КЫРГЫЗ-ТҮРК МАНАС УНИВЕРСИТЕТИ

ТАБИГЫЙ ИЛИМДЕР ИНСТИТУТУ

ӨСҮМДҮКТӨРДҮ КОРГОО (АГРОНОМИЯ) БАГЫТЫ

ЭНТОМОПАТОГЕНДИК BACILLUS THURİNGİENSİS БАКТЕРИЯСЫНЫН БИОЛОГИЯСЫ ЖАНА ЗЫЯНКЕЧТЕРГЕ КАРШЫ АКТИВДҮҮЛҮГҮ

Даярдаган

Сезим Жолдошбекова

Жетекчиси

Профессор Тинатин Дөөлөткелдиева

Магистрдик диссертация

Июнь, 2019

БИШКЕК/КЫРГЫЗСТАН

2019

ЭНТОМОПАТОГЕНДИК BACILLUS THURİNGİENSİS БАКТЕРИЯСЫНЫН БИОЛОГИЯСЫ ЖАНА ЗЫЯНКЕЧТЕРГЕ КАРШЫ АКТИВДҮҮЛҮГҮ

Сезим Жолдошбекова

КЫРГЫЗ-ТҮРК «МАНАС»УНИВЕРСИТЕТИ
ТАБИГЫЙ ИЛИМДЕР ИНСТИТУТУ
ӨСҮМДҮКТӨРДҮ КОРГОО (АГРОНОМИЯ) БАГЫТЫ

ЭНТОМОПАТОГЕНДИК BACILLUS THURİNGİENSİS БАКТЕРИЯСЫНЫН БИОЛОГИЯСЫ ЖАНА ЗЫЯНКЕЧТЕРГЕ КАРШЫ АКТИВДҮҮЛҮГҮ

Даярдаган
Сезим Жолдошбекова

Жетекчиси
Профессор Тинатин Дөөлөткелдиева

Магистрдик диссертация

Июнь, 2019

БИШКЕК/КЫРГЫЗСТАН

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı SOYADI: Sezim Coldoşbekova

İmza:

ПЛАГИАТ ЖАСАЛБАГАНДЫГЫ ТУУРАЛУУ БИЛДИРҮҮ

Мен бул эмгекте алынган бардык маалыматтарды академиялык жана этикалык эрежелерге ылайык колдондум. Тагыраак айтканда, бул эмгекте колдонулган, бирок мага тиешелүү болбогон маалыматтардын бардыгын тиркемеде так көрсөттүм жана эч кайсы жерден плагиат жасалбагандыгына ынандырып кетким келет.

Аты жөнү: Сезим Жолдошбекова

Колу:

ЭРЕЖЕЛЕРГЕ БАШ ИЙҮҮ

“Энтомопатогендик *Bacillus thuringiensis* бактериясынын биологиясы жана зыянкечтерге каршы активдүүлүгү” аттуу магистрдик иш, Кыргыз-Түрк «Манас» университетинин магистрдик диссертация долбоору жана диссертацияны жазуу эрежелерине тура келгендей болуп даярдалды.

Даярдаган:
Жолдошбекова Сезим
Колу:

Илимий жетекчи:
Проф, док.Дөөлөткелдиева Т. Д.
Колу:

Өсүмдүктөрдү коргоо Бөлүмүнүн Башчысы:
Проф, док.Дөөлөткелдиева Т. Д.

Колу:

YÖNERGEYE UYGUNLUK

«Entomopatojenik *Bacillus thuringiensis* bakterisinin biyolojisi ve zararlılara karşı etkinliği» adlı Yüksek Lisans Tezi, Kırgızistan-Türkiye “Manas” Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazım Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi hazırlayan:	Danışman:
Sezim COLDOŞBEKOVA	Prof. Dr. Tinatin DÖÖLÖTKELDIYEVA
İmza	İmza

Bitki koruma bölüm Başkanı

Prof. Dr. Tinatin DÖÖLÖTKELDIYEVA

İmza:

КАБЫЛ АЛУУ ЖАНА ЧЕЧИМ

Б.и.к., проф. Тинатин Дөөлөткелдиеванын жетекчилигинде Сезим Жолдошбекова тарабынан даярдалган «Энтомопатогендик *Bacillus thuringiensis* бактериясынын биологиясы жана зыянкечтерге каршы активдүүлүгү» темасындагы магистрдик иш комиссия тарабынан Кыргыз-Түрк «Манас» университетинин Табигый илимдер институтунун Өсүмдүктөрдү коргоо багытында магистрдик иш болуп кабыл алынды.

