

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

БОЙКО МАРІЯ ВІКТОРІВНА

УДК 663.18:631.932

**ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АГЕНТИ
BACILLUS THURINGIENSIS ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПОПУЛЯЦІЇ
КОЛОРАДСЬКОГО ЖУКА**

03.00.20 «Біотехнологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник,
член-кореспондент НААН
Патика Микола Володимирович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Постоєнко Володимир Олексійович,
Національний науковий центр
«Інститут бджільництва
імені П. І. Прокоповича» НААН,
заступник директора з наукової
та інноваційної роботи

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Таргоня Василь Сергійович,
Державна наукова установа
«Український науково-дослідний інститут
прогнозування та випробування техніки
і технологій для сільськогосподарського
виробництва імені Леоніда Погорілого»,
провідний науковий співробітник

Захист відбудеться «05» квітня 2019 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «04» березня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ю. В. Коломієць

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Щорічно значна частина комерційно важливих сільськогосподарських насаджень втрачається внаслідок ураження фітофагами. Нині актуальними є створення і впровадження сучасних біотехнологічних систем контролю шкідників за участю ентомопатогенних мікроорганізмів, спрямованих на відновлення та підтримку біоценотичної рівноваги агроценозів. Домінантне положення серед комплексу ентомопатогенних мікроорганізмів, які відомі в світі та використовуються в аграрних біотехнологіях, займають бактерії *Bacillus thuringiensis*. Інтродукція мікробних агентів *Bacillus thuringiensis* у агроекосистемі є ефективним методом корекції мікрофлори ґрунту, ризосфери, трофічної структури метаболізму багатокomпонентних біологічних систем, зокрема «ґрунт – рослина – фітофаг», а також покращення росту та розвитку рослин та підвищення їх врожайності. Вивченню і вирішенню цих проблем було присвячено дослідження В. В. Смірнова, М. В. Кандибіна, Т. І. Патики, Т. Г. Юдіної, Л. К. Каменек, N. Crickmore, A. Bravo, C. Pigott, B. Zhang, S. Gill та ін.

Різноманітність спороутворюючих бактерій *Bacillus thuringiensis*, продукуючих параспоральний кристалічний токсин, з кожним роком поповнюється новими серотипами. Вони відрізняються технологічністю, набором біологічно активних метаболітів, поліфункціональністю щодо цільових об'єктів (антифідантною, ентомотоксичною дією та ін.), що обумовлює високу біологічну, техніко-економічну ефективність біопрепаратів на їх основі. На сучасному етапі особливу наукову та практичну цінність складають комплексні роботи щодо скринінгу, дослідження генетичного профілю, різноманіття ендоспорових бактерій в різних еконішах, аналізу їх морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних ознак та властивостей продуцентів.

Для ефективного біологічного контролю фітофагів, стабілізації агроценозів, зменшення пестицидного навантаження на них необхідно більш ґрунтовно дослідити нові штами-продуценти *Bacillus thuringiensis* для розвитку наукоємних біотехнологій мікробного синтезу, розширення можливостей використання даних біоагентів у практиці агровиробництва.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано упродовж 2015–2018 рр. на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України у рамках державних науково-дослідних робіт відповідно до завдань Гранту Президента України «Розробка систем біоконтролю агроценозів на основі поліморфізму та ентомопатогенних властивостей бактерій *Bacillus thuringiensis*» (номер державної реєстрації 0116U000657, 2016 р.); фундаментальної тематики Міністерства освіти і науки України «Оцінка біорізноманіття та фітозахисних властивостей бактерій роду *Bacillus* для біоконтролю шкочочинних організмів» (номер державної реєстрації 0117U002554, 2017–2019 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційного дослідження – оцінка біологічної дії ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* на личинки колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) для ефективного їх використання в агровиробництві; розроблення технології отримання препаративних форм на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* за оптимізації складу поживних середовищ і умов культивування.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

- дослідити фізіологічні, морфолого-культуральні та біохімічні властивості штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 за допомогою мікробіологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних методів;

- провести ідентифікацію штаму-продуцента *Bacillus thuringiensis* 87/3 за нуклеотидною послідовністю гена 16S рРНК;

- визначити вплив складу поживних середовищ та умов культивування на продуктивність штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3;

- отримати рідку препаративну форму на основі штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3;

- оцінити ентомоцидну, ентомотоксичну дію штамів *Bacillus thuringiensis* (H₁) 87/3, 800 на личинки колорадського жука (L₁₋₄);

- встановити біотехнологічні особливості штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 та аспекти його використання відносно личинок колорадського жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. (L₁₋₄) та фітопатогенних мікроміцетів роду *Fusarium*, *Venturia* ssp;

- у польових умовах здійснити апробацію рідких препаративних форм на основі *Bacillus thuringiensis* 87/3 для контролю чисельності популяції *Leptinotarsa decemlineata* Say.

Об'єкт дослідження – поліфункціональні властивості ентомопатогенного штаму *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (Bt H₁) 87/3, біотехнологія отримання рідких препаративних форм.

Предмет дослідження – зміна рівня синтезу ентомопатогенних метаболітів штамом *Bacillus thuringiensis* 87/3 при біотехнологічному культивуванні.

Методи дослідження: загальнонаукові методи (визначення напряму досліджень, планування та закладання дослідів, спостереження та аналіз); лабораторні методи (вивчення морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних особливостей штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3, оцінки ентомоцидної активності, виділення ДНК, ПЛР-аналізу, отримання рідкої препаративної форми штаму-продуценту); польові методи (визначення ефективності застосування препаративної форми на основі штаму ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* 87/3 при контролі чисельності личинок колорадського жука); розрахунково-порівняльний метод (оцінювання економічної ефективності застосування препаративної форми на основі *Bacillus thuringiensis* 87/3, оцінки кількісних і якісних показників продуктивності сортів картоплі); математично-статистичний метод (для оцінки вірогідності

отриманих експериментальних даних певного рівня значущості та залежностей між досліджуваними показниками).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплекс досліджень біологічних особливостей нового штаму ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* 87/3, що дозволяє створювати сучасні мікробні препарати для контролю чисельності *Leptinotarsa decemlineata* Say., розробляти технологічні прийоми їх виробництва та застосування в агробіоценозах.

Встановлено високий потенціал технологічності штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 при глибинному культивуванні (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу в межах 3,6–4,8 млрд в 1 мл культуральної рідини). Визначено оптимальний склад поживних компонентів в середовищах для ферментації штаму-продуценту *Bacillus thuringiensis* 87/3 та отримано рідку препаративну форму на його основі.

Набули подальшого розвитку дослідження ентомоцидної, антифунгальної активності біоагентів *Bacillus thuringiensis* 87/3 і 800 відносно природної популяції *Leptinotarsa decemlineata* Say., фітопатогенів р. *Fusarium*, *Venturia* ssp.

Обґрунтовано техніко-економічну ефективність біотехнології отримання і застосування рідких препаративних форм на основі ендоспорового штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 для контролю чисельності популяції колорадського жука, перспективи розширення спектру дії на шкочинні об'єкти.

Практичне значення одержаних результатів. Для лабораторного, малотоннажного, промислового отримання біотехнологічних продуцентів мікробних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis* 87/3 визначено оптимальний склад поживного середовища з повним циклом глибинної ферментації в комплексі з капустианим гідролізатом, що дає можливість активізувати вихід цільових метаболітів і сформувати за короткий період високий титр спор і кристалічного ендотоксину (до 4,8 млрд/мл культуральної рідини за 48 год).

Продемонстровано, що новий штам *Bacillus thuringiensis* 87/3 може бути перспективним для створення екологічно чистих біопрепаратів для фітозахисту, а також для контролю популяції колорадського жука в різних еколого-географічних регіонах України, регулювання розвитку фітопатогенних мікроміцетів-збудників парші яблуні, змішаних інфекцій.

