

## NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 32 (2016), 81 – 85

**BIOLOGICAL AKTIVITY ASSESSMENT OF STRAINS  
OF KAZAKHSTAN'S ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA WHICH  
IS USED TO PRODUCTION OF BIOPREPARATION****N. Seitkali, N.Kazez, B.B. Anapyaev, A. Nusipjan**Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan  
[nukesh127@mail.ru](mailto:nukesh127@mail.ru)**Key words:** Microorganism, strain, bacterium, entomopathogen, isolation.**Abstract:** The article deals with the cultural and morphological and biochemical properties of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* isolated from bodies of dead insects which have colibacillosis symptoms. They are rod-shaped, Gram-positive aerobic and average crystal spore-forming bacteria.For monitoring the effects of insecticide and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains, caterpillars of hawthorn moth (*Archips crataegana*) were used as test objects.

ӘОЖ 630.5 : 632. 93 (574.51)

**БИОПРЕПАРАТТАРДЫ ӨНДІРУГЕ НЕГІЗ БОЛАТЫН  
ҚАЗАҚСТАНДЫҚ ЭНТОМОПОТОГЕНДІ БАКТЕРИЯ  
ШТАММДАРЫНЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН БАҒАЛАУ****Н. Сейткали, Н. Қазез, Б.Б. Анапияев, А. Нүсіпжан**

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

**Түйін сөздер:** микроорганизм, штамм, бактерия, энтомопотоген, бөліп алу.**Аннотация:** Мақалада Іле Алатауларының жабайы жемісті орман белдеуіндегі алма ағаштары астында қалыптасқан орманның күнгірт-сұр топырақтарындағы бактериоз белгісімен өлген бунақденелілердің денесінен бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* бактерия штаммдарының морфо-культуралық белгілері, биохимиялық қасиеттері қарастырылған. Олар таяқша пішінді, грам оң, аэробты, қоректік ортаға спора мен кристалл түзетін бактериялар.*Bacillus thuringiensis* штамдарының уыттылығын және инсектицидті әсерін бақылау үшін тест-объекті ретінде жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдыз құрттары (*Archips crataegana*) қолданылады.**Кіріспе.** Қазіргі таңда биопрепараттар нарығының 90-95 % *Bt* споро-кристаллды кешеннен тұрады. Дүние жүзінде *Bt* түрлері негізіндегі препараттардың 20 жуық өнеркәсіптік үлгілері жасалды.Споратүзуші энтомопатогенді бактерияларды Луи Пастер өзінің тұт жібек құртының ауруларын зерттеу кезінде байқаған болатын. Бірақ, споралы кристалл түзуші микроорганизмдер жөніндегі алғашқы көз жеткізерлік жұмыстар Жапонияда жарияланған болатын. 1901-1902 жылдары жапон оқымыстысы Ишивата тұт жібек құрттарынан спора түзуші бактерияларды бөліп алды, оны *Bacillus sotto* деп анықтады. 1908 жылдан бастап Ивабуши Жапонияда «sotto» - тұт жібек құрты құртының параличін қоздырғышы жөнінде жазды. Еуропада *Bacillus thuringiensis* жөніндегі

мәліметтер «*Ephestia kuehniella* Zell» қамбалық отшаларды әкелгеннен кейін пайда болды. Сонымен, Тюрингия провинциясында (Германия) жоғарыда аталған бунақдененің ауру құртынан неміс ғалымы Берлинер 1911-1915 жылдары спора түзетін бактерияларды анықтады және оны *Bacillus thuringiensis* деп атады [1].

70-ші жылдары Орта Азия республикаларында энтомопатогенді микроорганизмдер іздестіруге анағұрлым мән беретін болды. Сонымен, Е.Н. Троицкая, Е.Н. Михайлов, Г.А. Плужников фитофагтардан көп мөлшерде кристалл түзуші бациллалар алды, олардың арасында жаңа түрі болды және оны *Bt. subsp. Asiae-medicae* деп атады [2].

