

Инсектицидная активность меланиногенных штаммов *Bacillus thuringiensis*

Овсепян А. С.¹, Аветисян С. В.¹, Тадевосян П. Е.¹, Азарян К. Г.²,
Колоян А. О.¹, Филипена В. Л.³, Чижик О. В.³

¹ НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА, Ереван, Армения, anichka_h@mail.ru

² Ереванский Государственный Университет, Ереван, Армения

³ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь.

Резюме. У различных штаммов *Bacillus thuringiensis*, отличающихся спектром инсектицидного действия, получена коллекция мутантов, синтезирующих водорастворимый меланин. Показано, что синтез меланина у выделенных мутантов *B. thuringiensis* не влияет на характер и уровень споро — и кристаллообразования, однако вирулентность этих штаммов заметно повышается. Повышение инсектицидной активности у меланинсинтезирующих мутантов является следствием фотопротекторного свойства пигмента, защищающего споры и кристаллы инсектицидных штаммов от разрушающего действия УФ-радиации и инсоляции.

Insecticidal activity of melaninogenic *Bacillus thuringiensis* strains. Hovsepyan A. S., Avetisyan S. V., Tadevosyan P. Ye., Azaryan K. G., Koloyan H. O., Filipenia V. L., Chizhik O. V. **Summary.** A collection of water-soluble melanin-synthesizing mutants of *B. thuringiensis* strains differing by the spectrum of insecticidal activity has been obtained. It was shown that melanin synthesis in isolated mutants of *B. thuringiensis* did not affect the character and level of spore — and crystal-forming, however virulence of these strains significantly increased. Increase of the insecticidal activity in melanin-synthesizing mutants is a result of a photoprotective property of the pigment protecting spores and crystals of insecticidal strains from a destructive action of UV-radiation and insolation.

В последнее время в области биотехнологии особое внимание уделяется биополимерам — веществам с широким спектром биологической активности. К таким биологически активным соединениям относятся меланины, которые нашли широкое применение в медицине, фармакологии, косметологии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Одним из проявлений протекторных функций меланина является его фотозащитное действие. Меланин является защитным агентом от вредного солнечного излучения [1].

Установлено, что высокая инсектицидная активность УФ-устойчивых мутантов *B. thuringiensis* по отношению к различным сельскохозяйственным насекомым-вредителям (хлопковая совка, капустная моль, малый пятнистый мотылек) по сравнению с родительскими штаммами обусловлена синтезом меланина [2, 3]. Такой же фотозащитной способностью обладает меланин, синтезируемый УФ-устойчивым штаммом *B. cereus* 58. Продуцируемый красно-коричневый пигмент защищает кристаллические белки инсектицидов от дегградации [4]. Эти меланиногенные штаммы могут применяться в качестве биоинсектицида [5].

Целью настоящей работы явилось получение и изучение меланинсинтезирующих мутантов у других сероваров штаммов *B. thuringiensis*, отличающихся спектром энтомоцидного действия [6]. Способность таких штаммов к одновременному синтезу двух биологически активных веществ — меланина и инсектицидных токсинов — в одном производственном процессе несомненно обеспечит высокий уровень эффективности их использования.

Материал и методика. В работе использована коллекция музейных культур *B. thuringiensis* Центра Депонирования Микробов (отделение НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Для культивирования штаммов использовали мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар.

Культуральную жидкость (КЖ) с целью определения вирулентности исследуемых штаммов получали ферментацией в среде следующего состава, %: БВК — 3,0; мука пшеничная — 1,2; отруби пшеничные — 0,3; NaCl — 0,2; CaCl₂ — 0,05. Ферментацию проводили при температуре 30°C в течение 48 часов на качалке со скоростью вращения 220 об/мин. Посевным материалом служили культуры, выращенные на среде: мясная вода — 100 мл; пептон — 10 г; дрожжевой экстракт — 1 г; NaCl — 5 г; агар-агар — 20 г, вода водопроводная — до 1 л.

Для оценки споро-кристаллообразования полученные КЖ изучали микроскопированием в световом фазово-контрастном микроскопе (БИОЛАМ ЛОМО). Подсчет титра спор осуществляли в счетной камере Горяева.

Мутагенизацию культур для получения меланиногенных штаммов проводили 1 — метил — 3 — нитро — 1 — нитрозогуанидином (НГ) фирмы Serva по известной методике [7].