Матеріали дисертації використовуються у навчальному процесі під час вивчення дисциплін «Промислова біотехнологія», «Загальна мікробіологія», «Методи створення інфекційних фонів» для ОС «Бакалавр», «Магістр» спеціальностей «Біотехнологія», «Захист рослин» Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Результати досліджень використано для розроблення практичних напрямів розвитку агробіотехнологій для господарств Київської, Житомирської, Чернігівської областей, зокрема, в частині перевірки і впровадження препаративних форм на основі штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 у ТОВ «Біотех ЛТД» Бориспільського району Київської області загальною площею обробки 25 м², Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового комплексу НААН (с. Прогрес Чернігівської області) – 25 м²,

Житомирській філії ТОВ «АСТ» (Попільнянський район Житомирської області) – 25 м².

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто опрацьовано, узагальнено наукові дані вітчизняних та іноземних авторів за темою дисертації, спільно з науковим керівником розроблено напрям досліджень, визначено мету, завдання, програму та методики виконання досліджень, здійснено планування експериментів, узагальнення лабораторних, польових результатів, підготовку публікацій. Автором особисто освоєно методи досліджень, організовано і проведено експериментальний блок робіт, сформульовано основні наукові положення дисертації, висновки і пропозиції виробництву.

Апробація результатів дисертації. Основні теоретичні положення і практичні результати досліджень представлено й обговорено на X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 2016 р.); XII Міжнародній науково-практичній конференції daRostim 2016 «Біотехнології для сільського господарства та захисту навколишнього середовища» (м. Одеса, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Selçuk ISCAS» (м. Анталія, Турецька Республіка, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Микробное биоразнообразие: Актуальные проблемы и решения» (м. Астана, Республіка Казахстан, 2016 р.); V Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Селекція, генетика та технології вирощування сільсько-господарських культур» (с. Центральне, 2017 р.); Третій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (м. Київ, 2017 р.); Міжнародній конференції молодих вчених «Modern problems of microbiology and biotechnology» (м. Одеса, 2017 р.); XV з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Одеса, 2017 р.).

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано у 18 наукових працях, з яких 2 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, 4 статті у наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 9 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, семи розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг дисертації становить 174 сторінки комп'ютерного тексту, робота містить 27 таблиць та 19 рисунків. Список використаних джерел налічує 245 найменувань, у тому числі 127 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* (огляд літератури)

Наведено узагальнення результатів досліджень вітчизняних та іноземних авторів щодо біологічного різноманіття та специфічних властивостей

ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*. Визначено і проаналізовано проблему пошуку оптимальних поживних складових для біотехнологічного культивування штамів ендоспорових бактерій, умов формування їх технологічної зрілості та факторів, що впливають на продуктивність та ентомоцидну активність. Опрацьовані наукові результати досліджень стали основою для аналізу регуляції ефективності процесу біотехнологічного виробництва препаративних форм на основі функціональних штамів-продуцентів *Bacillus thuringiensis*, напрямів їх застосування в агроценозах та одержання безпечної продукції рослинництва.

МІСЦЕ, УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано упродовж 2015–2018 рр. на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття, в лабораторії фітовірусології і біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України, у відділі промислової та харчової біотехнології Інституту харчової біотехнології та геноміки НААН, в лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН.

Використано штами спорових бактерій р. *Bacillus* (*Bacillus thuringiensis*) з колекцій культур непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення: Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (м. Чернігів) – штам природного типу *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (*BtH₁*) 87, ізольований з личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say. старшого віку (L₄) в природно-кліматичній зоні Чернігівського Полісся; Федеральної державної бюджетної установи Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології (м. Санкт-Петербург, м. Пушкін, Російська Федерація) – *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (*BtH₁*) 800, який використовується як еталонний, виробничий штам-продуцент біопрепарату Бітоксубацилін. Штам *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (*BtH₁*) 87/3, ізольований з личинки колорадського жука (L₄) в Чернігівській області та відселектований доктором сільськогосподарських наук Т. І. Патиною; штами *Bacillus subtilis* 0016, *Bacillus pumilus* 0097, *Bacillus kurstaki* 08 – із робочої колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Морфологію вегетативних та спорових форм бактерій вивчали загальноприйнятими мікробіологічними методами за методикою забарвлення В. А. Смирнова (1962). Мікроскопію проводили з використанням імерсії на світловому мікроскопі Axio Scope з фотофіксацією (збільшення 100), без імерсії на мікроскопі Polivar (збільшення 40).

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей штамів проводили, використовуючи диференційно-діагностичні середовища Гісса, Омелянського з урахуванням показників пептонізації молока, продукування ацетилметилкарбінолу, лецитинази, каталази, ліпази, розщеплення ескуліну, гідроліз

крохмалю, ферментації цукрів, протеолізу на м'ясо-пептонній желатині, редукцію нітратів до нітритів.

Оптимізацію умов культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 здійснювали за умов поєднання експериментального і математичного моделювання з проведенням обчислювального експерименту, визначенням математичної моделі та характеристики зв'язків параметру оптимізації з основними факторами. При цьому використано метод аналізу функції бажаності Е. К. Харрінгтона (1965). За середній рівень для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 приймали кукурудзяний екстракт 10 г/л, діамоній фосфат 1,5 г/л, глюкозу 15 г/л.

Вплив поживних речовин на продуктивність ентомопатогенних штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 (референт) досліджено на універсальних поживних середовищах: Luria-Bertani, м'ясо-пептонному бульйоні, оптимізованих лабораторно-промислових середовищах дріжджо-полісахаридного складу (3,0 % білково-вітамінний комплекс з додаванням 1,5 % кукурудзяного борошна), технологічному середовищі з мелясою (4,0 %), середовищі на основі капустиного гідролізату.

Динаміку росту штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 вивчали в процесі культивування на рідкому поживному середовищі на основі капустиного гідролізату при температурі 28 °С протягом 64–72 год на біотехнологічних платформах, в режимі орбітального руху 200–220 об/хв. Кількісний аналіз бактеріальних клітин проводили за прямим методом підрахунку загальної кількості клітин в популяції (світлова мікроскопія, Polivar, камера Горяєва). Вивчення впливу температурного фактора на ріст *Bacillus thuringiensis* 87/3 проводили при глибинному культивуванні в рідких середовищах (колби Ерленмеєра 250 мл) і при стаціонарному поверхневому рості культури у термостаті. При цьому ферментація штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 відбувалася в середовищі на основі капустиного гідролізату за різних температур (+25 °С, 30, 35, 37 °С впродовж 72 год). Загальну чисельність ендоспорових бактерій в культуральній рідині визначали через кожні 24 год впродовж 72 год (прямий мікробіологічний посів на агаризовані поживні середовища).

Вплив складу і співвідношень азотних і вуглецевих компонентів поживних середовищ на метаболізм штамів-продуцентів *Bacillus thuringiensis*, оптимальні умови їх культивування визначали за методами, описаними в оригінальних роботах Н. П. Ісакової (1972), Е. Р. Зурабової (1972), І. Ванкової (1962), Н. М. Барбашової (1972), В. О. Іваниці (2018), А. Bravo (2011).

Полімеразну ланцюгову реакцію за 16S рРНК проводили на 4-канальному ампліфікаторі «Терцик» науково виробничої фірми «ДНК-Технологія» (Російська Федерація) з використанням олігонуклеотидів SSU-642-F НААТНУГТGCCAGCAGC, SSU-1445-R GTCRTCCYDCCTTCCTC. Після ампліфікації генів нуклеотидну послідовність отриманого амплікону аналізували за допомогою секвенатора «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США). Результат секвенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньокомплементарної послідовностей з

використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних GenBank. Дендрограму філогенетичних зв'язків штамів *Bacillus thuringiensis* побудовано за допомогою програми MEGA6.

Для біологічних тестів використовували личинки колорадського жука молодшого віку (*Leptinotarsa decemlineata* Say., L₁₋₂) природної популяції, ізоляти мікроміцетів р. *Venturia* ssp. V14/5, V14/20 із робочої колекції лабораторії фізіології рослин і мікробіології Інституту садівництва НААН, виділені з уражених плодів яблук сорту Рум'яний альпініст, мікроміцети р. *Fusarium* ssp., ізолювані з рослин персика сорту Редхавен.

