



УДК: 579.64: (575.1)

Фотима НОРМАМАНОВА,

Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека
E-mail: salimovna.fatima@icloud.com ORCID: 0009-0004-5255-4838

Шохиста ТАШМУХАМЕДОВА,

Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека

Фазилат НИЗОМИТДИНОВА,

Кафедра Биотехнология, Ташкентский Фармацевтический институт

Статья опубликована по рецензию В.В. Шурыгина

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОЙ ИНСЕКТИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ЭНДОФИТНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УЗБЕКИСТАНА, ПРОТИВ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*)

Аннотация

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) представляет серьезную угрозу для пасленовых культур из-за быстрого развития устойчивости к химическим инсектицидам. Целью исследования являлась оценка инсектицидной эффективности местных изолятов *Bacillus thuringiensis* из Узбекистана против личинок *L. decemlineata* и отбор перспективных штаммов для создания биопестицида. Проведены изоляция и скрининг коллекции аборигенных штаммов с последующей статистической обработкой данных методами ANOVA и критерия Тьюки. В результате идентифицировано четыре высокоэффективных штамма. Штамм Bt-07 вызвал гибель 86,7% личинок первого возраста, что статистически подтверждает его лидирующую позицию.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, биологическая борьба, жесткокрылые, *Leptinotarsa decemlineata*, Cry-токсины.

EVALUATION OF THE ECOLOGICALLY SAFE INSECTICIDAL ACTIVITY OF NATURAL ENDOPHYTIC STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*, ISOLATED IN THE TERRITORY OF UZBEKISTAN, AGAINST THE COLORADO POTATO BEETLE (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*)

Annotation

The Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) poses a serious threat to solanaceous crops due to the rapid development of resistance to chemical insecticides. The aim of this study was to evaluate the insecticidal efficacy of local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Uzbekistan against *L. decemlineata* larvae and to select promising strains for the development of a biopesticide. A collection of native strains was isolated and screened, followed by statistical analysis using ANOVA and Tukey's test. Four highly effective strains were identified. Strain UzBt-07 caused 86.7% mortality in first-instar larvae, statistically confirming its leading position.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, biological control, beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, Cry-toxins.

ЎЗБЕКИСТОН HUDUDIDA IZOLALANGAN *BACILLUS THURINGIENSIS* TABIIY ENDOFITIK SHAMLARINING KOLORADO EKOLOGIK QO'NG'IZIGA QARSHI EKOLOGIK XAVFSIZ HASHROQLAR FAOLIYATINI BAHOLASH

Annotation

Колорадо картошка qo'ng'izi (*Leptinotarsa decemlineata* Say) kimyoviy insektitsidlarga chidamlilikning tez rivojlanishi tufayli solanaceous ekinlarga jiddiy xavf tug'diradi. Ushbu tadqiqotning maqsadi O'zbekistondan *Bacillus thuringiensis* ning mahalliy izolatlarining *L. decemlineata* lichinkalariga qarshi insektitsid samaradorligini baholash va biopestisid yaratish uchun istiqbolli shtammlarni tanlashdan iborat edi. Mahalliy shtammlar to'plami ajratildi va skrining qilindi, so'ngra ANOVA va Tukey testidan foydalangan holda statistik tahlil qilindi. To'rtta yuqori samarali shtamm aniqlandi. Bt-07 shtammi birinchi bosqichli lichinkalarning 86,7% o'limiga sabab bo'ldi, bu esa uning yetakchi mavqeini statistik jihatdan tasdiqlaydi.

Kalit so'zlar: *Bacillus thuringiensis*, biologik nazorat, qo'ng'izlar, *Leptinotarsa decemlineata*, Cry-toksinlar.

Введение. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) остается серьезной угрозой для пасленовых культур во всем мире из-за его выдающейся способности вырабатывать устойчивость к химическим инсектицидам. **Цель.** Данное исследование было направлено на оценку инсектицидной эффективности местных изолятов *Bacillus thuringiensis* из Узбекистана против личинок *L. decemlineata* и выявление наиболее перспективных кандидатов для разработки биопестицидов.