Жапон оқымыстысы алынған штаммның антигендік құрылымын зерттей отырып, жаңа серовар анықтады, оны олар *Bt. subsp. Kuushiensis* (11a серовар: 11c) деп атады. Осы штамм тоumanoff-тан кейбір биологиялық қасиеттерімен ерекшеленді [3].

Қазақстанда алғаш рет кристалл түзуші бактериялар 1962 жылы ҚазСРО ҒА микробиология және вирусология институтында М.В. Яловицин және ҚазӨҚКҒЗИ мамандары ашқан.

Авторлар зиянды бунақденелілер үшін табиғи эпизоотия кезінде өлген алма күйесі, жусан жапырағын жегішінің бацилласы және т.б. бунақденелілерден уыттыларын бөліп алды [4,5].

Қазақстан жағдайында өсімдіктер зиянкестеріне қарсы тиімді отандық биопрепараттар шығару үшін жергілікті энтомопатогенді микроорганизмдерді бөліп алу жұмыстары жүргізілді.

**Материялдар мен әдістер.** Зерттеу материялы ретінде бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактерия штаммдары, олардың морфологиялық белгілері, клеткалардың пішіні, көлемі, клеткалардың орналасуы спора мен кристалл түзуі микроскоп (МТ6300Н) арқылы бақыланды.

Бактерияның таза культурасын алуда зертханада егу және қайталап егу әдістері қолданылады. Мұнда стерильді қоректік орталар пайдаланылады [6].

Кристалл түзуші бактерияларды бөліп алу үшін арнайы А қоректік ортасы пайдаланылады. құрамы: пептон 0,7%, балық гидролизаты 0,4%, NaCl 0,65%, агар-агара 1,5%.

Топырақтан дайындалған суспензияны 70 С<sup>0</sup> температураға жеткізіп қыздырамыз. Петри табақшасындағы арнайы А қоректік ортасына 0,25мг суспензия құйып, шпательмен жаймалап беттік егу жүргізіледі. Шпательдегі жұғындыдан екінші және үшінші петри табақшаларына қайталап егу жүргізіледі. термостатта 5-7 тәулік 28<sup>0</sup>С өсіру жүргізіледі.

Өскен колонияларды морфологиялық сипаттау үшін қолданбалы заттық шыныға жұғынды препарат жасап, микроскопта (x 900-1000), иммерсия майының астында бақылау жүргізіледі. Мұнда мақсат *Bt* колониясынан спора және кристалдарды анықтау. Штамм дақылдарына стандарт бойынша 4 мл дистилденген су құйып, сұйылту жасап Том Гораев камерасында титрі есептелнді. Титрі 1x10<sup>7</sup> дәрежесінде есептелініп штаммның биологиялық белсенділігін анықтау үшін жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдызқұртына зертханалық тәжірибелер жүргізілді [7].

Микроорганизмдердің биохимиялық қасиеттерін көмірсулар бар ортада өсіру барысында қышқыл түзу, газ түзуімен анықталынды. Қышқыл түзілуі қышқылдылық белсенділігінің өзгеруімен (рН) және газ түзілуін беткі қабатта пайда болған көпіршіктермен анықталынды.

#### **Зертеу нәтижелері және оларды талдау.**

2015 жылы Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған энтомопатогенді бактерия штаммдарының морфо-культуралдық қасиеттерін зерттеу сонымен қатар олардың өсуі мен кристалл түзу қабілетін бақылау үшін құрамы әр түрлі қоректік орталарға нүктелеп егіп өсірілді. Талдау нәтижесінде 8 штамм энтомопатогенді бактерия *Bacillus thuringiensis* түршесі екендігі анықталды.