Биологическую (инсектицидную, энтомоцидную) активность исследуемых штаммов по отношению к гусеницам златогузки (*Euproctis chryorrhoea* L.) и непарного шелкопряда (*Ocneria dispar*) разных возрастов определяли по формуле Аббата [8], а также по значениям ЛК₅₀ на тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*) (ТШ) и златогузке [9, 10].

Лабораторные испытания для определения инсектицидности штаммов проводили вскармливанием гусениц ТШ тутовыми, а гусениц златогузки дубовыми листьями, обработанными КЖ, полученной ферментацией исследуемых штаммов. При полевых испытаниях дубовые деревья высотой 2,5–3,0 метра (деляночный опыт) обрабатывали рабочими суспензиями исходных и мутантных штаммов. Плотность златогузки находилась в пределах экономического порога вредоносности вредителя [11]. Обработку проводили ранцевым опрыскивателем марки АО-2. Для определения эффективности опрыскивания проводили учет вредителей через 3, 7, 10, 12 дней. Учитывали живые гусеницы на 12-ти погонных метрах в разных местах кроны.

Статистическую обработку полученных данных проводили по Берстейну [12].

Результаты и обсуждение. С целью получения меланиногенных штаммов сохраняющих инсектицидную активность, были исследованы 85 штамма *B. thuringiensis* с разным спектром инсектицидного действия.

По признаку наибольшей эффективности споро — кристаллообразования были отобраны 18 штаммов разных сероваров *B. thuringiensis* со следующей характеристикой: количество свободных спор — 80–90%; количество кристаллов разных размеров — более 100%; неспорулирующие вегетативные клетки и спорующие клетки с кристаллами — 10–20%. Развитие культур — типичное для *B. thuringiensis*.

Для определения инсектицидной активности отобранных штаммов в лабораторных условиях КЖ испытывали на гусеницах златогузки разных возрастов. Биологическую эффективность определяли по проценту погибших особей.

На основании полученных результатов для дальнейших исследований были отобраны штаммы *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* 69–6, *B. thuringiensis* Z — 52, HD-1(subsp. *kurstaki*) и 21 a (не идентифицирован).

Энтомоцидная активность этих штаммов дополнительно была проверена методом Кербера [9] — определением летальной концентрации, вызывающей гибель 50% особей (ЛК₅₀).

Эксперименты проводились на гусеницах ТШ третьего возраста и златогузки III–IV возрастов в трех повторностях (30 особей для каждого разведения). Учет погибших гусениц проводили в соответствии с динамикой развития вида насекомого: ТШ — через 1,2 и 3 сутки; златогузки — через 3, 6 и 8 суток. По полученным данным была рассчитана ЛК₅₀ (табл. 1).

Данные приведенные в табл. 1, подтверждают высокую биологическую активность отобранных штаммов *B. thuringiensis* против гусениц ТШ и златогузки, в результате чего они были отобраны для получения на их основе пигментообразующих мутантов.

Для определения вирулентности отобранных меланинсинтезирующих мутантов были проведены испытания в полевых условиях. С этой целью из бактериальной биомассы каждого штамма разведением водопроводной водой была получена рабочая суспензия с ориентировочным титром $4,0-5,0 \cdot 10^8$ спор/мл. Испытания проводились на гусеницах златогузки II-III возрастов и на непарном шелкопряде I-III возрастов. Вирулентность оценивали по проценту гибели насекомых. Результаты опытов в полевых условиях приведены в табл. 2

Таблица 1

Инсектицидная активность штаммов против гусениц тутового шелкопряда и златогузки

Штамм <i>B.thuringiensis</i>	Титр, млрд спор/мл	Инсектицидная активность. ЛК ₅₀ , спор/мл.					
		Гусеницы тутового шелкопряда III возраста			Гусеницы златогузки III-IV возрастов		
		Учет по дням					
		1	2	3	3	6	8
69-6	4,0	$6,8 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^6$
Z-52	5,1	$1,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
HD-1	5,5	$8,7 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^6$
21 a	5,1	$5,9 \cdot 10^7$	$8,7 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$

Таблица 2

Сравнительная инсектицидная активность исходных штаммов *B. thuringiensis* и их меланиногенных мутантов по отношению к гусеницам златогузки.

