

УДК 632.937
© 2010

*Патика М.В., доктор сільськогосподарських наук,
Патика Т.І., кандидат сільськогосподарських наук*
Національний університет біоресурсів і природокористування України

*Кандибін М.В., доктор біологічних наук,
Єрмолова В.П., кандидат біологічних наук*
Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут
сільськогосподарської мікробіології РАСГН

ЕФЕКТИВНЕ ВИКОРИСТАННЯ ЕНТОМОПАТОГЕНІВ *BACILLUS THURINGIENSIS* H₁₄ У КОНТРОЛІ КОМАРІВ *Aedes Aegypti*

Рецензент – доктор біологічних наук Л.А. Пасічник

*Розглядаються результати комплексних досліджень ефективного використання природних ентомопатогенів *Bacillus thuringiensis* як продуцентів ларвіцидних препаратів пролонгованої дії для контролю чисельності кровосисних комарів роду *Aedes aegypti*. Показана функціональна активність нових штамів VtH₁₄-87/3, VtH₁₄-33 для личинок комарів різного віку інсектарної популяції та успішне застосування Бактокуліциду на основі VtH₁₄ у широкому інтервалі природно-кліматичних зон і типах водоймищ.*

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Aedes aegypti*, Бактокуліцид, ларвіцидна активність.

Постановка проблеми. Чисельність кровосисних комарів налічує понад 2500 видів, які поширені по всіх (за винятком Антарктиди) континентах. На території Європи мешкає близько 90 видів комарів, які належать, в основному, до родів *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Mansonia*. Будучи ектопаразитами, нападаючи масово на людей і тварин, вони виснажують своїх господарів (паразит-хазяїн), знижуючи працездатність людей і продуктивність тварин. В історичній літературі відомі «комарині» катування людей (шляхом знерухомлення людини в місцях масового нападу комарів). Окрім того відома роль комарів як переносників значної кількості трансмісивних, у тому числі, особливо небезпечних інфекцій людини і тварин (малярія, туляремія, жовта лихоманка, геморагічні лихоманки, лихоманка Денге, тайговий (або кліщовий) енцефаліт, філяріоз, лихоманка Ку, анаплазмоз великої рогатої худоби й чимало інших інфекцій та інвазій).

Аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання даної проблеми. Різноманіття видового складу кровосисних комарів на території України і країн СНД, їх фенологія, біотопічний розподіл, екологічні особливості – залежно від зовнішніх чинників і

життєвих особливостей двокрилих – обумовлюють необхідність розробки цільових комплексних регіональних програм контролю їх чисельності, які передбачають проведення ретельного ентомологічного моніторингу для встановлення розповсюдження чисельності комарів, уточнення їх видового складу, проведення профілактичних, захисних заходів щодо найбільш епідеміозначущих видів комах.

Нагадаємо, що у 70-х роках ХХ століття в Ізраїлі та Пакистані були виділені штами бактерій *Bacillus thuringiensis* H₁₄ і H₁₃ із ларвіцидними властивостями стосовно кровосисних комарів і мошок. На основі *Bac. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ у колишньому СРСР і за кордоном була створена серія біопрепаратів ларвіцидної дії (Бактокуліцид, Бактоларвіцид, Текнар, Бактімос, Вектобак, Москітур та ін.). Вказані препарати, незважаючи на однорідність продуцента *Bac. thuringiensis* H₁₄, за ефективністю значно відрізняються між собою [4, 5]. У Каліфорнії з личинок *Culiseta incidens* С. Девідсон, П. Майерс одержали інсектицидний штам, потенційний москитний ларвіцид *Bac. sphaericus*. В екологічному відношенні ця бактерія вважається пластичним видом [3]. *Bac. sphaericus*, як і *Bac. thuringiensis* H₁₄, є найкращим джерелом одержання високо-ефективних ларвіцидних препаратів для мікробіологічного контролю комарів і мошок.

Паралельно з науковими дослідженнями йшло освоєння технології виробництва біопрепаратів на основі ентомопатогенів групи *Bac. thuringiensis* і наростання обсягів їх виробництва та застосування [4, 5, 8].