Бактерия штаммдарын «А» қоректік ортасында өсіргенде колониясы (S) пішінді 0,5-2,6 см, дөңгелек, түсі-ақ сұр және ақшыл сары, беті-тегіс, шеті-паста тәрізді микроскоппен бақылауда вегетативті жасуша өлшемдері 0,6-1,4 x 3,5-4,6 мкм. Бактерия клеткалары термостатта 28-30 С<sup>0</sup> өсіру барысында 5-6 тәулігінде спора және кристалл түзеді. Аэробты грам оң бактериялар. Олар

қоректік ортада өсу барысында энтомоцидті әсері бар жәндіктерге токсинді болып келетін ромб тәрізді кристаллдар бөледі.

Энтомопатогенді миккроорганизмдердің ұйыттылық қасиет көрсетуі жәндіктердің ауыз қуысы арқылы ас қорыту жүйесінде кристаллдар мен токсиндер түзуінде. Осы арқылы зиянкестерді өлімге душар етеді [8].

Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған бактерияларды қоректік ортада өсіру арқылы колониясының тәулік бойы өсуі бақыланды (1-кесте).

1-кесте – Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактерия колонияларының тәулік бойы өсуі көрсеткіші

Топырақ үлгілері	Колониялардың тәулік бойы өсуі (см)			
	1	2	3	4
ВТА <sub>1</sub> – 15	0,5-0,7	1,2-1,3	1,5-1,7	1,7-1,9
ВТА <sub>2</sub> – 15	0,6-0,8	1,1-1,2	1,5-1,6	1,7-1,8
ВТА <sub>3</sub> – 15	0,5-0,6	1,1-1,2	1,4-1,6	1,7-1,9
ВТА <sub>4</sub> – 15	0,7-0,9	1,1-1,3	1,7-1,8	2,1-2,3
ВТА <sub>5</sub> – 15	0,6-0,7	1,2-1,2	1,7-1,7	2,1-2,2
ВТА <sub>6</sub> – 15	0,6-0,8	1,1-1,3	1,3-1,5	1,8-1,9
ВТА <sub>7</sub> – 15	0,6-0,7	1,1-1,2	1,8-1,9	2,4-2,6
ВТА <sub>8</sub> – 15	0,6-0,8	1,1-1,2	1,5-1,6	1,8-2,1

Іле Алатауының жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактерияларының тәулік бойы өсуі зерттелінді. Мұнда алғашқы бір тәулікте орташа 0,5-0,9 см-ден бастап өсудің соңғы 5-6 тәулігінде минимум 1,1-1,3см, максимум 2,4-2,6см-ге дейін колония диаметрінің өсу көрсеткіші байқалады.

Зерттелініп отырған энтомопатогенді бактериялардың биохимиялық қасиетін бағалауда көмірсулармен реакциясы анықталды. Көмірсулар-бактериялардың қоректік ортада спора мен кристалл түзілуіне жұмсалатын энергия көзі болып табылады. Бактериялардың көмірсуларға қажеттілігін анықтау үшін қоректік ортаға әртүрлі қаныттарды қосып өскен колониялардың қышқыл мен газ түзу реакциясының жүруімен анықталады. Қышқыл түзілуі қышқылдылық белсенділігінің өзгеруімен (рН) және газ түзілуін беткі қабатта пайда болған көпіршіктермен анықталынды (2-кесте).

2-кесте – Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактерия штамдарының биохимиялық қасиеттері

Штамдар	Ацетил-метилкарбинол (АМК)	Лецитови телинді реакция (ЛВР)	Протеолиз	Амилаза	Уреаза	Қышқыл түзуі		
						сахароза	манноза	салицил
ВТА <sub>1</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>2</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>3</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>4</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>5</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>6</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>7</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++
ВТА <sub>8</sub> – 15	+	+	+	+	–	–	+	++

Ескерту: ++ - биохимиялық реакциясы интенсивті;  
 +- биохимиялық реакциясы оң  
 -- биохимиялық реакциясы теріс

Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактериялардың таза культураларының барлығы ацетил-метилкар биолда, лецитови телінде газ түзілуі байқалады. Манноза және салицинды ортада қышқыл түзеді. Сахарозада ортаның өзгеруі байқалмады.

