

Т.І. Пати́ка, М.В. Бойко, М.В. Пати́ка

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, корп. 4., Київ, 03041, Україна*

БІОТЕХНОЛОГІЧНА ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНІСТЬ МЕТАБОЛІТНОГО СПОРО-КРИСТАЛІЧНОГО КОМПЛЕКСУ ТА ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Представлено дані про поліфункціональні властивості бактеріальних штамів природного типу *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* з ентомотоксичними та антифунгальними ефектами щодо личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. і фітопатогенних мікроміцетів *Venturia* spp., ізольованих з насаджень кісточкових культур. Показано, що аксенічна культура штаму *B. thuringiensis* № 87/3 після селекції *in vitro* має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу складає від 3,0 до 3,6 млрд./мл культуральної рідини), ентомоцидності (96,0-97,0%) та антифунгальної дії, яка проявляється у змінах морфогенезу мікроміцету і ступені інгібування проростання конідій в межах 86-93 %.*

*Ключові слова: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, споро-кристалічний комплекс, ентомотоксична дія, антифунгальний ефект*

Розробка технологій мікробіологічного захисту рослин з пошуком альтернативних шляхів зниження ризику виникнення та поширення патогенів різної етіології, контролю фітофагів на сьогоднішній день є пріоритетним і прогресивним напрямком систем сільського господарства. Використання сучасних біотехнологічних препаратів не лише підвищує стійкість рослин до шкочинних організмів, а й сприяє оздоровленню агроценозів, зменшенню дії дестабілізуючих факторів основних сільськогосподарських культур [11]. В результаті інтенсивних досліджень останніх років у світових наукових центрах розробляються та впроваджуються препаративні форми мікробних препаратів для захисту рослин на основі живих спор, антагоністів та їх метаболітів, швидкодіючих токсигенних компонентів тощо. Як основу бактеріальних препаратів для фітозахисту активно використовують ризосферні мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Bacillus* з потенціалом ентомоцидної та антагоністичної активності відносно широкого кола комах-шкідників та фітопатогенних мікроорганізмів за рахунок синтезу метаболітів різної природи [3,12]. Деякі представники роду *Bacillus* відомі як потенційні еліситори, за допомогою яких можливо контролювати та значно знижувати рівень ураження патогенами рослин на різних стадіях онтогенезу. Бактерії роду *Bacillus* займають особливе місце в агробіоценозах – мають різний рівень контагіозності та слугують для створення штучних вогнищ епізоотій, стримують масове розмноження та наростання чисельності фітофагів [1,3]. Біологічне різноманіття, адаптивність та багатофункціональність білкових токсинів бактерій *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) дозволяє ефективно контролювати широкий спектр комах-шкідників (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*). Високий токсигенний потенціал та знання специфічних особливостей взаємодії

«патоген-хазяїн» (різні реакції та морфофункціональні перетворення на клітинному й субклітинному, організмовому та популяційному рівнях), градація щодо перебігу інфекційно-патологічних процесів в цільових організмах (розподіл за патологічними варіантами) розширюють можливість використання вищезазначених мікробних агентів як продуцентів біопрепаратів фітозахисного призначення. На сьогодні за специфічністю та селективністю дії досліджено ентомоцидні токсини *Bt* класів *Cry I*, *Cry IX* – для окремих представників лускокрилих (*Lepidoptera*), також *Cry III* для жорсткокрилих (*Coleoptera*) та *Cry IV*, *Cry XI* відповідно для двокрилих (*Diptera*: комари (*Culicidae*), мошки (*Simuliidae*)) [9]. Ендотоксини *Cry II* мають подвійну специфічність з різним перебігом інфекційно-патологічного процесу для *Lepidoptera* і *Diptera*. Дані інсектицидні білки кодуються генами, зазвичай локалізованими на великих плазмідах розміром більш ніж 30 МДа та можуть значно відрізнятися за структурою та інсектицидною активністю. Встановлено, що гени, які кодують ендотоксини і регулюють їх експресію, можуть переноситися як плазмідною, так і хромосомною *Bt*. Аналіз нуклеотидної послідовності генів сприяє клонуванню їх в інших мікроорганізмах, що розглядається як можливий біотехнологічний шлях збільшення виходу продукції ентомотоксинів. На продукцію білкових токсинів *Bt*, як головних компонентів сучасних мікробних препаратів контактно-кишкової дії, значно впливають умови культивування, тому різнорівнева оптимізація біотехнологічних етапів виробництва є важливим науково-практичним напрямом досліджень.