Значне поширення токсигенних бактерій у природі й «строкатість» субстанцій із токсичними властивостями вказує на суттєве значення токсинів для екології мікроорганізмів. Однак успішне використання біопрепаратів на основі

мікроорганізмів неможливе без знання їх циркуляції в середовищі комах, спонтанної мінливості в природних умовах. Урбанізація дала поштовх новому напрямку в еволюції комарів, зокрема появі єврітопних видів – *Culex pipiens pipiens*, – що розмножуються в різних водоймищах, та екотипу *Culex pipiens molestus*, який заселив підтоплені підвали й підземні біотопи.

Контроль комарів – складне завдання, оскільки ці двокрилі володіють колосальним потенціалом розмноження, коротким часом зміни генерацій, високою екологічною пластичністю і великими здібностями до поширення, у тому числі шляхом пасивного перенесення в повітряних потоках. Для успішного практичного використання ларвіцидних біопрепаратів доцільно проводити облік багатьох чинників і обставин, зокрема характеристики біотопів – водоймищ, їх площу, що підлягає обробці, глибину, особливості водопостачання, проточність, міру заростання та органосольові показники води. При виборі дози препарату обов'язково повинні враховуватися видовий склад комарів та їх чисельне співвідношення. Сучасна основна вимога до інсектицидів, які застосовуються в практиці, – це поєднання цільової ефективності та безпеки. У зв'язку з цим важко переоцінити роль біологічних засобів, зокрема мікробіологічних препаратів на основі ентомопатогенних бактерій *Bac. thuringiensis*, які проявляють значну ступінь ефективності проти цільових об'єктів та екологічну безпеку.

Мета досліджень та методика їх проведення. Метою досліджень було виявлення ефективності нових штамів ентомопатогенних бактерій *Bac. thuringiensis var. israelensis* (*Bt* H₁₄) для личинок комарів *Aedes aegypti* та особливостей їх

використання як продуцентів ларвіцидних препаратів у системі мікробіологічного контролю кровосисних комарів.

Дослідження проводили в ДНУ Всеросійському науково-дослідному Інституті сільськогосподарської мікробіології РАСГН (Санкт-Петербург), лабораторії зоологічної мікробіології. Ларвіцидний референтний штамп *Bt*H₁₄-7-1/23 – із колекції мікроорганізмів ВНДІСГМ РАСГН, *Bt*H₁₄-87/3, *Bt*H₁₄-33 – нові штамми, одержані методом скринінгу з природних популяцій двокрилих відповідно до розроблених селекційних критеріїв.

Aedes aegypti – стабільний тест-об'єкт для культивування в інсектарних умовах і тест за міжнародним стандартом Інституту Пастера для визначення ларвіцидної активності. Для лабораторних досліджень з личинками комарів *Aedes aegypti* використана інсектарна популяція: личинки 3 віку, які відроджені з яєць однорідної популяції виду протягом перших двох годин. Личинок розміщували у кювети, наповнені дистильованою водою на глибину 2 см, при температурі 28 °С і періодичності освітлення 12 годин. Кормом для личинок до стадії лялечок слугувала суміш сухих знежирених дріжджів. Біотести розміщували в інсектарії у спеціалізовані садки, в яких відбувався розвиток комах до стадії імаго та подальшого відкладання яєць на фільтри. Личинок, відроджених з яєць протягом 1-2 години, відловлювали, поміщали в кювету з водою і після досягнення 3 віку (через 4 дні) використовували в подальших експериментах. В окремих дослідженнях використовували популяції двокрилих комах, які були зібрані з природних водоймищ різних природно-кліматичних зон.