*Bacillus thuringiensis* штамдарының уыттылығын және инсектицидті әсерін бақылау үшін тест-объекті ретінде жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдызқұрты (*Archips crataegana*) қолданылады.

Жапырақ ширатқыш көбелектің жұлдызқұрттары (*Archips crataegana*) 16-аяқты, сирек түктері бар, бас қою қоңыр немесе қара, денесі сұр, қара түсті. Ұзындығы 1 см дейін жетеді, түрлі өсімдіктердің жапырақтарымен қоректенеді. Жапырақ ішінде өрмек құрып ішінде оралып тұрады. Маусымның аяғында қуыршаққа айналып, екі аптадан кейін көбелекке айналады [9].

3-кесте – Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* бактерия штамдарының жапырақ ширатқыш жұлдыз құрттарға биологиялық әсері

Тәжірибе варианты	Спора титры	Жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдыз құрттарының өлу мөлшері, %				
		1-тәулік	2-тәулік	3-тәулік	4-тәулік	5-тәулік
ВТА <sub>1</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	65±1,75	77,5±0,75	85±0,5	90±0,5	92,5±0,75
ВТА <sub>2</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	40±1,5	62,5±0,38	80±1	80±1	87,5±1,38
ВТА <sub>3</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	47,5±1,25	75±1,5	80±1	85±0,5	82,5±1,25
ВТА <sub>4</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	37,5±1,25	67,5±0,88	72,5±1,25	80±1	80±1
ВТА <sub>5</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	55±1	70±0,5	80±0	90±0,5	90±0,5
ВТА <sub>6</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	62,5±0,38	77,5±0,75	90±0,5	90±0,5	92,5±0,75
ВТА <sub>7</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	62,5±1,75	80±1,5	85±1	87,5±0,88	92,5±0,75
ВТА <sub>8</sub> – 15	1x10 <sup>7</sup>	47,5±1,25	75±1	80±1	82,5±1,25	82,5±1,25

Энтомопатогенді бактериялардың жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдыз құрттарына биологиялық әсерін зерттеуде штамдар 5-тәулікте 80-92,5% көрсеткішке жетті. ВТА<sub>6</sub> – 15 штаммы 3- тәулікте 90% көрсетті.

**Қорытынды.** Зерттеулеріміздің нәтижесі бойынша Іле Алатауы жабайы жемісті орман белдеуіндегі бактериоз белгілерімен өлген бунақденелілерден бөлініп алынған *Bacillus thuringiensis* энтомопатогенді бактерияларының тәулік бойы өсуі зерттелінді. Мұнда алғашқы бір тәулікте орташа 0,5-0,9см-ден бастап өсудің соңғы 5-6 тәулігінде минимум 1,1-1,3см, максимум 2,4-2,6см-ге дейін колония диаметрінің өсу көрсеткіші байқалады.

Бактериялардың биохимиялық қасиетін бағалауда көмірсулармен реакциясы анықталды, таза культуралар барлығы ацетил-метилкар биолда, лецитови телінде газ түзілуі байқалады. Манноза және салицинды ортада қышқыл түзеді. Сахарозада ортаның өзгеруі байқалмады.

*Bacillus thuringiensis* штамдарының уыттылығын және инсектицидті әсерін бақылау үшін тест-объекті ретінде жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдызқұрты (*Archips crataegana*) қолданылады. Жапырақ ширатқыш көбелегінің жұлдыз құрттарына биологиялық әсерін зерттеуде штамдар 5-тәулікте 80-92,5% көрсеткішке жетті. ВТА<sub>6</sub> – 15 штаммы 3- тәулікте 90% көрсетті.