Мета роботи – вивчення особливостей метаболітного споро-кристалічного комплексу *Bacillus thuringiensis* в аспекті біотехнологічних рішень та функціональності.

Матеріали і методи. В роботі використано бактеріальні штами з колекцій культур непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення: Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України, м.Чернігів – штам природного типу *B. thuringiensis var. thuringiensis (Bt H₁) 87*, ізольований з личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. старшого віку (L_4) в природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся; Федеральної державної бюджетної установи Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології, м. Пушкін – *B. thuringiensis var. thuringiensis (Bt H₁) 800*, який використовується як виробничий штам-продуцент біопрепарату Бітоксубацилін. Штам *B. thuringiensis var. thuringiensis (Bt H₁) 87/3* із робочої колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Як тест використано мікроміцетні культури *Venturia ssp. V14/5, V14/20* із робочої колекції лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН України, які ізольовані авторами з уражених плодів яблук сорту Рум'яний альпініст.

Отримання чистих культур, визначення морфолого-культуральних властивостей, приготування послідовних розведень мікробних суспензій, культивування на рідких та агаризованих поживних середовищах прово-

дили згідно загальноприйнятих у мікробіології та біотехнології методів [4,5,15].

Для культивування використовували універсальні поживні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), Лурія Бертрані (LB), капустианий агар (КА), а також оптимізовані лабораторно-промислові середовища дріжджо-полісахаридного складу (3,0% білково-вітамінний комплекс, Белбіофарм, + 1,5% кукурудзяне борошно), лабораторно-промислові середовища з м'ясою (4,0%), які створюють відповідні вибіркові умови для розвитку специфічно адаптованих культур *Bt*.

Культивування проводили в колбах Ерленмейєра на біотехнологічній качалці з термоплатформою (200 об./хв., температура +30°C) упродовж 48-72 годин. Об'єм середовища 50, 100 мл, кількість інокулюма — не менше 4,0% від об'єму середовища. Титр колонієутворюючих одиниць не менше 1,5 млрд/мл культуральної рідини, який визначали шляхом глибинного посіву в агаризоване середовище, а також за допомогою камери Горяєва.

Вивчення морфології бактеріальних клітин проводили мікроскопіюванням фіксованих препаратів, фарбованих основним фуксином Циля [15], а також за диференційованою методикою забарвлення В.В. Смирнова [5]. Мікроскопію проводили з використанням імерсії на світловому мікроскопі *Axio Scope* з фотофіксацією (збільшення 100), без імерсії на мікроскопі *Polivar* (збільшення 40).

Біотехнологічні особливості культивування штамів *Bt* визначали в площині продуктивності аксенічних культур, характеру та швидкості утворення ентомоцидних метаболітів (споро-кристалічного комплексу) [15].

Вірулентність штаму *Bt* Н₁ №87/3 у порівнянні з референтними та колекційними штамми визначали у модельних дослідах на біотесті *Leptinotarsa decemlineata* Say. L₁₋₂ за інфікування культуральною рідиною у різних концентраціях (розведення 1:1; 1:10; вихідна культуральна рідина) [3,13,14]. Кількість загиблих особин в досліді враховували на 5, 7 і 10-у добу за формулою Аббота [8]:

$$A = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \times 100, \text{ де}$$

A – ентомоцидна активність, (%); M₀ – відсоток загиблих особин в досліді;

M_k – відсоток загиблих особин в контролі. Загибель в контролі не повинна перевищувати 15,0%.

Для виділення та культивування мікроміцетів використовували середовище Чапека [2]. Антагоністичну дію бактеріальних штамів *Bt* щодо тест-культур визначали методом агарових блоків з подальшою оцінкою інгібуючої активності [2].

Антифідантну дію штамів-продуцентів *B. thuringiensis* та ефективність застосування рідких препаративних форм на їх основі проти колорадського жука на посівах картоплі вивчали в польових умовах. Площа облікової ділянки 8 м², повторність досліду 3-разова. У досліді використано картоплю сорту Слов'янка.

Статистична обробка експериментальних даних проводилася з використанням програм MS Excel 10.0 і STATISTICA 12.

Результати та їх обговорення. Досліджено трофічні ресурси для біотехнологічного культивування штамів *Bt* на рідких і агаризованих поживних середовищах з аналізом титру споро-кристалічного комплексу та тестуванням на патогенні (ентомоцидні) властивості біоагентів (табл. 1). За умов біотехнологічного виробництва мікробних препаратів групи *Bt* необхідно проводити постійний контроль активності штамів-продуцентів та відповідну аналітичну селекцію за ознаками промислово-цінних властивостей, оскільки вони характеризуються нестабільністю.