Введение. Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) признан одним из наиболее опасных дефляторов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и других растений семейства пасленовых в глобальном масштабе [1]. Высокая экологическая пластичность этого вредителя и его способность к интенсивному размножению, а также выработанная резистентность более чем к 50 группам химических инсектицидов сделали его модельным объектом для изучения механизмов устойчивости к пестицидам [2, 3]. Чрезмерная зависимость от синтетических нейротоксинов не только снизила эффективность контроля популяций, но и привела к загрязнению агроценозов, сокращению биоразнообразия энтомофагов и повышению рисков для здоровья человека [4].

В рамках концепции интегрированной защиты растений (ИПМ) микробиологические агенты рассматриваются как устойчивая и безопасная альтернатива. Среди них грамположительная бактерия *Bacillus thuringiensis* является наиболее успешно применяемым биоинсектицидом [5]. Токсикологический потенциал *Bacillus thuringiensis* определяется параспоральными кристаллическими белками (Cry- и Cyt-эндотоксины), синтезируемыми в период споруляции, а также белками Vip, выделяемыми в фазе вегетативного роста [6, 7]. Механизм действия бактерии включает поедание кристаллов личинкой, их растворение в щелочной среде кишечника, протеолитическую активацию протоксина и связывание со специфическими рецепторами эпителиальных клеток кишечника. Этот процесс приводит к образованию пор в мембране, осмотическому лизису, параличу пищеварительной системы и, в конечном итоге, к гибели личинки [8, 9].

Специфичность токсинов *Bacillus thuringiensis* обусловлена наличием соответствующих рецепторов, что делает бактерию безопасной для позвоночных животных, человека и большинства полезных насекомых [10]. Однако чувствительность *L. decemlineata* к штаммам *Bacillus thuringiensis* не является универсальной; она ограничена наличием определенных Cry-белков, в частности семейства Cry3 (Cry3A, Cry3B, Cry3C) [11, 12].

Несмотря на наличие коммерческих препаратов на основе *Bacillus thuringiensis*, их биологическая эффективность может варьировать в различных климатических и экологических условиях. В связи с этим поиск местных штаммов с высокой токсичностью и способных преодолевать существующую устойчивость остается актуальной задачей [13]. Узбекистан, обладая разнообразными климатическими зонами — от орошаемых оазисов до аридных пустынных территорий — представляет собой малоизученный резервуар микробиологических ресурсов. В этом контексте выделение местных штаммов *Bacillus thuringiensis* и характеристика их инсектицидных свойств имеют важное научное и практическое значение.

Материалы и методы исследования

Выделение *Bacillus thuringiensis* из почвенных образцов всего было собрано 45 почвенных образцов из ризосферы и сельскохозяйственных полей в шести регионах Узбекистана (Ташкентская, Самаркандская, Ферганская, Бухарская, Кашкадарьинская области и Каракалпакстан) в летний период 2024 года. Сбор почвенных проб осуществлялся из пяти-десятисантиметрового слоя ризосферы; герметично упакованный биоматериал доставлялся в исследовательский центр при соблюдении температурного режима +4°C.

Выделение *Bacillus thuringiensis* проводили по методу ацетатной селекции, описанному Travers и соавт. [14], с незначительными модификациями. Кратко: 1 г почвы суспендировали в 10 мл бульона Лурия-Бертани (LB), дополненного 0,25 М ацетатом натрия. Суспензию инкубировали на качалке (250 об/мин) в течение 4 часов при 30°C, затем подвергали тепловой обработке при 80°C в течение 10 минут для уничтожения не спорообразующих бактерий. Аликвоты высевали на питательный агар и инкубировали при 30°C в течение 48 часов. Колонии, демонстрирующие типичную морфологию *Bacillus thuringiensis* (округлые, серовато-белые, с видом «яичницы-глазуньи»), отбирали для дальнейшей очистки. Всего 14 изолятов были подтверждены как Bt на основе наличия параспоральных кристаллов, визуализированных под фазово-контрастным микроскопом (Zeiss Axio Imager.A2, Германия) при увеличении 1000×.