#### ӘДЕБИЕТ

- [1] Berliner E. Uber die Schlafsucht der Mehlmottraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n-sp. // Z. Angew. Entomol. 1915. Vol. 2. P.29-56.
- [2] Троицкая Е.Н., Михайлов Е.Н., Плузников Г.А. Новая разновидность *Bacillus thuringiensis* // Узбек. Биол. журнал. 1973. №3. С. 47.
- [3] Ohba M., Aizawa K. new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subs. *Kyushuensis* // J. Invertebr. Pathol. – 1989. – Vol. 54(2). – P. 208-212.
- [4] Яловицин М.В. Энтомопатогенные микроорганизмы и применение их в борьбе с вредителями: автореф. канд. биол. наук. - Алма-ата, 1969.

- [5] Масиевская Л.М. Сводный отчет Каз НИИЗР. -1967.
- [6] Говоров Д. Н., Живых А.В., Проскурякова М.Ю. Производство биопрепаратов и энтомофагов в системе ФГБУ «Россельхозцентр» в 2011 г. //Вестник защиты растений № 3, 2012. - С. 18-20.
- [7] Штерншис М.В. Тенденции развития биотехнологии микробных средств защиты растений в России // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012. № 2. – С. 15.
- [8] Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофизм и паразитизм патогенных бактерий (экологические аспекты), 1988, Новосибирск.
- [9] Кузнецов В.И. Сем. Tortricidae (Olethreutidae, Cochyliidae) – Листовертки. / Насекомые и клещи — вредители сельскохозяйственных культур. Т. 3, ч. 1. Чешуекрылые. СПб.: Наука, 1994. - С. 51-234.

#### REFERENCES

- [1] Berliner E. Uber die Schlafsucht der Mehlmottraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n-sp. // Z. Angew. Entomol. **1915**. Vol. 2. - P.29-56.
- [2] Troiskaia E.N., Mihailov E.N., Plujnikov G.A. New diversity of *Bacillus thuringiensis* // Uzbek.Biol.journal. **1973**. - №.3. P. 47.
- [3] Ohba M., Aizawia K. new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subs. *Kyushuensis* // J. Invertebr. Pathol. **1989**. Vol.54(2). P.208-212.
- [4] Yalovinsin M.V. Entomopathogenic microorganisms and use their effective: auro per. kan. bio. science.- Almaty, **1969**.
- [5] Masievskaya L.M. Summary report Kaz SRIPP. **1967**.
- [6] Govorov D.N., Jyvih A.V., Proskuriakova M.YU. Manufacturing biologics and entomophages system FGBU «Rosselhoz center» in 2011. // Plant Protection News. № 3. **2012**. P. 18-20.
- [7] Shternshis M.V. Trends in the development of microbial biotechnology of plant protection products in Russia // Bulletin of Tomsk State University. Biology. **2012**. № 2. p15.
- [8] Somov G.P, Litin V.Y. Saprophytism parasitism and pathogenic bacteria (environmental aspects), 1988, Novosibirsk.
- [9] Kuzensov V.Y. Сем. Tortricidae (Olethreutidae, Cochyliidae) - Caterpillars of hawthorn moth. / Insect and pest of agricultural cultur. Т. 3, h. 1. . Сpb.: Science, **1994**. P51-234.

#### ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS THURINGIENSIS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ

Н. Сейткали, Н. Қазез, Б.Б. Анапияев, А. Нүсіпжан

*Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан*

В статье рассматриваются морфо-культуральные, биохимические свойства энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis*, выделенной из мертвых насекомых с признаками бактериоза, формировавшихся под дикими яблоневыми деревьями лесного пояса Илейского Алатау. Они палочковидные, грамположительные, аэробные, кристалл- и средние спорообразующие бактерии.

Для наблюдений токсичности и инсектицидности в качестве тест-объекта использовались гусеницы боярышниковой листовертки (*Archips crataegana*)

*Поступила 29.03.2016 г.*