (*Phasmoptera*), прямокрылых (*Orthoptera*), полужесткокрылых (*Heteroptera*), жесткокрылых (*Coleoptera*), сетчатокрылых (*Neuroptera*), перепончатокрылых (*Hymenoptera*), двукрылых (*Diptera*), чешуекрылых (*Lepidoptera*).

Для выделения бактерий образцы насекомых после растирания с водой и их последующей пастеризации при температуре 70° в течение 20 мин высевали на поверхность

среды в чашках Петри. Рост бактерий учитывали на 2-3 сутки инкубации при 30°. Культуры разных видов после микроскопии световым микроскопом с фазовым контрастом выделяли и очищали. По изучению инсектицидной активности выделенных новых культур бактерий в отношении различных возрастов личинок и имаго колорадского жука и других листогрызущих вредителей овощных и плодовых культур (капустная белянка, капустная моль, капустная совка, репная белянка, плодовая моль, листовая вертунья), многоядных вредителей (саранчовые, таракановые) проводили по предложенной методике Гара [3].

Инсектицидные свойства новых культур в отношении личинок комаров рода *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Uranotaenia* изучали по методу Карпова [5]. Мосkitоцидную активность новых бактериальных культур устанавливали путем инфицирования воды, предназначенной для подопытных личинок, помещенных в химические стаканы емкостью 100мл. Изученную культуру микроорганизма, снятую с поверхности твердой питательной среды, сначала суспендировали в пробирке в 1 мл воды, затем вливали в стакан с 19 мл дихлорированной воды, куда вносили 10 личинок комаров природной популяции, собранных в водоемах районов Армении. В контроле использовали стерильную воду. Температурный режим - 26-27°. Учет погибших личинок проводили в первые часы после поставки опыта и через 24-48 ч.

**Результаты и обсуждение.** В результате исследований патогенной микрофлоры насекомых, собранных из разных экологических регионов мира, установлено, что из 82 образцов 10-и отрядов насекомых наиболее богатыми патогенной микрофлорой оказались образцы насекомых, собранных в разных экологических нишах Армении. Из общего числа выделенных культур *B. thuringiensis* (55 штаммов), *B. sphaericus* (74 штаммов), *Bacillus sp.* (118 штаммов) на армянскую популяцию приходится 69,2; 78,4; 59,3% соответственно. Наибольшее количество энтомоцидных штаммов, выделенных из образцов представителей отрядов *Coleoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera*, также относится к армянской популяции (табл. 1).

Представленные данные отражают доминантную бациллярную микрофлору обследованных насекомых. Как показали результаты наших анализов, она представлена *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* и группой бацилл, условно объединенных в *Bacillus sp.* Как показывают приведенные данные, указанные группы должны считаться весьма распространенными бактериями и, по-видимому, ведущими энтомопатогенами.

Считаем необходимым подчеркнуть широкое распространение культур *B. sphaericus*, который обнаруживается в большом разнообразии. В ряде случаев эта группа бацилл обнаруживалась в преобладающем количестве, как ведущий компонент микрофлоры.

В процессе выделения чистых культур *B. thuringiensis* особое внимание обращалось на форму кристаллоидных эндотоксинов. Установлено, что из разных форм кристаллов наиболее распространенными оказались шаровидные, округлые (22 штамма) и ромбовидные (13 штаммов). Установлено, что формы кристаллов могут служить важным дополнительным признаком при поиске энтомоцидных штаммов бацилл с высокими токсичными свойствами. Большой фактический материал, опубликованный по данному вопросу, подтверждает наличие коррелятивной зависимости между формой кристаллоидных токсинов (эндотоксина) и спецификой их инсектицидного действия. Так, как правило, ромбовидные кристаллы определяют выраженную активность их к чешуекрылым. Округлые и нерегулярные

кристаллоподобные образования в основном проявляют москитоцидное действие (*ssp. israelensis*). Квадратные или прямоугольные (цилиндрические) кристаллы определяют инсектицидное действие к *Coleoptera*, в частности к личинкам колорадского жука (*ssp. tenebrionis, sandiego*).

В этой связи в табл. 1 представлена характеристика морфологии кристаллов, дающая представление о природе выделенных штаммов.