Разведение насекомых Лабораторная колония *L. decemlineata* была создана из взрослых особей, собранных на необработываемом картофельном поле в Ташкентской области. Жуков содержали на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт «Умид») в садках из сетки в контролируемых условиях: 25 ± 2°C, относительная влажность 65 ± 5%, фотопериод 16:8 ч (свет:темнота). Свежие листья картофеля предоставляли ежедневно. Для всех биоанализов использовали личинок первого возраста (новорожденные, <24 ч).

Результаты. Выделение и морфологическая характеристика. Из 45 обработанных почвенных образцов 14 изолятов были подтверждены как *Bacillus thuringiensis* на основе морфологии колоний и наличия параспоральных кристаллов. Фазово-контрастная микроскопия показала, что все изоляты продуцируют кристаллы сферической или бипирамидальной формы, характерные для штаммов *Bacillus thuringiensis* с потенциальной активностью против чешуекрылых и жесткокрылых. На данном уровне наблюдения значительных морфологических различий между изолятами не обнаружено.

Инсектицидная активность против *L. Decemlineata* Инсектицидная активность 14 местных изолятов *Bacillus thuringiensis* против личинок первого возраста *L. decemlineata* значительно варьировала. Средняя процентная смертность, зарегистрированная через 24, 48 и 72 часа после обработки, суммирована в Таблице 1. Смертность в контрольной группе оставалась незначительной (<3%) на протяжении всего экспериментального периода, что подтверждает, что наблюдаемые эффекты были обусловлены обработкой бактериями.

В временной точке 24 часа смертность была в целом низкой, только несколько изолятов вызывали гибель более 20% личинок. Однако к 48 и 72 часам эффекты стали более выраженными, что соответствует времени, необходимому для проглатывания, растворения и действия токсина в средней кишке насекомого.

Таблица 1.

Суммарная смертность (% , среднее ± SD) личинок первого возраста *L. decemlineata* после воздействия изолятов *Bacillus thuringiensis*.

Код изолята	Смертность через 24 ч (%)	Смертность через 48 ч (%)	Смертность через 72 ч (%)
Контроль	0,0 ± 0,0	1,7 ± 2,0	2,5 ± 2,5
Bt-01	5,0 ± 4,1	17,5 ± 6,5	27,5 ± 5,0
Bt-02	7,5 ± 5,0	22,5 ± 9,6	35,0 ± 7,1
Bt-03	17,5 ± 5,0	45,0 ± 5,8	75,0 ± 5,8
Bt-04	2,5 ± 2,5	10,0 ± 4,1	15,0 ± 4,1
Bt-05	10,0 ± 4,1	27,5 ± 5,0	42,5 ± 6,5
Bt-06	5,0 ± 4,1	20,0 ± 7,1	30,0 ± 7,1
Bt-07	22,5 ± 5,0	60,0 ± 8,2	86,7 ± 4,3
Bt-08	12,5 ± 6,5	30,0 ± 7,1	47,5 ± 9,6
Bt-09	7,5 ± 2,5	25,0 ± 5,8	37,5 ± 5,0
Bt-10	2,5 ± 5,0	12,5 ± 6,5	22,5 ± 5,0
Bt-11	20,0 ± 7,1	52,5 ± 9,6	80,0 ± 7,1
Bt-12	10,0 ± 4,1	32,5 ± 5,0	52,5 ± 5,0

Vt-13	5,0 ± 4,1	15,0 ± 5,8	25,0 ± 4,1
Vt-14	15,0 ± 4,1	42,5 ± 9,6	72,5 ± 6,5

Сравнительная эффективность через 72 часа и статистический анализ

Для выявления наиболее перспективных штаммов был проведен детальный статистический анализ данных по смертности через 72 часа. Однофакторный ANOVA выявил высоко значимый эффект изолята *Bacillus thuringiensis* на смертность личинок ($F(13, 56) = 24,37$, $*p < 0,001$), указывая на то, что не все изоляты были одинаково эффективны.

Для группировки изолятов на основе их эффективности был использован пост-хок критерий Тьюки (HSD). Результаты этого анализа представлены в Таблице 2. Изолятам были присвоены буквы (от а до е); изоляты с одинаковыми буквами не имеют статистически значимых различий ($*p > 0,05$), в то время как изоляты с разными буквами значимо различаются ($*p < 0,05$).