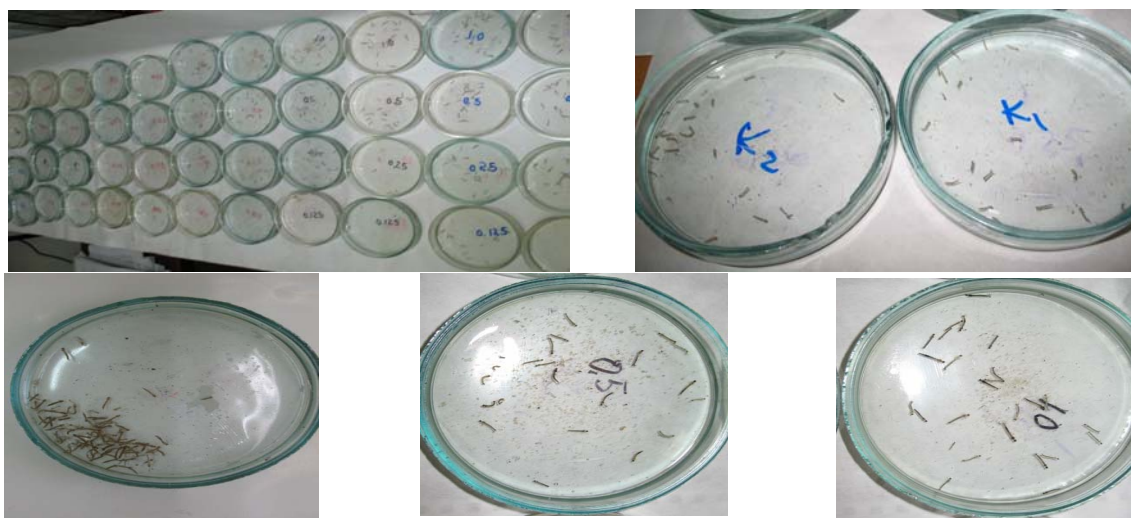


Фото 1. Постановка експерименту з інсектарною популяцією *Aedes aegypti* і тестування за ларвіцидною активністю штамів *Bt* H₁₄

Розчин водної суспензії культур ентомопатогенів *Bt H₁₄* використовували в п'яти концентраціях (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 мг/л), які забезпечують від 96,0 до 100% загибелі тест-об'єкта. Повторність дослідів трикратна, у кожній – по 25 личинок, облік на 1-3-ю добу (фото 1).

Критерієм активності ентомопатогенних бактерій *Bt H₁₄* є величина їх концентрації у воді, що забезпечує 50% загибель досліджуваних комах (ЛК₅₀) при вільному поглинанні личинками споро-кристалічного комплексу з водної суспензії препарату (це відповідає рекомендаціям ВООЗ із стандартизації ларвіцидних препаратів).

Біоларвіцид Бактокуліцид у вигляді рідкої препаративної форми випробовували проти кровосисних комарів у водоймищах різного типу (тимчасові – невеликі воронки, підвальні дрібні затоплення, постійні – зарослі водойми, озера), при різних температурних режимах. Перед обробкою об'єкта проведено визначення щільності личинок комарів за загальноприйнятими ентомологічними методами (середня щільність личинок на 1 м² до і після обробок, через 24, 48 і 72 години) [2, 3].

Результати досліджень статистично обробляли на персональному комп'ютері з використанням програм EXCEL, Statistica 6, за допомогою методів математичної статистики [6, 7].

Результати досліджень. У результаті узагальнення одержаних результатів щодо біологічних особливостей нових селектованих штамів *BtH₁₄-87/3*, *BtH₁₄-33* одержано показники господарсько цінних властивостей ентомопатогенів до початкового рівня (табл. 1).

При селекції штамів *BtH₁₄* виявлено 4 основних морфологічних типи колоній:

- RS форма – колонії сірувато-білі, округлі або неправильної форми, плоскі, поверхня колоній

дрібношеровата. На МПА через 4 доби утворюються спори і кристали. Культура високопатогенна для комарів *Aedes aegypti*;

- RS (пігментна) форма – колонії мають рожевий відтінок. Пігмент в поживне середовище не виділяється;

- R форма – колонії матово-білі, сухі, зморщені, плоскі, округлі. На МПА процес споро- і кристалоутворення завершується через 2 доби. Культура непатогенна для комарів *Aedes aegypti*;

- S форма – колонії кремового кольору з хвилястими краями, поверхня олійної консистенції, у 4-6-добовій культурі трапляються лише вегетативні клітини в ланцюжках, часто деформовані. Культура високопатогенна для комарів роду *Aedes aegypti*.

Особливо низькою продуктивністю (не більше 1,23 млрд./мл) володіли культури III фенотипу (-R форми колоній). При культивуванні в рідких поживних середовищах відмічено повільний ріст, слабке спороутворення та повна відсутність біологічної активності для личинок комарів.