……./…../…….

КОМИССИЯ:

Илимий жетекчи	: б.и.д., проф. Тинатин Дөөлөткелдиева	……………..
Төрагасы	: б.и.д., проф. Момун Арзыбаев	……………..
Мүчө	: б.и.д., проф. Хусейин Гөчмен	……………..
Мүчө	: б.и.к., Сайкал Бобушова	……………..
Мүчө	: б.и.к., Махабат Конурбаева	…………….
Мүчө	: доц.д., Чолпон Омургазиева	…………….
Мүчө	:б.и.к., Жакшылык Дуйшеналиев	…………….

ЧЕЧИМ:

Бул магистрдик иштин кабыл алынышы Институт башкаруу кеңешинин .... датасында жана .... санындагы чечими менен бекитилди.

………/………/……..

Доц. Др. Дагыстан ШИМШЕК

Институт Мүдүрү

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Tinatin DÖÖLÖTKELDİYEVA danışmanlığında Sezim COLDOŞBEKOVA tarafından hazırlanan «Entomopatojenik *Bacillus thuringiensis* bakterisinin biyolojisi ve zararlılara karşı etkinliği» adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Kırgızistan-Türkiye "Manas" Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

…........./……../………..
(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır)

JÜRİ:

Danışman	: Prof.Dr.Tinatin DÖÖLÖTKELDİYEVA	………………..
Asıl üye	: Prof.Dr.Momun ARZIBAYEV	………………..
Asıl üye	: Prof.Dr.Hüseyin GÖÇMEN	………………..
Asıl üye	: Öğr.Gör.Dr.Mahabat KONURBAYEVA	………………..
Asıl üye	: Öğr.Gör.Dr. Saykal BOBUŞOVA	………………..
Yedek üye	: Doç. Dr. Çolpon OMURGAZİYEVA	……………….
Yedek üye	: Öğr.Gör.Dr.Cakşılık DUYŞENALİYEV	……………….

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .... tarih ve .... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

………/………/……..

Doç. Dr. Dağıstan ŞİMŞEK

Enstitü Müdürü

АЛГАЧ СӨЗ

Билим алуумда салымы чоң, магистрдик диссертациямды даярдоодо мага жардамын жана ой-пикирлерин аябаган илимий жетекчим б.и.д., проф. Тинатин Дөөлөткелдиева эжейге терең ыраазычылыгымды билдирем. Айыл-чарба факультетинин Өсүмдүктөрдү коргоо бөлүмүнүн жалпы мугалимдер жамаатына жана кызматкерлерине дагы терең ыраазычылыгымды билдирем.

Өзгөчө, магистрдик диссертациямды даярдоо учурунда мага дайыма колдоо көрсөткөн, ата-энеме, бир туугандарыма терең ыраазычылыгымды билдирем

Сезим Жолдошбекова

Бишкек, Июнь, 2019

ЭНТОМОПАТОГЕНДИК BACİLLUS THURİNGİENSİS БАКТЕРИЯСЫНЫН БИОЛОГИЯСЫ ЖАНА ЗЫЯНКЕЧТЕРГЕ КАРШЫ АКТИВДҮҮЛҮГҮ

Сезим Жолдошбекова
Кыргыз-Түрк «Манас» университети, Табигый илимдер институту
Магистрдык иш, июнь 2019-жыл
илимий жетекчи б.и.д., проф. Тинатин Дөөлөткелдиева

Кыскача мазмуну

Бул дипломдук иштин максаты *Bacillus thuringiensis* энтомопатогендик бактериянын табыгый штаммдарын Кыргызстандын жаратылыш булактарынан бөлүп алуу жана бөлүнүп алынган жаңы штаммдардын морфологиялык, биологиялык жана энтомопатогендик касиеттерин изилдөө, ошондой эле ПЦР анализин жүргүзүү болуп саналды.