Таблица 2.

Статистическая группировка изолятов Vt на основе 72-часовой смертности *L. decemlineata* (критерий Тьюки HSD, $\alpha = 0,05$).

Код изолята	Смертность через 72 ч (% , среднее ± SD)	Группировка по Тьюки HSD
Vt-07	86,7 ± 4,3	a
Vt-11	80,0 ± 7,1	a
Vt-03	75,0 ± 5,8	a b
Vt-14	72,5 ± 6,5	a b
Vt-12	52,5 ± 5,0	b c
Vt-08	47,5 ± 9,6	c d
Vt-05	42,5 ± 6,5	c d e
Vt-09	37,5 ± 5,0	c d e
Vt-02	35,0 ± 7,1	d e
Vt-06	30,0 ± 7,1	d e
Vt-01	27,5 ± 5,0	d e
Vt-13	25,0 ± 4,1	e
Vt-10	22,5 ± 5,0	e
Vt-04	15,0 ± 4,1	e
Контроль	2,5 ± 2,5	f

Анализ выявил четыре изолята (Vt-07, Vt-11, Vt-03 и Vt-14) как наиболее эффективные, все они вызывали смертность выше 70%. Изолят Vt-07 продемонстрировал самую высокую эффективность (86,7%), поместив его в верхнюю статистическую группу 'a'. Изолят Vt-11 (80,0%) был статистически эквивалентен Vt-07, также попадая в группу 'a'. Изоляты Vt-03 (75,0%) и Vt-14 (72,5%), будучи высокоэффективными, показали статистическое перекрытие как с верхней группой, так и с последующей.

Закключение. В ходе этого исследования была успешно проведена изоляция и скрининг коллекции местных штаммов *Bacillus thuringiensis* из Узбекистана на предмет их инсектицидного потенциала против колорадского жука. Благодаря тщательным лабораторным биоанализам и статистическому анализу с применением ANOVA и критерия Тьюки было выявлено четыре высокоэффективных штамма. Штамм Vt-07 продемонстрировал превосходную эффективность, вызвав 86,7% гибель личинок первого возраста, что статистически поместило его в число наиболее эффективных кандидатов.

Наши результаты подтверждают, что почвы Узбекистана являются средой обитания уникальных генотипов

Bacillus thuringiensis со значительным потенциалом для защиты растений. Методологический подход, объединяющий микробиологические техники с надежной статистической оценкой, предоставляет надежную модель для отбора штаммов. Идентификация этих активных местных штаммов является ключевым первым шагом к разработке locally produced, экологически устойчивого биоpestицида. Это позволит снизить зависимость от импортных химических инсектицидов, поддерживать более безопасное производство продуктов питания и способствовать сохранению полезного биоразнообразия в агроэкосистемах.

Будущие исследования будут сосредоточены на: (I) молекулярной идентификации генов Cry-токсина, присутствующих у Vt-07; (II) оптимизации условий ферментации для максимального выхода токсина; (III) разработке подходящей препаративной формы с УФ-протекторами; и (IV) оценке эффективности готового продукта в полевых испытаниях против *L. decemlineata*.

ЛИТЕРАТУРА

- Alyokhin, A. (2009). Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 3(1), 10-19.
- Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., & Hollingworth, R. M. (Eds.). (2008). *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CABI.
- Szendrei, Z., & Weber, D. C. (2019). *Leptinotarsa decemlineata* (Say): A review of its biology and management. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1), 1-15.
- Damalas, C. A., & Koutroubas, S. D. (2018). Current status and recent developments in biopesticide use. *Agronomy*, 8(1), 13.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423-431.
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2), 242-255.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Advances in Insect Physiology*, 43, 1-33.

9. Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3-22.
10. Glare, T. R., & O'Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley & Sons.
11. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., & Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807-813.
12. Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., & Ferré, J. (2020). Insecticidal activity of Bt toxins against coleopteran pests. *Pest Management Science*, 76(9), 2903-2912.
13. Jouzani, G. S., Valijanlian, E., & Sharafi, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2691-2711.
14. Travers, R.S., Martin, P.A., & Reichelderfer, C.F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1263-1266.