Таблиця 1

Вплив трофічних ресурсів на продуктивність ентомоцидних штамів *B. thuringiensis var. thuringiensis* (модельний дослід, НУБіП, ІС НААН, 2015-2016 рр.)

Поживне середовище / штам-продуцент	Титр споро-кристалічного комплексу, млрд/мл культуральної рідини *	Ентомоцидна активність штамів <i>Bt</i> , % на 10 добу, біотест <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say. L _{1,2} (інфекційна концентрація 1:1)
1	2	3
Дріжджо-полісахаридне/штам <i>Bt</i> № 87/3	3,0	96,8 ± 0,6
Дріжджо-полісахаридне/штам <i>Bt</i> № 800	2,4	95,6 ± 1,2
4,0% м'яса/штам <i>Bt</i> № 87	2,7	92,0 ± 0,8
4,0% м'яса/штам <i>Bt</i> № 800	2,6	94,3 ± 0,5
МПБ/штам <i>Bt</i> № 87	1,6	85,0 ± 1,1
МПБ/штам <i>Bt</i> № 800	1,8	88,3 ± 1,2
ЛВ/штам <i>Bt</i> № 87	2,2	87,7 ± 1,8
ЛВ/штам <i>Bt</i> № 800	1,9	89,0 ± 1,3
Капустяний агар/штам <i>Bt</i> № 87/3	3,6	97,0 ± 0,9
Капустяний агар/штам <i>Bt</i> № 800	3,0	95,8 ± 0,7

Примітка: *представлено результати трьох дослідів, де титр життєздатних спор наведений за максимальними межами варіювання продуктивності культур *Bt*.

Отже, дослідження впливу поживних середовищ (дріжджо-полісахаридне, м'ясне, капустяний агар, МПБ, ЛВ) на продуктивність штамів *Bt* першого серотипу показали різний рівень технологічності та прояв ентомопатогенної дії споро-кристалічного комплексу – від 1,6 до 3,6 млрд спор/мл та від 85,0 до 97,0 % відповідно. Вегетативна стадія росту аксесорних культур *Bt* 87 та 800 при ферментації характеризується однорідністю бактеріальної популяції, при цьому клітини розташовуються парно або з'єднані в ланцюжки. Перехід до спороутворення, як правило, характеризується збільшенням темпів росту і розвитку, а також наявністю малих, ізольованих клітин. Крім цього, на дріжджо-полісахаридному се-

редовищі спостерігали синхронне спороутворення, яке супроводжувалось більш високим виходом кристалічного δ -ендотоксину, ніж на універсальних середовищах типу МПБ, LB. Це узгоджується з даними авторів, які досліджували біотехнологічні особливості розвитку культур ентомопатогенів *Bt* різних серологічних варіантів [3,10,6].

Найбільш сприятливим для експериментального отримання препаративних форм *Bt* виявилось співвідношення білково-вітамінного комплексу до кукурудзяного борошна 2:1 (3,0% і 1,5% відповідно). При цьому досягається найбільший титр ентомоцидних компонентів в культурах *Bt*, зокрема 2,8 і 3,3 млрд/мл. Виразний ентомоцидний ефект штамів зафіксовано при інфекційному навантаженні 1:1. Так, на десяту добу досліду виявлено до 96,0 – 97,0% загибелі личинок. За умов інфікування бактеріальними суспензіями *Bt* з меншим титром спор (1,5 – 1,7 млрд/мл) на варіантах з середовищами МПБ, LB одержано показники ентомоцидної активності, які не перевищували 89,0%.

Експериментально доведено, що найчутливішими до дії бактеріального споро-кристалічного комплексу *B. thuringiensis* є передімагінальні стадії розвитку (личинки молодшого віку) фітофагів та виявлено пряму залежність загибелі особин від інфекційного навантаження [12]. Оцінка антифідантного ефекту рідких препаративних форм *Bt*, який проявляється контактено через смакові рецептори особин колорадського жука, в польових дослідках показала (табл. 2), що личинки споживають незначну частину листової поверхні рослин (у порівнянні з контрольними неінфікованими), помітно відстаючи у рості та розвитку.

Таблиця 2

Антифідантна дія штамів-продуцентів *B. thuringiensis* (біотест *Leptinotarsa decemlineata* Say., польовий дослід, НУБіП, 2016 р.)