Для визначення антагоністичної активності бактеріальних штамів бактерій *Bacillus thuringiensis* по відношенню до фітопатогенних мікроміцетів використовували метод агарових блоків (Єгоров М. С., 2004) з подальшою оцінкою інгібуючої активності.

Вплив препаративних форм на основі штамів *Bacillus subtilis* 0016, *Bacillus pumilus* 0097, *Bacillus kurstaki* 08, *Bacillus thuringiensis* 87/3 на розвиток *Venturia* ssp. визначали в польових умовах шляхом позакореневої обробки дерев яблуні. Сад закладений у 2001 році на підщепі 54-118. Схема посадки дерев 5×3, система утримання ґрунту у міжряддях – природне задерніння. Для досліду брали сорти різних груп досягання, а саме: літній сорт Дельбарестіваль, осінній – Слава Переможцям та зимовий – Вільмута. Польові досліди проводили за схемою: контроль (обприскування дерев водою); варіанти обробки рослин рідкими препаративними формами штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3; *Bacillus subtilis* 0016; *Bacillus pumilus* 0097 з розрахунку 20 л/га, при витратах робочої рідини 250 л/га.

У модельних дослідженнях випробування ентомопатогенності спорокристалічного комплексу штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 здійснювали в лабораторних судинах, ємністю 0,5 л, в які розміщували тест-личинки колорадського жука разом з обробленими рослинами картоплі (кормом). Оброблені листя личинки споживали протягом трьох діб, після чого корм замінювали свіжим необробленим.

Облік загиблих тест-комах визначали на 3 добу, 5, 7 і 10 добу. Досліди проводили в трьох повторностях, по 20 личинок у кожній. У лабораторних умовах антифідантну активність штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 визначали через три доби після початку експерименту (Кандибін М. В., Патица Т. І. 2009; Гришечкина С. Д., 2015; Николаев А. Н., 2008; Лескова А. Я., 1987).

Ентомоцидну активність рідких форм препаратів на основі *Bacillus thuringiensis* вивчали за методиками А. А. Євлахової (1965), О. І. Швецової (1965), М. В. Кандибіна, Т. І. Патики (2009).

Ефективність дії досліджуваних рідких препаративних форм *Bacillus thuringiensis* на личинок колорадського жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. досліджували в лабораторних і польових умовах. Повторність дослідів – триразова. Польові досліди проводили за схемою: контроль – без обробки; контроль – хімічний інсектицид Патріот (0,3 л/га), варіант обробки рослин

рідкою препаративною формою *Bacillus thuringiensis*. Досліди закладали на облікових ділянках і в лізиметричній установці Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Використано картоплю сорту Ред Леді. Загальна площа дослідної ділянки 25 м². Загальна глибина лізиметрів, у відповідності з потужністю дерново-підзолистого ґрунту, складає 155 см, маса ґрунту в одному блоці – 10,5 т, посівна площа – 3,8 м². Агротехніка вирощування картоплі – загальноприйнята для зони Чернігівського Полісся. Ефективність препаратів оцінювали за кількістю загиблих личинок на 3 добу, 5, 7 і 10 добу постановки досліду, враховували структуру врожайності картоплі по варіантах.

Вплив штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 (еталон) та їхніх рідких препаративних форм на чисельність колорадського жука (антифідантний, ентомотоксичний ефекти) визначали в дрібноділянкових дослідах на експериментальних ділянках Національного університету біоресурсів і природокористування України, рослини картоплі сорту «Слов'янка», повторність триразова. Площа облікової ділянки 8 м². Спосіб посадки гребньовий з міжряддям 70 см, між рослинами в ряді 35 см, глибина закладення бульб 8–10 см.

Оцінку ефективності отриманих препаратів на основі штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 проти личинок колорадського жука L₁₋₂ та кількісні і якісні показники картоплі сорту Моцарт середньоранньої групи стиглості проводили в модельних польових дослідах на площах компанії ТОВ «Біотех ЛТД», с. Городище Київської області. Загальна площа дослідної ділянки 25 м². Обробку препаративною формою *Bacillus thuringiensis* 87/3 проведено в період масової появи личинок молодшого віку. Витрата робочої рідини 300–350 л/га. У схему дослідів було включено для порівняння варіант з обробкою рослин картоплі хімічним інсектицидом Когінор (0,25 л/га). Біохімічні показники якості бульб картоплі визначали в Українській лабораторії якості і безпеки продукції агропромислового комплексу Національного університету біоресурсів і природокористування України. Крохмаль визначали за питомою масою згідно ГОСТ 7194-81. Масову частку цукру визначали відповідно до ДСТУ 4954:2008 «Продукти перероблення фруктів та овочів, методи визначення цукрів». Економічну ефективність розраховано за методикою М. Р. Гончарова (2000), В. А. Захаренка (2000).

Статистичний аналіз даних проводили на персональному комп'ютері з використанням програм Microsoft Office Excel 10.0, Statistica 12, за t-критерієм Стьюдента і порівняння середніх величин, що використовується для перевірки рівності середніх значень у двох вибірках. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПОЛІМОРФІЗМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Аналіз різноманіття морфолого-колоніальних характеристик *Bacillus thuringiensis* 87/3 з урахуванням селекційних критеріїв відбору штамів-

продуцентів виявив такі основні типи: округлі сірувато-білі, з матовою дрібно-шорсткою поверхнею, діаметр 7–10 мм (1 тип); овальні з нерівними краями, бежеві, шорсткі, діаметр 4–6 мм (2 тип); сірувато-білі, матові, з ризоїдними краями, шорсткі та зморшкуваті, діаметр 8–12 мм (3 тип). З'ясовано, що основу популяції *Bacillus thuringiensis* 87/3 складала клітини першого морфотипу, який характеризується максимальним рівнем спороутворення (до 4,8 млрд в 1 мл культуральної рідини) і формуванням спор і кристалічних δ -ендотоксинів в оптимальних співвідношеннях – 1:1.

Визначено, що за основними біохімічними регуляторними ознаками штам *Bacillus thuringiensis* 87/3 відповідає референтному *Bacillus thuringiensis* 800 з вмістом α -екзо- та δ -ендотоксину. На поверхні рідких поживних середовищ штами утворюють тонку плівку (вуаль), під плівкою стовпчик середовища прозорий, є осад, пігменту не утворюють, колір поживного середовища не змінюється. Індол та сірководень не використовують, редукують нітрати в нітрити. В процесі росту штам *Bacillus thuringiensis* 87/3 утворює ацетилметилкарбінол на середовищах з пептоном і глюкозою, проявляється здатність до гідролітичного розщеплення крохмалю (зона гідролізу від 3,2 до 4,8 мм). Як джерело вуглецю аксенічні культури 87/3, 800 активно засвоюють цукрозу, глюкозу і манозу, мають протеолітичну активність, яка проявляється в розрідженні желатини і пептонізації казеїну молока. Уреазну активність не виявлено.

Молекулярно-біологічні дослідження штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 засновані на вивченні поліморфізму нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК. Отримані часткові послідовності загальною довжиною 700 п. н. порівнювали з відомими у базі даних GenBank.

Результати досліджень підтверджують належність штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 до роду *Bacillus*. На підставі аналізу нуклеотидної послідовності 16S рРНК побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків між різними представниками бактерій роду *Bacillus* (рис. 1). Сиквенс 16S рРНК штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010).