Продуктивність і ларвіцидна активність відібраних штамів-продуцентів Бактокуліциду *BtH₁₄-87/3*, *BtH₁₄-33* виявилася на високому рівні – титр спор до 4,0 млрд./мл культуральної рідини. ЛК₅₀ для личинок четвертого віку *Aedes aegypti* не перевищувала показників норм (1,5 мкл/л води), що свідчить про високу функціональність нових штамів цього серотипу (табл. 2).

Ентомопатогенні бактерії *BtH₁₄* (*var. israelensis*) не продукують термостабільний водорозчинний екзотоксин, – його дія на тест-об'єкт відбувається за рахунок кристалічного ендотоксину. Ендотоксин, який знаходиться в оболонці спор і вегетативних клітин, викликає у личинок комарів деструктивні зміни клітинної

1. Характеристика селектованих штамів *Bac. thuringiensis var. israelensis H₁₄*

Штам	Титр спор, млрд./мл культуральної рідини		Показник за тест-об'єктом	
	після зберігання два роки	після селекції	після зберігання два роки	після селекції
<i>BtH₁₄-33</i>	2,65	4,4	Личинки <i>Aedes aegypti</i> , ЛК ₅₀ , мкл/л води	
			1,95	1,0
<i>BtH₁₄ 87/3</i>	2,44	4,0	2,35	1,25
<i>BtH₁₄ 7-1/23</i>	3,05	4,1	1,95	0,85

2. Активність штамів *BtH₁₄* для личинок комарів *Aedes aegypti* (інсектарна популяція) різного віку

Варіант дослідю (штам-продуцент Бактокуліциду)	ЛК ₅₀ , мкл/л води			
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
<i>BtH₁₄-33</i>	0,55	1,1	1,15	1,25
<i>BtH₁₄ 87/3</i>	0,59	0,75	0,90	1,35
<i>BtH₁₄ 7-1/23</i>	0,71	0,98	1,19	1,68

стілки кишечника, особливо його середнього відділу.

Ларвіцидні властивості *Bac. thuringiensis* H₁₄ демонструють широкий діапазон можливостей у системі захисних заходів проти кровосисних комарів. При застосуванні ентомопатогенів групи *BtH₁₄* у водоймищах різного типу і з різним температурним режимом чіткої залежності ефективності біоагенту від температури води не виявлено. За результатами багаторічних досліджень показано ефективне застосування мікробних препаратів на основі штамів ентомопатогенних бактерій 14-го серотипу в широкому інтервалі природно-кліматичних зон та природних і штучних типах водоймищ (табл. 3).

Виявлена висока ефективність ларвіцидного препарату Бактокуліцид упродовж 24-72 годин. Оскільки біопрепарат цього типу має механізм кишкової дії, то його біологічна активність проявляється у період активного живлення комах молодшого віку. Загибель комарів спостерігається упродовж перших

трьох діб після обробки. При надходженні ентомопатогену до травного каналу личинок відбувається токсикоз і наступна їх загибель.

У технологічних аспектах застосування біоларвіцидів необхідно враховувати особливості водопостачання, проточність, ступінь росту рослинності та органосольові показники. При виборі дози препарату обов'язково слід досліджувати видовий склад комарів і чисельне співвідношення видів.

Встановлено, що остаточна ларвіцидна дія біопрепарату на основі *BtH₁₄* у залежності від хімічного складу води, вмісту органічних домішок, освітлення й температурного режиму води та виду личинок може варіювати в межах 5-10 діб.

Встановлена ефективна доза рідкої препаративної форми Бактокуліциду, що забезпечує 94,0% загибель личинок різного видового складу кровосисних комарів із урахуванням характеристики водойм – 0,5; 0,75 і 1,0 мл/м². Найчутливішими до біоларвіциду є личинки комарів родів