Варіанти Досліду	Ступінь пошкодження листової поверхні, %, бал	Маса личинок відносно контролю, %	Кількість пошкоджених рослин, %	Загибель личинок через 6 діб, % *
Контроль (без обробок)	80,0 (4 бала)	100,0	55,0	-
<i>Bt</i> № 87/3	19,0 (2 бала)	53,4 ± 0,075	20,0	95,5 ± 0,85
<i>Bt</i> № 800	25,0 (2 бала)	56,12 ± 0,16	29,0	89,2 ± 0,72

Примітка: * % загибелі на 6-у добу після обробки рідкою препаративною формою *Bt*.

Результати польових досліджень свідчать про високу біологічну ефективність рідких препаративних форм на основі *Bt* щодо личинок колорадського жука – 92,0-97,0%. Стратегія взаємовідношень ентомопатогенів *Bt* з організмом комахи характеризується як агресивна, оскільки збереження популяції хазяїна не є обов'язковою умовою існування ентомопатогенних бактерій.

В аспекті вивчення основних компонентів кристалічних параспоральних включень (Cry-білків) ентомопатогенних бактерій *Bt* розглядається їх поліфункціональність як високоспецифічних токсигенних компонентів для фітофагів та деяких компонентів угруповань агроценозів. Відомо, що молекули Cry-білків можуть по-різному проявляти свою біологічну активність в залежності від клітин-мішеней: не тільки високо специфічно

руйнувати клітини чутливих безхребетних, зв'язуючись з рецепторами на їх мембранах, а також з меншою специфічністю пригнічувати ріст мікроорганізмів. Кристали ряду підвидів *Bt* крім *Cry* містять і *Cyt* білки, які також поліфункціональні, оскільки виявляють, крім неспецифічної інсектицидної активності, також і антимікробну [7].

За результатами модельних досліджень встановлено, що досліджувані біоагенти-продуценти *Bt* володіють високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів роду *Venturia ssp.* Виявлено, що під впливом штаму *Bt* 87 відбуваються значні зміни морфогенезу мікроміцету, зокрема, прояв характерних зон лізису, зміни щільності, товщини та напрямку росту міцелію, а також ступінь інгібування проростання конідій в межах 86-93 %. У контрольному варіанті (без бактеріальної суспензії) середній діаметр мікроміцету на 10-у добу становив 2,1 см у порівнянні з дослідними варіантами, в яких зафіксовано ріст міцелію не більше 0,6 – 1,2 см.

Поліфункціональність *Cry* і *Cyt* білків проявляється також у тому, що вони руйнують клітинну стінку мікроорганізмів. Такий механізм відрізняється від мембранотропного і вимагає додаткових досліджень. За умов потрапляння токсинів (наприклад, параспоральних кристалів δ -ендотоксину *Bt*) у комах виникає імунна відповідь, що призводить до синтезу лізоциму, лізоцимподібних та інших білків. У цей період вищевказані ентомотоксини і лізоцим можуть взаємодіяти. Такі процеси становлять безсумнівний інтерес для розуміння екологічної ролі цих білків, їх впливу на фактори вродженого імунітету та на розвиток інфекції. Принципові етапи цих процесів можна змодельовати *in vitro*, першим кроком при цьому є вивчення антимікробних ефектів *Cyt*, *Cry* білків, а також лізоциму.

Таким чином, особливості механізму дії токсиновмісних препаратів на основі бактерій *Bt* відносно фітофагів та ґрунтової мікробіоти, а також довготривалий практичний досвід застосування даних ентомопатогенів різних серологічних типів щодо контролю шкочинних організмів є достатньою передумовою для підвищення ефективності біологічного контролю бактеріальними агентами. Використовуючи пул можливостей мікробного метагеному можна проводити ефективний контроль фітопатогенних організмів, комах-шкідників. Комплексне вивчення біотехнологічних особливостей метаболітного споро-кристалічного комплексу з поліфункціональними властивостями і біорізноманіття грамположитивних бактерій *Bt* є актуальним, має науково-теоретичне і практичне значення. Поліфункціональність та метаболічна активність природних бактеріальних штамів *Bt* демонструє важливість ефективного науково-обґрунтованого використання їх потенціалу в агробіології, біотехнології, аграрному виробництві.

Робота виконана за фінансової підтримки Гранту Президента України «Розробка систем біоконтролю агроценозів на основі поліморфізму та ентомопатогенних властивостей бактерій *Bacillus thuringiensis*» (Ф66/42-2016).