Таблица 1. Распространение энтомопатогенных бацилл в микрофлоре различных насекомых

Отряды насекомых	Происхождение	Число обследов. образцов	Дополнительные группы бацилл				
			<i>B. thuringiensis</i> с			BS	B.sp.
			ромб.кр.	окр.кр.	квадр.кр.		
<i>Odonoptera</i>	Индонезия	1	-	-	-	-	1
	Филлипины	1	1	-	-	-	1
<i>Blattoptera</i>	Армения	2	-	-	-	3	4
	Колумбия	1	-	-	-	3	2
<i>Mantoptera</i>	Армения	2	1	3	-	1	2
<i>Phasmoptera</i>	Австралия	2	-	3	-	-	-
	Новая Гвинея	5	-	2	2	2	6
<i>Orthoptera-Saltatoria</i>	Армения	2	-	2	-	1	7
	Филиппины	1	-	-	-	-	2
<i>Heteroptera-Hemiptera</i>	Армения	6	1	1	1	1	7
<i>Coleoptera</i>	Армения	19	9	5	-	29	23
	Заир	1	-	1	-	1	3
	Средняя Азия	1	-	1	-	1	3
<i>Neuroptera</i>	Армения	10	4	1	1	7	9
<i>Diptera</i>	Армения	1	-	-	-	8	3
<i>Lepidoptera</i>	Армения	11	2	5	2	8	15
	Вьетнам	1	-	-	-	-	1
	Индонезия	6	1	2	-	2	12
	Китай	1	-	1	-	1	1
	Мозамбик	1	-	-	-	-	2
	Новая Гвинея	1	2	-	-	-	-
	Сингапур	1	-	-	-	-	2
	Филиппины	5	1	-	-	7	12
<b>Итого</b>		<b>82</b>	<b>55</b>			<b>74</b>	<b>118</b>

Условные сокращения: BS - *B. sphaericus*, B.sp. - *Bacillus sp.*; ромб.кр. - ромбовидные кристаллы, окр. кр. - округлые кристаллы, квадр. кр. - квадратные и прямоугольные кристаллы.

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) - один из опаснейших вредителей картофеля, баклажанов, томатов, перца, табака и других культур семейства пасленовых. Для борьбы с колорадским жуком в основном используется экологически небезопасный химический метод. Это вызывает необходимость настойчивых поисков альтернативных средств защиты растений, в том числе микробиологического метода борьбы с вредителями, с

использованием спорообразующих бактерий. В этой связи нами проводились исследования по изучению энтомоцидной активности выделенных новых штаммов спорообразующих культур *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* и новых видов разновидностей бацилл к колорадскому жуку.

Источником выделения новых штаммов оказались 10 отрядов мертвых насекомых, собранных в разных регионах мира (Австралия, Заир, Индонезия - остров Сулавеси, Китай, Колумбия, Новая Гвинея, Соломоновы острова, Средняя Азия, Филиппины).

Тест-объектом служили личинки младших (I-II) и старших (III-IV) возрастов, а также имаго колорадского жука. Была изучена инсектицидная активность 107 новых штаммов. Культуры выращивались на жидкой рыбопептонной среде до полной споруляции. В испытаниях применялись суспензии с титром 1,5-2 млн спор/мл.

В результате исследований установлено, что из испытанных 107 штаммов по отношению к личинкам младших возрастов колорадского жука вирулентными оказались штаммы *B. thuringiensis* 328-1, 322-1, 251-1, 27-2-1 с ромбовидными кристаллами. 100%-ная гибель личинок младших возрастов наблюдалась в течение 7 дней (табл. 2). Личинки же старших возрастов (III-IV) и имаго колорадского жука к испытанным штаммам в течение 15 дней не проявили признаков восприимчивости к использованным штаммам.

Таблица 2. Инсектицидное действие новых штаммов энтомопатогенных бацилл

Штаммы, происхождение	Тест-объект	Характер действия		
		Москито- цидный	На личинок колорадского жука	На подопытных насекомых
<i>B. thuringiensis</i> 430-1 (Австралия), 363-1, 71-1 (Армения), 329-2 (Китай), 427-1 (Бразилия)	<i>Aedes s.cuspis</i> , <i>Anopheles maculipennis</i> , <i>A. claviger</i> , <i>Culex pipiens</i> , <i>C. modestus</i> , <i>C. theileri</i> , <i>C. territans</i> , <i>C. hortensis</i> , <i>Uranotaenia unguiculata</i>	Гибель личинок в течение 10-60 мин	-	-
<i>B. sphaericus</i> 381-1-1, 338-1, 1-1 (Армения), 335-2 (Филиппины)		Гибель личинок спустя 15-24 часа	-	-
<i>B. thuringiensis</i> 328-1 (Новая Гвинея), 251-1, 27-2-1 (Армения), 322-1 (Средняя Азия)	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.	-	Гибель личинок младших возрастов в течение 3-7 дней	-
<i>B. thuringiensis</i> 328-1 (Новая Гвинея), 71-1, 340-1 (Армения)	<i>Pieris brassicae</i> L., <i>P. rapae</i> L., <i>Plutella maculipennis</i> Curt., <i>Hyponomeuta podellus</i> L., <i>Recurvaria nanella</i> L.	-	-	Гибель в течение 2-3 дней

В последние годы на территории Армении возобновились вспышки популяций кровососущих комаров разных видов, принадлежащих к родам *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* и *Uranotaenia*. Среди обнаруженных девяти видов более опасным является вид *Anopheles maculipennis*, являющийся переносчиком и распространителем возбудителя малярии. Метод борьбы против комаров до наших дней в основном химический, отрицательное последствие которого хорошо известно. Безопасным для человека и окружающей среды способом борьбы является биологический метод и среди них главный - микробиологический.