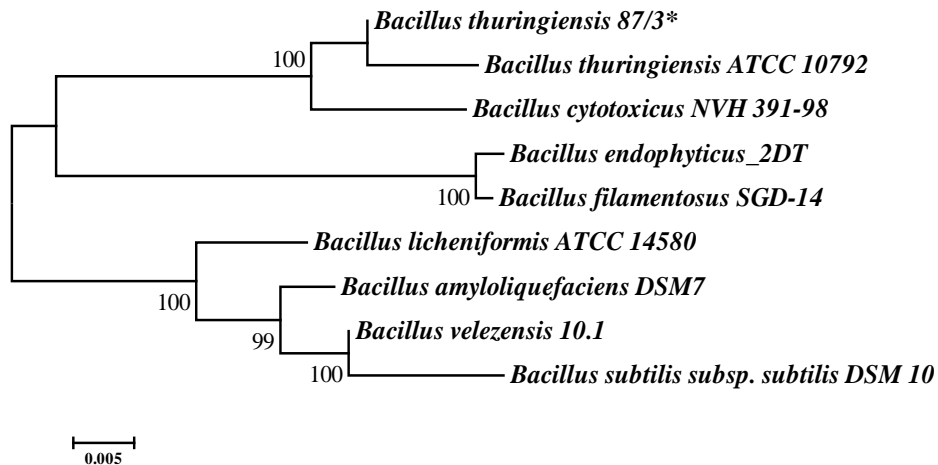


Рис. 1. Дендрограма філогенетичних зв'язків штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3

КОНТРОЛЬ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Удосконалення технологічних процесів виробництва біопрепаратів на основі *Bacillus thuringiensis* та підбір оптимального складу поживного середовища для культивування є важливим в аспекті підвищення рівня синтезу ентомотоксинів та біологічно активних речовин.

Для збільшення виходу термостійких спор і кількості δ -ендотоксину ферментаційне середовище поповнили кукурудзяним екстрактом, амінокислотами та мінеральними солями (магнієм, манганом, діамонієм фосфату). Використовуючи метод математичного планування експерименту, оптимізовано середовище для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 в умовах малотонажного виробництва біопрепаратів (рис. 2).

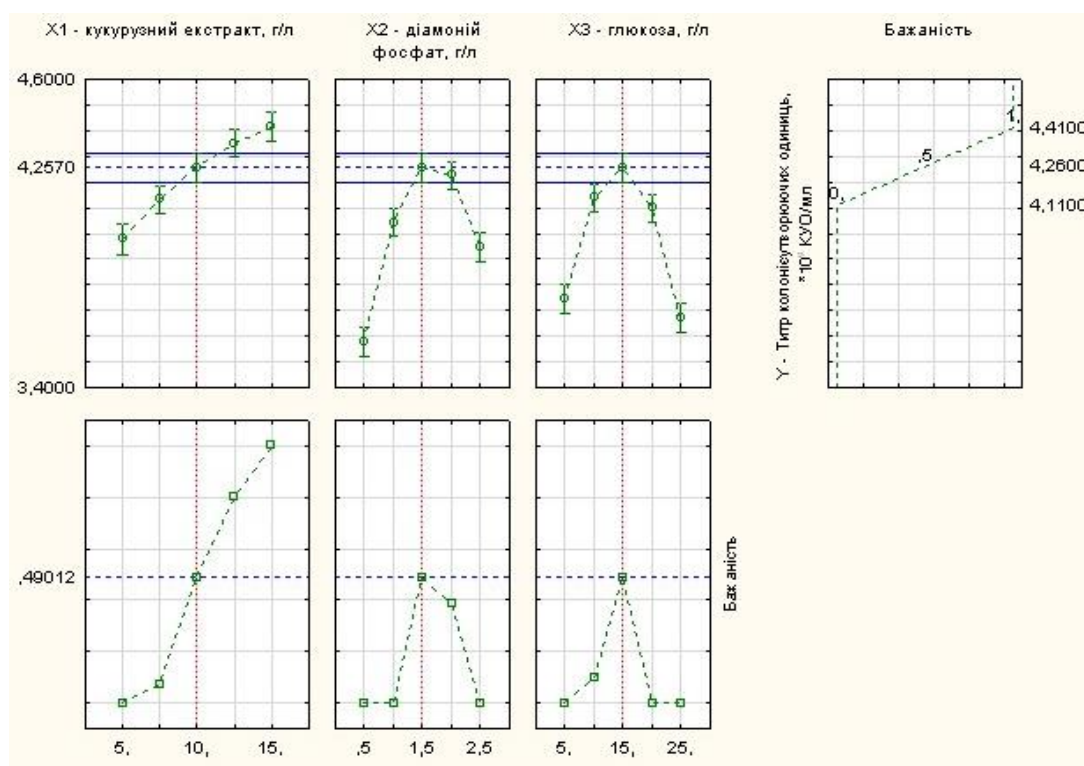


Рис. 2. Графічне відображення процедури знаходження оптимального складу поживного середовища для культивування *Bacillus thuringiensis* 87/3 з використанням капустианого гідролізату

Встановлено оптимальний склад поживного середовища для культивування *Bacillus thuringiensis* 87/3, а саме: кукурудзяний екстракт – 10 г/л; діамоній фосфат – 1,5 г/л; глюкоза – 15 г/л, при цьому за умов синхронного дозрівання культури можна отримати титр спор і δ -ендотоксинів до 4,0–5,0 млрд в 1 мл. При змінах температурного діапазону глибинного культивування штаму-продуцента *Bacillus thuringiensis* 87/3 (від 25 ± 1 до 30 ± 1 °C) в лабораторних умовах відбувається істотне підвищення чисельності життєздатних спор біоагенту, а подальше підвищення температури до 35 ± 1 °C знижувало рівень формування ентомоцидних метаболітів (δ -ендотоксину) у культуральній рідині.

Через 24 год культивування чисельність колонієутворюючих одиниць штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 зростала пропорційно із підвищенням температури і досягала максимальних значень (3,8 г/л) при 30 °С. За температури 25–26 °С вихід цільових метаболітів був у 1,5 рази менший (1,3–1,7 г/л), ніж за температури 28–30 °С, який складав відповідно 3,2–3,8 г/л (рис. 3).

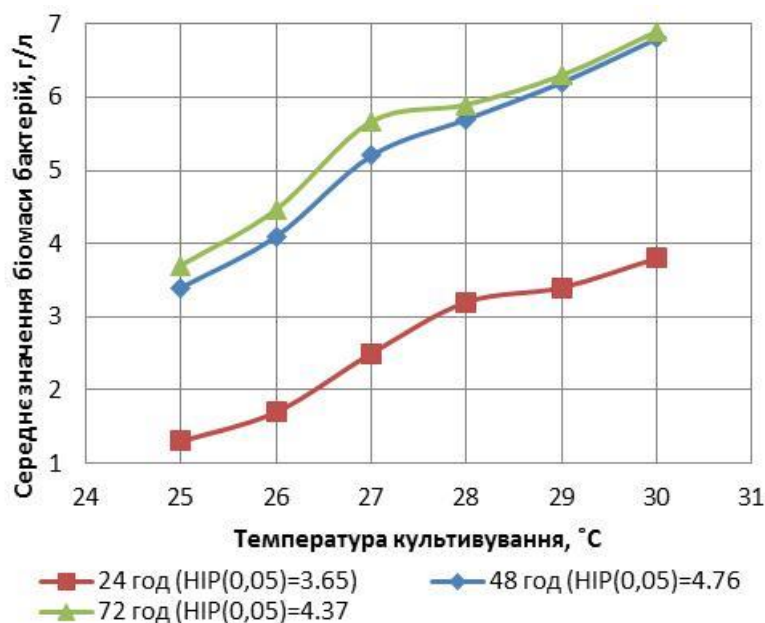


Рис. 3. Залежність накопичення біомаси штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 від температурного фактора біотехнологічного культивування

Під час дослідження впливу рН ферментаційного середовища на формування титру спор *Bacillus thuringiensis* 87/3 встановлено, що при показниках рН 8,0 через 48 і 72 год утворюється найбільша кількість життєздатних спор 731 і 863 млн/мл відповідно. При значеннях рН 4,0–5,0 споруляція не перевищувала 245–283 млн/мл.

Показано, що адаптація аксенічної культури *Bacillus thuringiensis* 87/3 до підбраного та оптимізованого середовища відбувається досить швидко, про це свідчить нетривала лаг-фаза та продукування ентомотоксинів при переході у фазу дозрівання. В експоненційній фазі росту *Bacillus thuringiensis* 87/3 зростає показник технологічності від 0,5 до 4,6 млрд/мл упродовж 16–32 год з моменту внесення інокулянту.

Максимальний вихід споро-кристалічного комплексу штаму (4,8 млрд/мл) триває 16 год у фазі стаціонарного росту та поступово знижується до 4,5 млрд/мл в процесі активної споруляції.