Түндүк Кыргызстандын ар кандай аймактарынан чогултулган топурак жана өлгөн курт кумурскалардын үлгүлөрүнөн *Bacillus thuringiensis* бактериясынын он беш штаммы бөлүнүп алынды. Жарык жана фазово-контрастык микроскоп астында изилдөө өткөргөндө, бөлүнүп алынган изоляттар өндүргөн параспоралык денечелердин формалары бипирамидалдуу жана куб түрүндө болгону аныкталды. Изоляттар биохимиялык, молекулярдык жана биологиялык скринингтин негизинде мүнөздөлдү. Он беш изоляттардын ичинен сегиз изолят cry гендерине туура келген копияларды камтыганы Cry гендердин плазмидасын коддогон төрт ар кандай түрлөрдүн максатттык амплификациянын натыйжасында аныкталды, жана көпчүлүк штаммдарда cry2, cry4 жана cry3 гендери көп кездешкени аныкталды. Bacillus thuringiensis серотиби galleriae Cry3 гени менен, Bacillus thuringiensis серотиби partial 16S rRNA гени менен, Bacillus thuringiensis Gaoshi-116S Cry2 гени менен, Bacillus sp. B25 Lep2 гени менен, жана ошондой эле Bacillus thuringiensis coreanensis Cry4 гени менен, Bacillus thuringiensis kurstaki Cry4 жана Cry2 гендери менен жана Bacillus thuringiensis серотиби galleriae Cry3 гени менен идентификацияланды.

Ачкыч сөздөр: *штамм, биохимиялык мүнөздөмөлөрү, cry гендер, биологиялык коргоо, Bt биопестициддер, параспоралдык кристаллдар, органикалык айыл чарба*

ENTOMOPATOJENIK BACILLUS THURINGIENSIS BAKTERISININ BIYOLOJISI VE ZARARLILARA KARŞI ETKINLIĞI

Sezim COLDOŞBEKOVA

Kırgızistan-Türkiye «Manas» üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2019

Danışman: Prof.Dr.Tinatin DÖÖLÖTKELDİYEVA

Geniş Özet

Denemeler, 2017-2019 yılları arasında Kırgızistan'da, KTMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümü fitopatoloji laboratuarında yürütülmüştür.

Bacillus thuringiensis (Ernst Berliner) fakültatif, anaerob, gram pozitif bir bakteridir. Bt spor formuna dönüserek kristalize inklüzyonlar sentezleyebilmektedir. Sentezlenen bu maddeler özellikle Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera takımında böcekleri karşı zehirleyici etki gösterir. Bu inklüzyonlar farklı şekillere (protein kompozisyonuna bağlı olarak piramidal, kübik, yuvarlak) sahip kristalize proteinlerdir. *Bac. thuringiensis* için yapılan fenotipik sınıflandırma bakterinin flagella antijenlerine göredir; ve ilk kez 1960'li yıllarda bu yönde sınıflandırma yapılmıştır. 1998 yılında yapılan değerlendirmede 67 alt tipinin olduğu belirlenmiştir. *Bac. thuringiensis* ağız yoluyla alındıktan sonra sivrisinek ve karasinek larvalarında son derece etkili olabilen öldürücü bir toksin salgılar. Kimyasal maddelere karşı direnç gelişmiş populasyonlarda kullanılabilir. Çevrede kolaylıkla parçalanabilir, bu nedenle periyodik olarak kullanımı uygundur. Beta endotoksin Bt'lerce üretilen isiya dayanıklı bir nükleotidtir (adenin, guanin ve allaric asitten oluşur). Beta endotoksinin etkinliği mide ortamındaki çözünürlügüne bağlıdır, proteolitik enzimler araçılığında ön toksin şeklinde alınan madde etkinlik kazanarak toksik forma dönüşür. Epitel hücrelerde yıkımlanmaya neden olur aynı zamanda dolaşıma geçerek septisemiye yol açar. Etki birbirini takip edecek şekilde farklı aşamalarla gelişir; sporlanmış Bt böcek larvası tarafından alınır; kristalize yapı midede çözünür; proteazlar tarafından etkin forma dönüştürülür; toksin mide epitel hücresinde özel reseptörlere bağlanır; Hücre zarini geçer buna bağlı olarak epitelde delik ve kanallar açar, sonuçta epitel hücresi bozulur; diğer taraftan dolaşıma geçen toksin septisemiye neden olur, ki bu durum ölüm riskini de artırır. Hedef canlı dışında