Целью наших исследований явилось изучение москитоцидного действия новых перспективных штаммов на личинки комаров девяти видов, выявленных во временных водоемах Эчмиадзинского, Октемберянского, Армавирского, Араратского и Массисского районов Армении. Изучению подверглись 119 новых штаммов *B. thuringiensis* (58 штаммов), *B. sphaericus* (52 штамма) и *Bacillus sp.* (9 штаммов). Культуры бактерий выращивались на рыбопептонной жидкой среде до полного высыпания спор. В опытах применялись суспензии с титром 180-220 тыс. спор/мл.

В результате испытаний установлено, что к личинкам комаров сильное москитоцидное действие проявили штаммы 430-1, 71-1, 363-1, 329-2, 427-1, принадлежащие к *B. thuringiensis* с шаровидными кристаллами. При этом 100%-ная гибель личинок наблюдалась в течение 10-60 минут. Таким образом, в наших исследованиях подчеркивается корреляция между токсичностью штаммов *B. thuringiensis* и формой образуемых ими кристаллических эндотоксинов (табл. 2).

Из испытанных штаммов *B. sphaericus* к личинкам комаров вирулентными оказались штаммы 381-1-1, 1-1, 338-1 и 335-2. При этом 100%-ная гибель личинок по сравнению с *B. thuringiensis* наблюдалась гораздо дольше - в течение 15-24 час. Испытанные штаммы *Bacillus sp.* по отношению к личинкам комаров москитоцидного действия не проявили в течение нескольких суток.

Для изучения спектра действия новых перспективных штаммов тест-объектами служили листогрызущие вредители овощных (капустная белянка, капустная моль, капустная совка, репная белянка), плодовых (плодовая моль, листовая вертунья) культур, а также многоядных вредителей (саранчовые и черный таракан).

Изучена энтомоцидная активность ряда перспективных новых штаммов *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* и *Bacillus sp.* к упомянутым выше насекомым.

В результате исследований установлено, что по отношению к отобранным насекомым энтомоцидной активностью обладают только штаммы *B. thuringiensis*. Из испытанных штаммов своей высокой активностью и спектром действия выделяются штаммы 71-1, 328-1 и 340-1, при действии которых в течение 2-3 дней наблюдается 100%-ная гибель гусениц капустной белянки, капустной моли, репной белянки, плодовой моли и листовой вертуньи (табл. 2).

Устойчивыми к действию изучаемых штаммов оказались капустная совка, саранчовые и черный таракан.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что

энтомопатогенные бациллы *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* и родственные им виды широко распространены в микрофлоре насекомых, составляя в павших особях ее ведущий компонент. Обнаруживается их большое разнообразие, что должно явиться основой дальнейших экологических исследований для получения новых перспективных штаммов для производства высокоэффективных бактериальных инсектицидов против особо опасных вредоносных насекомых.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Изд. АН Арм. ССР, Ереван, 9-25, 1973.
2. Африкян Э.К. Успехи микробиологии. 10, 142-172, М., Наука, 1975.
3. Гар К.А. Методы испытания токсичности и эффективности инсектицидов. Изд. СХЛ, М., 1963.
4. Калмыкова Г.В., Бурцева Л.И., Юдина Т.Г. Микробиология, 64, 4, 461-468, 1995.
5. Карпов Э.Г., Игнатъев В.И., Попов А.И. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей. М., 1984.
6. Мельникова И.Б., Акимова М.Л., Лин Фу и др. Биотехнология, 1, 17-22, 1996.
7. Орманян Ж.Х., Татевосян П.Е., Киносян М.А., Африкян Э.К. "Новые энтомопагенные бациллы для производства бактериальных инсектицидов. Конверсионный потенциал Армении и программы МНТЦ". Международный семинар, Ереван, 2-7 октября 2000г.
8. Сб. науч. тр. ВАСХНИЛ СО. Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений. 136, Новосибирск, 1987.
9. Солонцов И.Л., Юдина Т.Г. Микробиология, 65, 2, 235-240, 1996.
10. Чилингарян В.А., Орманян Ж.Х., Казарян Б.К. Биолог. журн. Армении, 33, 4, 403-415, 1980.
11. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Микробиология, 66, 1, 25-31, 1997.
12. Hofte V.H., Whiteley H., Microb., Rev., 53, 2, 242-255, 1989.

Поступила 20.V.2003