Т.И. Патыка, М.В. Бойко, Н.В. Патыка

*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборона, 13, корп. 4., Киев, 03041, Украина*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ МЕТАБОЛИТНОГО СПОРО-КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА И ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Резюме

Представлены данные о полифункциональных свойствах бактериальных штаммов природного типа *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* с энтомотоксическими и антифунгальными эффектами относительно личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. и фитопатогенных микромицетов *Venturia* ssp., изолированных из насаждений косточковых культур. Показано, что аксеничная культура штамма *B. thuringiensis* № 87/3 после селекции *in vitro* обладает высоким потенциалом технологичности (титр метаболитного споро-кристаллического комплекса составляет от 3,0 до 3,6 млрд/мл культуральной жидкости), энтомоцидности (96,0-97,0%) и антифунгального действия, которое проявляется в изменениях морфогенеза микромицетов и степени ингибирования прорастания конидий в пределах 86-93%

Ключевые слова: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, споро-кристаллический комплекс, энтомотоксическое действие, антифунгальный эффект

T.I. Patyka, M.V. Boyko, N.V. Patyka

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
13, Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine*

BIOTECHNOLOGICAL MULTIFUNCTIONALITY OF METABOLIC SPORE-CRYSTAL COMPLEX AND PECULIARITIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* CULTIVATION

Summary

The data on multifunctional properties of natural bacterial strains *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* with entomotoxic and antifungal effects on larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say. and phytopathogenic micromycetes *Venturia* ssp., isolated from planting of stone fruit crops are presented. It is shown that aksenic culture strain *B. thuringiensis* № 87/3 after *in vitro* selection has high potential of efficiency (titer metabolic spore-crystal complex is from 3.0 to 3.6 billion/ml culture fluid) insecticidal (96.0 -97.0%) and antifungal action, which manifested in changes of morphogenesis of micromycetes and the inhibition of germination of conidia within 86-93%

Keywords: *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, spore-crystal complex, entomotoxic action, antifungal effect

1. Агробиология ризосферы растений: монограф. / [Я.М. Гадзало, Н.В. Патыка, А.С. Заришняк]. – К.: Аграрна наука, 2015. – 386 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – М.: Высш. шк., 1995. – 240 с.
3. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*: монография / Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка. – СПб, Пушкин: «Инновационный центр защиты растений», 2009. – 252 с.

4. Лескова А. Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств /А. Я. Лескова. – Л., 1984. – С. 17–19.
5. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных /под ред. В. В. Смирнова. – К., 1983. – 50 с.
6. Патыка Т.И., Патыка Н.В., Патыка В.Ф. Филогенетические взаимосвязи серологических вариантов *Bacillus thuringiensis* //Biopolymers and Cell. - 2009. - Vol. 25, №3. – С. 240-244.
7. Юдина Т.Г. Полифункциональные белки бактерий. // Практикум по микробиологии под ред. А.И. Нетрусова. – М., Издат. Центр “Академия”. -2005.–С.371-376.
8. Abbot W. A method of computing the effectiveness of an insecticide /W. Abbot // J. Econ. Entomol. –1925. –18.– P. 265-267.
9. Bravo A. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control /A. Bravo, S. Gill, M. Soberon //Toxicon. – 2007. – 49. – P. 423-435. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
10. De Barjac H. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains /H. de Barjac, E. Frachon //Entomophaga. – 1990. – V. 35. – P. 233–240.
11. Ennouri K. Improvement of the production of entomopathogenic proteases of *Bacillus thuringiensis* /K. Ennouri, R. Ben Ayed, H. Ben Hassen, H. Azzouz, M.A. Triki // Tunisian Journal of Plant Protection. – 2015. – 10. – P. 95-103.
12. Federici B.A. *Bacillus thuringiensis* in Biological Control Handbook of Biological Control Principles and Applications of Biological Control Edited by: Thomas S. Bellows, T.W. Fisher, L.E. Caltagirone, D.L. Dahlsten, G. Gordh and C.B. Huffaker. Elsevier Inc.1999, P. 575-593.
13. Lamenha C. *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* to Insect Control: Process Development of Small Scale Production to Pilot-Plant-Fermenters/C. Lamenha, L. Finkler// Federal University of Pernambuco Brasil.-2012.- P.613-627.
14. Roh J. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control/ J. Roh, J. Choi, M. Li //J. Mol. Biol. – 2007. –17. – P. 547-559.
15. Smirnoff W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* /W. A. Smirnoff //Insect. Pathol. – 1962. – P. 384-386.

Отримано 21.07.2016