Bt çesitli laboratuvar hayvanları ve diğer memelilere farklı uygulama yollarıyla verilmiş ve sonuçta zehirleyici ya da patojenik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Laboratuvar ve saha çalışmalarında balık ve kuşlar üzerinde de olumsuz etkisi görülmemiştir. Aynı şekilde Bt'in birkaç istisna dışında insanlar için de zehirleyici olmadıgı nadiren göz ve deri irkiltisine yol açabileceği bildirilmiştir.

Bac. thuringiensis beta endotoksin dışında farklı bazı maddeler de salgılayabilir; antibiyotik, enzim, metabolit ve toksin gibi; söz konusu bu maddeler de hedef ve hedef olmayan canlılarda etki oluşturabilir. Bacillus thuringiensis genellikle suda eriyebilir toz yada granüller şeklinde kullanılır. Özellikle katı formulasyonları uygulandıkları suyun yüzeyinde kalır ve yaklaşık 30 gün süreyle etken madde salıverir. Bunlarin etkinliği çevresel şartlardan fazlaca etkilenmez ve bu nedenle bu tarz formülasyon değişen ve sabit çevreler için de uygundur. Bu uygulama şekli küçük ölçekli işletmelerde de uygulanabilir niteliktedir, ayni şekilde ulaşımı zor yerler için de uygundur. Açık alanlarda rüzgarın etkisi su yüzeyinden ürünün uzaklaştırılmasına ve dolaysıyla etki kaybına yol açar. Diğer taraftan kati şekildeki bu ürünler suda çözülmeyen formülasyonlardır, kirli sulardan etkilendiğinden etkisinde azalma oluşur, bu nedenle sadece temiz sularda kullanılabilir.

Suda çözünebilir toz şeklindeki formülasyonlar su ile karıştırılır ve elle çalışan ya da farklı ekipmanlarla püskürtülür. Granüller de elle ya da portable ekipmanlarla insektlerin bulunduğu yüzeye uygulanır. Kati formülasyonlar genellikle elle uygulanır, her 10 m^2 su yüzeyine dörtten fazla olacak şekilde rüzgarlı uzaklaşma riski olan yerlerde sudaki bitki ya da diğer sabit objelere yapıştırılırlar. Rutubetten korunarak serin yerlerde muhafaza edilmelidir. (1)

Kırgızistan'da entomopatojen bakteriler hakkında araştırmalar AN biyolojik Enstitüsün mikrobiyolojik yöntemler laboratuvarında 1972-1985 yılları yapılmış.