Для біотехнологічного виробництва мікробних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis* необхідно проводити постійний контроль активності штамів-продуцентів та відповідний відбір за ознаками промислово-цінних властивостей, оскільки вони характеризуються нестабільністю. Вплив поживних речовин у складі ферментаційних середовищ для штамів *Bacillus thuringiensis* (Bt) 87, 87/3, 800 з аналізом титру споро-кристалічного комплексу та ентомоцидного ефекту представлено в табл. 1.

**Вплив трофічних ресурсів на продуктивність штамів
Bacillus thuringiensis (модельний дослід, НУБіП України, 2015–2018 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</i> <i>decemlineata</i> Say. L ₁₋₂	НІР _{0,95}
Дріжджо-полісахаридне/ штам <i>Bt</i> № 87/3	3,0	96,8±0,6	2,45
Дріжджо-полісахаридне/ штам <i>Bt</i> № 800	2,4	95,6±1,2	2,09
4,0 % меляси/штам <i>Bt</i> № 87/3	2,7	92,0±0,8	1,62
4,0 % меляси/штам <i>Bt</i> № 800	2,6	94,3±0,5	2,02
МПБ/штам <i>Bt</i> № 87/3	2,1	86,0±1,1	2,71
МПБ/штам <i>Bt</i> № 800	2,0	88,3±1,2	2,69
LB/штам <i>Bt</i> № 87/3	2,3	87,7±1,8	2,67
LB/штам <i>Bt</i> № 800	2,1	89,0±1,3	1,54
Оптимізоване капустиане середовище/штам <i>Bt</i> № 87/3	4,7	99,1±0,9	1,82
Оптимізоване капустиане середовище/штам <i>Bt</i> № 800	3,6	98,7±0,7	1,51

Примітка. *Представлено результати трьох дослідів, де титр життєздатних спор наведений за максимальними межами варіювання продуктивності культур *Bt*; МПБ – м'ясо-пептонний бульйон; LB – середовище Лурія-Бертані

За умов використання глюкози, мальтози, цукрози, крохмалю, меляси як джерела вуглецю для розвитку *Bacillus thuringiensis* 87/3 доведено, що найбільш сприятливим виявилось співвідношення вуглецю до азоту 7:1. Найкращий ріст і розвиток штаму відбувається при використанні глюкози, вихід активного споро-кристалічного комплексу в культурі складав 1,773 млрд/мл.

Дослідження впливу різнокомпонентних середовищ (дріжджо-полісахаридне, мелясне, оптимізоване капустиане) на продуктивність штамів *Bacillus thuringiensis* першого серотипу показали різний рівень технологічності та прояв ентомопатогенної дії споро-кристалічного комплексу – від 2,0 до 4,8 млрд спор/мл та від 86,0 до 99,1 % відповідно. Крім цього, на дріжджо-полісахаридному та середовищі на основі капустианого гідролізату відбувалося синхронне спороутворення, що супроводжувалося більш високим виходом кристалічного ендотоксину, ніж на універсальних середовищах. Найсприятливішим виявилось співвідношення білково-вітамінного комплексу до кукурудзяного борошна 2:1 (3,0 і 1,5 % відповідно). Метаболічна активність природних бактеріальних штамів *Bacillus thuringiensis* демонструє важливість ефективного науково-обґрунтованого використання їх потенціалу в біотехнології, агробіології, аграрному виробництві.

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ *BACILLUS THURINGIENSIS*
ЗАЛЕЖНО ВІД ЦІЛЬОВОГО ОБ'ЄКТА
(на прикладі контролю популяції *Leptinotarsa decemlineata* Say.)**

Експериментально доведено, що найчутливішими до дії бактеріального споро-кристалічного комплексу *Bacillus thuringiensis* є передімагінальні стадії розвитку (личинки молодшого віку) фітофагів та виявлено пряму залежність загибелі особин від інфекційного навантаження. Загибель личинок молодшого віку L₁₋₂ колорадського жука на 10 добу обліку в варіантах з бактеріальними суспензіями на основі штамів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 склала 96–100 %. При цьому на оброблених рослинах личинки вже в перші три доби втрачають активність (табл. 2).

Таблиця 2

Ентомоцидна активність рідкої препаративної форми на основі штамів *Bacillus thuringiensis* (лабораторний дослід НУБіП України, 2016–2018 рр.)

Варіант дослідження	Середній титр спор, млрд/мл культуральної рідини	Відносна похибка, %	Загибель особин по днях обліку, %				НІР _{0,95}
			3	5	7	10	
Без застосування рідкої форми <i>Bacillus thuringiensis</i> (контроль)	–	–	0	0	2,0	3,0	0,7
<i>Bacillus thuringiensis</i> 87/3	4,83±0,16	8,9	33,0	67,7	91,0	100	18,4
<i>Bacillus thuringiensis</i> 800	3,67±0,09	7,6	28,8	56,5	84,3	96,0	19,1

Оцінка антифідантного ефекту рідких препаративних форм *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800, який проявляється контактено через смакові рецептори особин колорадського жука, в польових дослідженнях показала (табл. 3), що личинки споживають незначну частину листкової поверхні рослин (порівняно з контрольними неінфікованими), помітно відстаючи у рості та розвитку.

Таблиця 3

Антифідантна дія штамів-продуцентів *Bacillus thuringiensis* (біотест *Leptinotarsa decemlineata* Say., польовий дослід, НУБіП України, 2016–2018 рр.)

Показник	Варіант дослідження		
	Контроль (без обробок)	<i>Bacillus thuringiensis</i> 87/3	<i>Bacillus thuringiensis</i> 800
Ступінь пошкодження листкової поверхні, %, бал	80,0 (4 бала)	19,0 (2 бала)	23,0 (2 бала)
Маса личинок відносно контролю, %	100,0	51,3±0,15	55,7±0,8
НІР _{0,95}	1,06	0,98	1,18
Кількість пошкоджених рослин, %	55,0±0,53	20,0±0,51	25,0±1,30
НІР _{0,95}	0,531	0,511	1,233
Загибель личинок, % через 7 діб*	–	94,8±0,85	93,7±0,72
НІР _{0,95}	–	1,06	1,79

Стратегія взаємовідношень ентомопатогенів *Bacillus thuringiensis* з організмом комахи характеризується як агресивна, оскільки збереження

популяції шкідника не є обов'язковою умовою існування ентомопатогенних бактерій. Кристалічні параспоральні включення ентомопатогенного штаму бактерій *Bacillus thuringiensis* 87/3 розглядаються як високоспецифічні токсигенні компоненти для популяції колорадського жука.

Доведено, що в умовах Чернігівського Полісся ентомоцидна активність рідкої препаративної форми штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 щодо природної популяції *Leptinotarsa decemlineata* Say. на сьому добу досліду на рівні хімічного варіанта Патріот, до 95,6 % (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив *Bacillus thuringiensis* 87/3 на чисельність колорадського жука, L₁₋₂
(Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового
виробництва НААН, 2016–2018 рр.)**

Варіант досліду	Титр споро-кристалічного комплексу, млрд/мл культуральної рідини	Ентомоцидна активність (доба обліку), %			НІР _{0,95}
		5	7	10	
Без застосування рідкої форми <i>Bacillus thuringiensis</i> (контроль)	–	0	0	1,1	0,313
Патріот (0,3 л/га)	–	70,4	80,2	87,9	13,44
<i>Bacillus thuringiensis</i> 87/3 (250 л/га)	4, 83±0,12	88,0	95,6	99,4	0,72

У середньому за 2016–2018 рр. за умов обробки хімічним інсектицидом Патріот переважна кількість личинок (60,22 %) гине протягом трьох днів, тоді як після обробок рідким препаратом *Bacillus thuringiensis* 87/3 личинки уповільнюють свою харчову активність і через 10 діб спостерігається їх загибель. Результати польових досліджень підтверджують високу біологічну ефективність рідких препаративних форм на основі штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 щодо популяції колорадського жука – 99,4 % (табл. 5).