3. Ефективність *Bac. thuringiensis* var. *israelensis* H₁₄ у різних регіонах

Райони випробувань і типи водоймищ	Загальна площа обробки, га	Доза препарату, кг/га	Щільність L, екз./м ²	% загибелі	
				2 доби	3 доби
Білорусь - тимчасові	2,0	1,5	190	100	-
РФ (Лен. обл.) - тимчасові	9,0	0,25-0,5	700-3200	94,0	97,0
- постійні	10,0	1,0-1,5	150-750	92,5	98,9
- підвали	0,2	0,25-1,0	400-900	99,0	100
Узбекистан - канали	0,5	0,3	600-5400	85,6	94-100
- калюжи	0,6	0,5	48-740	100	-
Україна, ліс - постійні	3,5	2,5-3,0	180	100	-
- тимчасові	0,8	2,0	560	100	-
- ставки	13,2	2,0	150	100	-
- озера	3,0	1,0-2,5	50-240	70	98,6
- підвали	1,8	1,0-2,0	50-170	100	-
Україна, Лісостеп заболоченості - канали	10,5	0,8	90	100	-
- підвали	0,5	0,2	100-120	100	-
	0,9	0,8-1,5	110	100	-
Україна, Степ - тимчасові	1,4	1,5	150-170	99,0	100
- ставки	8,0	0,5-2,5	230-1000	95-98	99,6
заболоченості	27,5	1,0-2,0	270-1250	97,8	100
- озера	1,0	2,0	40	100	-
- плавні	0,5	2,0	160	100	-
- стічний канал	1,6	2,5	120-1900	96,5	100

Aedes, менш чутливі личинки *Anopheles*. Для ефективного біологічного контролю чисельності личинок комарів роду *Aedes* необхідно 1,5-2,0 кг с.п. мікробного препарату на основі штамів *BtH₁₄* на гектарну площу водної поверхні, для личинок комарів роду *Anopheles* варто збільшити дозу препарату до 2,5-3,0 кг/га.

Спосіб обробки для кожного конкретного об'єкта визначається, зазвичай, типом водоймища та наявним обладнанням. Невеликі за площею, легкодоступні водойми можна обробляти ручними обприскувачами будь-якого типу або вносити готову суспензію з відра. Для наземної обробки великих, тимчасових і постійних водоймищ використовують дезустановки, автомакси, гідропульти та іншу апаратуру для обприскування.

Висновки. При використанні препаратів на основі ентомопатогенних бактерій групи

Bac. thuringiensis необхідно враховувати особливості та переваги мікробіологічного методу контролю чисельності комах. Біологічно активні метаболіти, у тому числі й ентомотоксини, які продукують бактерії *Bt*, призводячи до відповідних ефектів у комах, тим самим не лише підсилюють дію препаратів, що містять токсини, але і пролонгують терміни цієї дії. Отже, для вирішення проблем екологічної й соціальної безпеки країни рекомендуються науково-обґрунтовані та екологічно безпечні технології використання ларвіцидних біопрепаратів із пролонгованим типом дії та післядії на популяції двокрилих. Використання ентомопатогенів *Bt* сприяє збереженню природного біорізноманіття, забезпечує участь природних агентів у регулюванні чисельності комах, сприяючи відновленню природної саморегуляції біоценозів.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Биопрепараты в сельском хозяйстве. (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / И.А. Тихонович, А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь [и др.]. – М. : Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
2. Дмитриенко В.К. Зоология беспозвоночных: методические указания к летней практике / В.К. Дмитриенко, Г.Н. Скопцова. – Красноярск: Красноярский гос. ун-т, 2000. – Ч. 1. – 20 с.
3. Использование жидкой формы биологического препарата Бактоцид для борьбы с личинками комаров. Методические указания. ТУУ 24.6–24227263–001–2004.
4. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика. М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
5. Кандыбин Н.В. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis* // Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова [и др.]. – СПб. – Пушкин, 2009. – 252 с.
6. Лумтл Т. Планирование и анализ / Т. Литтл, Ф. Хиллз. – К. : Колос, 1981. – 319 с.
7. Рокицкий П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов / П.Ф. Рокицкий. – Минск : БГУ, 1973. – 221 с.
8. 70 лет ВИЗР. Ретроспектива исследований: методология, теория, практика, 1929-1999: сб. науч. тр. – СПб, РАСХН, ВИЗР. – 1999. – 312 с.
9. Davidson E.W., Myers P. // FEMS Microbiol. Lett. – 1981. – V. 10. – P. 261-265.