Штамм <i>B. thuringiensis</i>		Титр рабочей суспензии, спор/мл	Гибель вредителя по дням учета, % (с поправкой на контроль)			
			3	7	10	12
<i>subsp.galleriae</i> 69-6	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	30,2	48,4	67,3	68,2
	K1 pig	$4,2 \cdot 10^8$	32,1	53,1	74,4	76,0
<i>subsp.kurstaki</i> Z-52	исходный	$4,8 \cdot 10^8$	34,7	55,4	70,6	73,1
	Z11 pig	$5,0 \cdot 10^8$	36,4	58,2	78,5	81,0
21 a (не идентифицирован)	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	32,4	50,2	65,6	70,6
	a8 pig	$4,6 \cdot 10^8$	34,3	51,7	67,7	72,1

Как видно из результатов табл. 2. инсектицидная активность меланиногенных мутантов *B. thuringiensis* по отношению к златогузке по сравнению с исходным штаммом не только не уменьшилась, но и заметно возросла.

Повышение инсектицидной активности наблюдалось и в случае испытания бактериальных суспензий на гусеницах непарного шелкопряда I-III возрастов.

Микроскопический анализ количества спор и формы кристаллов у исходных штаммов и пигментобразующих мутантов не выявил существенных отличий. Культуры всех мутантов содержали характерные для исходных штаммов короткие палочки в цепочках из двух-трех клеток, содержащих оформленные споры в количестве 90-95% и крупные кристаллы неопределенной формы.

Таким образом, хотя синтез меланина у исследованных штаммов *B. thuringiensis* не влияет на характер и уровень споро — и кристаллообразования, однако инсектицидная активность этих

штаммов заметно повышается. Известно, что споры и кристаллы *B. thuringiensis* высокочувствительны к УФ-облучению и солнечным лучам, и в полевых условиях быстро теряют инсектицидную активность [13]. Меланины, продуцируемые микроорганизмами, являются природными фотопротекторами и защищают клеточные компоненты, в том числе споры и кристаллы, от УФ-повреждений и отрицательного воздействия солнечных лучей [2,3]. В результате пролонгируется время действия и, следовательно, биологическая эффективность препаратов на основе инсектицидных штаммов.

Совмещение в одном штамме двух полезных свойств — инсектицидного и меланинсинтезирующего, позволило нам решить задачу стабилизации препарата.

Работа выполнена в рамках проектов № 13 РБ-063 и ANSEF — Plant 4720.

Список литературы

15. Барабой В. А. Меланин: структура, биосинтез, биологические функции. Укр. биохим. ж., 1999, Т. 71(4), С. 5–14.
16. Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. Syst. Appl. Microbiol., 2004, Vol. 27(3), P. 286–289.
17. Saxena D., Ben-Dov E., Manasherob R., Barak Z., Boussiba S., Zaritsky A. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. Curr. Microbiol., 2002, Vol. 44(1), P. 25–30.
18. Zhang J., Cai J., Deng Y., Chen Y., Ren G. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus*. Front. Biol. China., 2007, Vol. 2(1), P. 26–29.
19. Wan X., Liu H. M., Liao Y., Su Y., Geng J., Yang M. Y., Chen X. D., Shen P. Isolation of a novel strain of *Aeromonas media* producing high levels of DOPA-melanin and assessment of the photoprotective role of the melanin in bioinsecticide applications. J. Appl. Microbiol., 2007, Vol. 103(6), P. 2533–2541.
20. Бурцева Л. И., Штерншис М. В., Калмыкова Г. В. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. Глупова В. В. — М.: Круглый год, 2001, 124 с.
21. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, 436 с.
22. Трубникова И. В. Применение бактериальных препаратов против вредителей сельскохозяйственных культур (рекомендации). М.: Агропромиздат, 1989, 6 с.
23. Лескова А. Я., Рыбина Л. М., Строева И. А. Методические указания. Л.: Изд-во Всесоюз. НИИ защиты растений, 1984, 21 с.
24. Чил-Акопян Л. А., Хлистовский Е. Д., Адамян М. О., Киносян М. А. Определение инсектицидной активности культур *Bacillus thuringiensis* с использованием тутового шелкопряда, Биолог. журн. Армении, 1996, Т. 49(1–2), С. 57–61.
25. Рогачева А. Я. Экономические пороги вредоносности главнейших вредных видов насекомых и клещей. М.: Агропромиздат, 1986, 6 с.
26. Бернштейн А. Л. Справочник статистических решений. М.: Статистика, 1968, 162 с.
27. Blanco M. G. M., Wong L. J. G., Padilla C. R., Martinez H. Q. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory, J. Am. Mosq. Control Assoc., 2002, Vol. 18(4), P. 352–358.