Врожайність картоплі у варіанті з ентомопатогенним штамом *Bacillus thuringiensis* 87/3 становила 31 т/га, відзначалося утворення бульб більшої фракції (в 1,3–2,0 рази порівняно з контролем без обробки) і зниження кількості, ваги дрібних бульб (у 2–4 рази).

Результативні показники біоконтролю чисельності популяції колорадського жука отримано в умовах Лісостепу України (ТОВ «Біотех ЛТД», с. Городище Київської області), де за дією ентомотоксинів у рідкій формі препарату *Bacillus thuringiensis* 87/3 відбувається пригнічення секреції травних ферментів личинок, порушення їх трофічних ритмів та функції кишківника (клітин-мішені) в цілому. Загибель шкідників настає на третю добу після обробки, а максимальний ефект – після семи днів. Результати досліджень свідчать про високу біологічну ефективність дії штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 щодо личинок колорадського жука – 98,4 %.

Показано, що найвищі показники якісного складу бульб картоплі були на варіанті обробки штамом *Bacillus thuringiensis* 87/3, при цьому бульби мали високий вміст крохмалю, який у два рази перевищує показники при застосуванні хімічного інсектициду Когінол. Масова частка крохмалю в

бульбах картоплі у варіанті з *Bacillus thuringiensis* 87/3 складала 4,72 %, тоді як у варіанті з хімічним інсектицидом не перевищувала 2,63 %. У середньому продуктивність картоплі становила 32,12 т/га у біологічному варіанті, 18,53 і 23,0 т/га при обробки хімічним інсектицидом і без обробки відповідно.

Таблиця 5

Зміна структури популяції колорадського жука при застосуванні *Bacillus thuringiensis* 87/3 (Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, польовий дослід, 2016–2018 рр.)

Варіант досліджу	Термін обліку, доба	Кількість фітофага, шт.					Загибель, %	НІР _{0,95}	Пошкодження рослин, %	НІР _{0,95}
		Імаго	L ₁₋₂	L ₃₋₄	Σ	Яєць				
Vt 87/3	0	15	98	60	173	90		25,71	25±1,6	1,47
	3	14	61	54	129	77	25±2,3			
	5	9	19	37	65	35	62±3,7			
	10	1	0	1	2	19	99±1,2			
Патріот	0	10	96	75	181	89		12,48	30±3,1	2,36
	3	4	32	36	76	62	60±3,5			
	5	3	14	12	29	32	76±2,2			
	10	2	11	9	22	23	87±1,8			
Контроль (без обробки)	0	13	92	67	172	81		18,54	55±2,8	1,96
	3	14	96	69	179	79	Збільшення чисельності шкідника			
	5	18	99	73	190	83				
	10	20	101	85	206	90				

Специфічна дія метаболітного комплексу *Bacillus thuringiensis* 87/3 по відношенню до ґрунтової мікробіоти (на прикладі контролю мікроміцетів р. *Fusarium* spp., *Venturia* spp.). Встановлено, що під впливом споро-кристалічного комплексу штамів *Bacillus thuringiensis* 800 та метаболітів рідких концентратів *Bacillus subtilis* 0016, *Bacillus pumilus* 0097 відбуваються значні зміни морфогенезу мікроміцету *Fusarium* ssp. у всіх варіантах досліджу, зокрема, прояв характерних зон лізису, зміни щільності, товщини та напрямку росту міцелію, а також ступінь інгібування проростання конідій в межах 64–83 %. У контролі (без культуральної рідини штамів) середній діаметр тест-культури на десяту добу становив 2,5 см, порівняно з дослідними варіантами, в яких зафіксовано ріст міцелію не більше 1,6–1,8 см. Визначено, що найбільш вираженою антифунгальною активністю володіє штам *Bacillus thuringiensis* 800, при титрі життєздатних спор 2,0 млрд/мл.

Під впливом споро-кристалічного комплексу штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 відбуваються також зміни морфогенезу тест-культури мікроміцету *Venturia* ssp. 14/5, 14/20. Зафіксовано прояв характерних зон лізису, змінюються щільність, товщина та напрямок росту міцелію, а також ступінь інгібування проростання конідій у межах 86,0–93,0 %. У контролі (без штаму) середній діаметр мікроміцету на 10 добу становив 2,1 см порівняно з дослідними варіантами, в яких зафіксовано ріст міцелію не більше 0,4–0,7 см. Встановлено, що позакоренева обробка дерев яблуні різних термінів досягання рідкою препаративною формою *Bacillus thuringiensis* 87/3 сприяла зменшенню

кількості уражених листків паршею в 1,5–2,0 рази, порівняно з контрольним варіантом. Так, у оброблених варіантах відсоток ураження не перевищував 40,0 %, тоді як у контрольних становив від 55,0 % (рослини сорту Слава Переможцям) та до 70,0 % (сорт Вільмута). Показано, що рідку форму *Bacillus thuringiensis* 87/3 можна успішно застосовувати для контролю фітопатогенних мікроміцетів, зокрема проти збудників парші, а також змішаних інфекційних фонів.

ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ *BACILLUS THURINGIENSIS* ПРОТИ *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*

На основі проведення техніко-економічного розрахунку впровадження біотехнологічних агентів *Bacillus thuringiensis* в агровиробництво встановлено, що економічна ефективність від реалізації препаративної форми *Bacillus thuringiensis* 87/3 складе 110353,6 грн на перший рік роботи цеху (біолабораторії), а в наступні роки прибуток збільшиться на 60,0 %. Польова ефективність препаративної форми *Bacillus thuringiensis* на картоплі складе близько 82562 грн в порівнянні з хімічним препаратом Патріот. Наведені розрахунки відображають економічну перспективу розвитку аграрних біотехнологій, впровадження технологічних форм *Bacillus thuringiensis* 87/3 у виробництво, раціональне використання енергоресурсів (рівень рентабельності 56,6 %) та отримання екологічно чистої продукції рослинництва.

Впровадження технологічних форм *Bacillus thuringiensis* 87/3 у виробництво дозволяє більш раціонально використовувати енергоресурси та отримувати екологічно чисту продукцію рослинництва.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне і практичне обґрунтування біотехнології отримання і використання препаративних форм на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* для ефективного агровиробництва та екологічної стабільності біоценозів.

1. Визначено морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні властивості нового штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3, які за комплексом діагностично-диференційних ознак відповідають референтному штаму *Bacillus thuringiensis* 800.

2. За молекулярно-філогенетичним аналізом послідовності гена 16S рРНК штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 встановлено його видову приналежність до *Bacillus thuringiensis* H1. Сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010).

3. Для біотехнологічного одержання цільових ентомотоксичних метаболітів штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 оптимізовано поживне середовище на основі капустиного гідролізату, що уможливило отримання високого виходу життєздатного споро-кристалічного комплексу за 48 год глибинного культивування (титр спор і δ -ендотоксинів складає до 4,8 млрд/мл культуральної рідини).

4. Встановлено, що зміни фізіологічного і технологічного стану штаму-продуцента *Bacillus thuringiensis* 87/3 за послідовних етапів ферментації відбуваються у процесі використання глюкози (15 г/л), внаслідок чого активність споруляції посилюється, а в результаті оптимального співвідношення джерел вуглецю й азоту в поживному середовищі (7:1) формується високий титр спор і кристалів 3,87–4,34 млрд/мл.

5. Показано технологічність штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 за умов регулювання процесу культивування та поживних компонентів у складі середовищ. Так, дріжджо-полісахаридне, мелясне й капустиане середовища стимулюють вихід споро-кристалічного комплексу від 2,0 до 4,8 млрд спор в 1 мл (рідка препаративна форма штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3). За умов тестування штамів-продуцентів *Bacillus thuringiensis* 87/3, 800 на ентомоцидну активність виявлено ефективність контролю природної популяції колорадського жука від 86,0 до 99,1 %.

6. Функціональна активність *Bacillus thuringiensis* 87/3 залежно від цільового об'єкта (на прикладі контролю популяції *Leptinotarsa decemlineata* Say.) свідчить, що за дії ентомотоксичних метаболітів відбувається зниження харчової активності личинок, відставання в розвитку та рості (маса відносно контролю 53,4 %). Загибель фітофага настає на третю добу після обробки, а максимальний ефект після 7 діб (96,0–99,0 %).

7. Специфічна антагоністична дія метаболітного комплексу *Bacillus thuringiensis* 87/3 проявляється по відношенню до ґрунтової мікробіоти (на прикладі контролю мікроміцетів р. *Fusarium* spp., *Venturia* spp.), ступінь інгібування проростання конідій у межах 86,0–93,0 %.

8. Найвища продуктивність картоплі простежується в умовах Чернігівського Полісся на фоні застосування рідких препаративних форм *Bacillus thuringiensis* 87/3 (300 л/га), що досягало 31 т/га при утворенні бульб товарної фракції (в 1,3–2,0 рази більшої порівняно з контролем без обробки біоагентом) і зниження кількості дрібних бульб в 2–4 рази відповідно.

9. Доведено, що біотехнологія отримання рідких препаративних форм на основі *Bacillus thuringiensis* 87/3 для контролю фітофагу *Leptinotarsa decemlineata* Say. в агроценозах є рентабельним виробництвом (56,6 %). Максимальний прибуток в технології вирощування картоплі за внесення *Bacillus thuringiensis* 87/3 складає 82562 грн.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Регіональним виробництвом мікробних препаратів для сільського господарства пропонується біотехнологічний функціональний штам-продуцент *Bacillus thuringiensis* 87/3 (біоагент рідких препаративних форм) з якісними показниками активності до 4,8–5,0 млрд спор/мл та високою адаптивністю до умов культивування.

Для сільськогосподарських підприємств доцільно застосування рідких препаративних форм на основі *Bacillus thuringiensis* проти популяції колорадського жука на початку формування їх першої генерації, шляхом триразової обробки рослин картоплі робочим розчином з розрахунку 250 л/га.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Бойко М. В.**, Патика Т. І., Патика М. В., Вінцовська Ю. Ю. Оцінка антагоністичних властивостей штамів бактерій роду *Bacillus*. Садівництво. 2017. Вип. 72. С. 148–154. (Здобувачем досліджено антагоністичні властивості штамів р. *Bacillus* щодо тест-організму *Venturia* spp., підготовлено статтю до друку).

2. **Бойко М. В.**, Патика М. В., Патика Т. І. Ентомопатогени *Bacillus thuringiensis* як основа біотехнологічних препаратів широкого спектру дії. Наукові горизонти. 2018. № 7 (70). С. 187–191. (Здобувачем визначено технологічність штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3, ентомоцидність і антифунгальну дію, підготовлено статтю до друку).

Статті у наукових фахових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

3. Бойко М. В. Ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis* та їх потенціал в біоконтролі комах. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. 2017. № 3 (45). С. 32–35.

4. Бойко М. В. Оптимізація складу поживного середовища для культивування ентомопатогенів *Bacillus thuringiensis* 87/3. Подільський вісник: сільське господарство, техніка, економіка. 2018. Вип. 28. С. 17–25.

Стаття у науковому виданні іншої держави

5. **Boiko M. V.**, Patyka M. V., Vintskovs'ka Y. Y. Estimation of the genus *Bacillus* bacterial strains antagonist properties against pathogenic micromycetes. Annals of Advanced Agricultural Sciences. 2017. Vol. 1 (2). P. 65–69. (Здобувачем особисто проведено лабораторні дослідження з визначення антифунгальної дії *Bacillus thuringiensis* 87/3, підготовлено статтю до друку).

Статті у наукових виданнях України,

включених до міжнародних наукометричних баз даних:

6. **Бойко М. В.**, Патика М. В., Патика Т. І. Біотехнологічні аспекти використання біоагентів роду *Bacillus* проти фітопатогенних мікроміцетів *Fusarium* ssp. Науковий погляд у майбутнє. 2016. № 4 (10). С. 81–86. (Здобувачем досліджено антагоністичні властивості штамів р. *Bacillus* щодо тест-організму *Fusarium* spp., підготовлено статтю до друку).

7. **Boiko M. V.**, Patyka N. V., Patyka T. I. Estimation of productivity *Bacillus Thuringiensis* on different media. Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 1 (37). С. 16–22. (Здобувачем досліджено вплив компонентів поживних середовищ на продуктивність ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*).

8. Патика Т. І., **Бойко М. В.**, Патика М. В. Біотехнологічна поліфункціональність метаболітного споро-кристалічного комплексу та особливості культивування *Bacillus thuringiensis*. Мікробіологічний журнал. 2017. № 2 (79). С. 77–84. (Здобувачем досліджено поліфункціональні

властивості бактеріальних штамів *Bacillus thuringiensis*, підготовлено статтю до друку).

9. **Boiko M. V.**, Patyka N. V., Shulga S. M., Tiginova O. O., Andriash H. S. Mathematical modeling of optimization nutrient medium composition for entomopathogenic bacteria strain *Bacillus thuringiensis* 87/3 cultivation. *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11 (2). P. 40–46. (Здобувачем, використовуючи метод математичного планування експерименту, оптимізовано поживне середовище для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3, підготовлено статтю до друку).

Тези наукових доповідей:

10. **Бойко М. В.**, Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І. Біотехнологічні аспекти виробництва мікробних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis*. Біотехнологія XXI століття: X Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Київ, 22 квітня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 68. (Здобувачем досліджено вплив поживних ресурсів на культивування *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези до друку).

11. **Бойко М. В.**, Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І. Біорізноманіття та токсигенний потенціал ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* для біотехнологій фітозахисту. Біотехнологія: звершення та надії: V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, м. Київ, 12–13 травня 2016 року: тези доповіді. К., 2016. С. 169. (Здобувачем досліджено інсектицидну активність штамів *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези до друку).

12. **Бойко М. В.**, Пати́ка М. В., Пати́ка Т. І. Біотехнологічний спосіб отримання ентомопатогенних препаратів на основі *Bacillus thuringiensis*. Біотехнології для сільського господарства та захисту навколишнього середовища: XII Міжнародна науково-практична конференція daRostim 2016, м. Одеса, 7–9 вересня 2016 року: тези доповіді. Одеса, 2016. С. 68–72. (Здобувачем досліджено вплив компонентів поживного середовища на типр споро-кристалічного комплексу *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези до друку).

13. **Boiko M. V.**, Patyka N. V., Patyka T. I. Biotechnology of applying microbial agents *Bacillus thuringiensis*. Selçuk ISCAS 2016: Selçuk international scientific conference on applied sciences, Antalya, 27–30 September 2016. P. 157. (Здобувачем оцінено потенціал технологічності аксенічної культури штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3, підготовлено тези до друку).

14. **Boiko M. V.**, Patyka N. V., Patyka T. I. Antagonistic properties microbial agents of the genus *Bacillus* against phytopathogenic micromycetes *Fusarium* ssp. Микробное биоразнообразие: Актуальные проблемы и решения: Международная научно-практическая конференция, г. Астана, Республика Казахстан, 25 ноября 2016 года: тезисы доклада. Астана, 2016. С. 215–217. (Здобувачем досліджено антифунгальну дію мікробних агентів *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези доповіді).

15. **Бойко М. В.**, Вінцовська Ю. Ю. Особливості застосування біоагентів *Bacillus thuringiensis*. Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур: V Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених і спеціалістів, с. Центральне, Миронівський район, Київська область, 21 квітня 2017 року: тези доповіді. Центральне, 2017. С. 71. (Здобувачем досліджено особливості використання *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези до друку).

16. Бойко М. В. Поліфункціональність біоагентів *Bacillus Thuringiensis*. Біологія рослин та біотехнологія: Третя конференція молодих учених, м. Київ, 16–18 травня 2017 року: тези доповіді. К., 2017. С. 86.

17. **Boiko M. V.**, Vintskovs'ka Y. Y. Estimation of the genus *Bacillus* bacterial strains antagonist properties. Modern problems of microbiology and biotechnology: International conference of young scientists, Odesa, 20–24 June 2017. P. 7–10. (Здобувачем досліджено специфічність дії метаболітного комплексу *Bacillus thuringiensis*, підготовлено тези до друку).

18. Бойко М. В. Застосування біоагентів *Bacillus Thuringiensis* для контролю фітопатогенів. XV з'їзд Товариства мікробіологів України імені С. Н. Виноградського, м. Одеса, 11–15 вересня 2017 року: тези доповіді. С. 115.

АНОТАЦІЯ

Бойко М. В. Функціональні біотехнологічні агенти *Bacillus thuringiensis* для контролю популяції колорадського жука. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук зі спеціальності 03.00.20 «Біотехнологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню біологічної дії ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* та розробленню технологічних параметрів отримання препаративних форм на їх основі для контролю чисельності колорадського жука.

За результатами комплексу досліджень біологічних особливостей нового штаму ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* 87/3 оптимізовано біотехнологічні етапи його культивування і отримання сучасних препаративних форм для контролю чисельності *Leptinotarsa decemlineata* Say. Оптимізовано середовище з додаванням капустиного гідролізату, яке дає можливість отримати за 48 год культивування високий вихід життєздатних клітин (титр спор складає до 4,4 млрд/мл культуральної рідини).

Показано, що культура штаму *Bacillus thuringiensis* 87/3 має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу складає від 3,6 до 4,8 млрд/мл культуральної рідини), ентомоцидності (99,1 %) та антифунгальної дії, яка виявляється у зменшенні кількості уражених листків паршею яблуні в 1,5–2 рази, порівняно із контрольним варіантом, що розширює можливості використання біоагента.

Економічно обґрунтовано ефективність біотехнології отримання рідких препаративних форм на основі *Bacillus thuringiensis* 87/3 для контролю фітофагів в агроценозах, що підтверджено рентабельним виробництвом (рівень 56,6 %), максимальним рівнем прибутку у технології вирощування картоплі у варіанті за внесення *Bacillus thuringiensis*, який складає 82562 грн.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis* 87/3, споро-кристалічний комплекс, оптимізація поживного середовища, глибинне культивування, цільовий продукт, ентомоцидна активність, *Leptinotarsa decemlineata* Say.

АННОТАЦІЯ

Бойко М. В. Функциональные биотехнологические агенты *Bacillus thuringiensis* для контроля популяции колорадского жука. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.20 «Биотехнология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Диссертация посвящена изучению биологического действия энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* и разработке технологических параметров получения препаративных форм на их основе для контроля численности колорадского жука.

По результатам комплекса исследований биологических особенностей нового штамма энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* 87/3 оптимизированы биотехнологические этапы его культивирования и получения современных препаративных форм для контроля численности *Leptinotarsa decemlineata* Say. Оптимизирована среда с добавлением капустного гидролизата, которая даёт возможность получить за 48 часов культивирования высокий выход жизнеспособных клеток (титр спор составляет до 4,4 млрд/мл культуральной жидкости).

Показано, что культура штамма *Bacillus thuringiensis* 87/3 имеет высокий потенциал технологичности (титр метаболитного споро-кристаллического комплекса составляет от 3,6 до 4,8 млрд/мл культуральной жидкости), энтомоцидности (99,1 %) и антифунгального действия, которое проявляется в уменьшении количества повреждённых листьев паршой яблони в 1,5–2 раза, по сравнению с контрольным вариантом, что расширяет возможности использования биоагента.

Экономически обоснована эффективность биотехнологии получения жидких форм препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* 87/3 для контроля фиточагов в агроценозах, что подтверждено рентабельным производством (уровень 56,6 %), максимальным уровнем прибыли в технологии выращивания картофеля в варианте с применением *Bacillus thuringiensis*, который составляет 82562 грн.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* 87/3, споро-кристаллический комплекс, оптимизация питательной среды, глубинное культивирование, целевой продукт, энтомоцидная активность, *Leptinotarsa decemlineata* Say.

ANNOTATION

Boiko M. V. Functional biotechnological agents *Bacillus thuringiensis* for colorado beetle population control. – The Manuscript.

Thesis for awarding the candidate degree in agricultural sciences by specialty 03.00.20 «Biotechnology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the study of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* biological action and the development of technological parameters for the preparation of preparative forms based on them to control the number of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.).

In thesis the physiological, culture-morphological, molecular-biological, and biochemical properties of *Bt* 87/3 strain were studied. The conducted researches open prospects of *Bt* 87/3 strain using in the agricultural practice with the further receiving technologies development of the biopreparation polyfunctional type of action.

The molecular-biological analysis of the *Bt* 87/3 strain was carried out, based on the study of the 16S rRNA nucleotide sequences genes polymorphism. Based on the analysis of the 16S rRNA nucleotide sequence, a dendrogram of phylogenetic connections between different representatives of the bacteria genus *Bacillus* was constructed. The 16S rRNA strain sequence was registered and entered into the GenBank database (MH719010).

The nutrient medium for cultivation was optimized by the composition of sources of carbon and nitrogen feed, as well as on the content of micro elements. We used the cabbage broth as the basis for preparing the nutrient medium. Using mathematical method of experiment planning, the nutrient medium was optimized for the *B. thuringiensis* 87/3 cultivation in the conditions of biolabs low tonnage production. The nutrient medium optimization was carried out in the alternation of the maximum and minimum values contents of the media components. Optimum concentrations were investigated in the medium of carbon source (15 g/l of glucose), nitrogen (10 g/l of corn extract) and content of phosphorus-containing inorganic salts (1,5 g/l of diamonium phosphate). The results of the studies indicate that optimized medium provides the ability to obtain a high yield of viable cells in 48 hours of cultivation (the titre of the metabolic spore-crystalline complex is up to 4,4 billion/ml of culture liquids). The nutrient medium proposed composition is much cheaper than laboratory medium, which are widely used for cultivation microorganisms of this species and can be recommended for using in laboratory and production conditions.

In the conditions of Chernihiv Polissya, field studies of the *Bacillus thuringiensis* 87/3 strain entomocidal activity against *Leptinotarsa decemlineata* Say larvae were conducted. It was found that the *Bacillus thuringiensis* 87/3 liquid formulation was equally active against larvae of 1–2 ages and young imago. *Bacillus thuringiensis* 87/3 functional activity showed that by the action of entomotoxic

metabolites there was a decrease in nutritional activity, metamorphosis and growth (weight relative to control 53,4 %). The phytophagus death occurs on the third day after treatment, and the maximum effect – after seven days. The field investigation results indicate a high biological efficacy of *Bacillus thuringiensis* liquid formulations on the colorado potato beetle larvae – 99,4 %. At the same time the potato yield was in variants with *Bacillus thuringiensis* 87/3 – 31 t/ha, with chemical insecticide Patriot – 28 t/ha. There was an increase in tubers biomass. Under the action of *Bacillus thuringiensis* 87/3, tubers mass occurred due to the formation of a larger fraction (in 1,3–2,0 times as compared with control) and a decrease in the number and mass of small tubers (2–4 times).

It was 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 3,6 to 4,8 billion/ml culture fluid) insecticidal (98,4 %) and antifungal action, which manifested in changes of *Venturia* ssp. micromycetes morphogenesis in particular expression of specific lysis zones, change the density, thickness, the growth direction of mycelium and the inhibition of conidia germination within 86–93 %.

The difference in the degree of inhibitory effect of the *B. thuringiensis* strains culture liquid on phytopathogenic test culture *Fusarium* spp. was demonstrated. Thus, the retarding of conidia germination ranged from 54,0 to 60,0 % with appropriate mycelium browning. The metabolites of spore-forming bacteria, besides the entomocidal activity against phytophages have appeared to be of considerable interest as for the microbial interaction and as the basis of the preparations of the multifunctional actions.

It is economically justified that phytoprotection based on *Bacillus thuringiensis* 87/3 in the colorado beetle control system allows more efficient using of energy resources in agricultural production (the field effectiveness of the biological preparation on potato plants will be about 82562 UAH compared with chemical preparations; profitability level of production 56,6 %).

Key words: *Bacillus thuringiensis* 87/3, spore-crystal complex, nutrient medium optimization, deep cultivation, target product, entomocidal activity, *Leptinotarsa decemlineata* Say.