Bu çalışmada Kırgızistan'ın çeşitli bölgelerinen toprak ve ölü böcekler örneklerinden Bt izole edildi, bu izolatların fenotipik ve genotipik özellikleri belirlemenmiştir. Biyokimyasal testler ile proteaz (kazeinaz ve jelatinaz), amilaz hidrolizi aktivitelerine, sukroz, glikoz, maltozu fermente etme yeteneklerine bakılmış. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucunda *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* Cry3 geni ile, *Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA* geni and *Bacillus thuringiensis* strain *Gaoshi-1 16S* Cry2 genleri ile, ve *Bacillus sp. B25* genome *Lep2* geni ile,

Bacillus thuringiensis serovar *coreanensis Cry4* geni ve *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki Cry4* ve *Cry2* genleri ile, ve *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae Cry3* geni bulunmaktadır. Izolatlar *Arge pagana spp., Hyponomeuta malinella, Leptinotarsa decemlineata* zararlılara karşı laboratuar koşullarında denemeler yapılmıştır. Bt süspansiyonu uygulanmış sağlıklı yapraklar bulunan petri kaplarına bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak sadece steril su ile uygulama görmüş larva ve yaprakları kullanılmıştır. Petri kaplarında 7 gün süreyle tutulan larvaların ortalama ölüm oranı (%) saptanmıştır. Testlenen Bt izolatlarından 1П, К-2, Кж-1, Км-1, Б-1, 3П %100 ölüm oranıyla en başarılı uygulama olmuştur.

Anahtar kelimeler: *Bacillus thuringiensis* suşları, biyokimyasal özellikler, Cry genler, biyolojik mücadele, Bt biyopestisitler

БИОЛОГИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *BACİLLUS THURİNGİENSİS* И ИХ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ ВРЕДИТЕЛЕЙ

Сезим Жолдошбекова

Кыргызско-Турецкий университет Манас, Институт Естественных наук

Магистерская диссертация, Июнь 2019

Научный руководитель: к.б.н., проф. Тинатин Дөөлөткелдиева

Аннотация

В данной работе были исследованы пятнадцать изолятов *Bacillus thuringiensis,* выделенных из образцов почвы и погибших насекомых, собранных в различных районах Северного Кыргызстана.

Исследование методом световой и фазово-контрастной микроскопии показало наличие бипирамидальных и кубовидных параспоральных тел, продуцируемых этими изолятами.

Изоляты были охарактеризованы на основе биохимического и молекулярно-биологического скрининга. Целевая амплификация четырех различных типов, кодирующих плазмиду *cry* генов, показала, что восемь штаммов из пятнадцати содержат соответствующие копии *cry; cry2, cry4 и cry3 генов,* которые присутствуют в большинстве штаммов. Были идентифицированы следующие серотипы : *Bacillus thuringiensis galleriae* с геном *Cry3,* серотип *Bacillus thuringiensis partial* с *16S rRNA* геном, *Bacillus thuringiensis Gaoshi-116S* с *Cry2, Bacillus sp. B25* с *Lep2* геном, также серотип *Bacillus thuringiensis coreanensis* с *Cry4* геном, *Bacillus thuringiensis kurstaki* с *Cry4* и *Cry2* генами и серотип *Bacillus thuringiensis galleriae* с *Cry3* геном.

Ключевые слова: штамм, биохимическая характеристика, *cry* гены, биологическая защита, Bt биопестициды, параспоральные кристаллы, органическое сельское хозяйство

BİOLOGY OF THE ENTOMOPATHOGENIC BACTERIUM *BACİLLUS THURİNGİENSİS* AND THEİR ACTİVİTY AGAİNST PESTS

Sezim Zholdoshbekova
Kyrgyz-Turkish «Manas» university, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, May 2019
Supervisor: Prof. Dr. Tinatin Doolotkeldieva

Abstract

Fifteen isolates of *Bacillus thuringiensis* were isolated from soil samples and dead insect bodies collected in the various districts of North Kyrgyzstan.

Light and phase contrast microscopy investigation have showed the presence of bipyramidal and cuboidal parasporal bodies produced by these isolates. The isolates were characterized on the basis of biochemical and molecular biology screening.

Biochemical tests included a revealing the protease (caseinase and gelatinase) and amylase activities of BT isolates and their ability for fermentation of glucose, sucrose, maltose and other carbon sources.

Targeted amplification of four different types of plasmid-encoded *cry* genes has demonstrated that eigh strains from fifteen contain respective *cry* gene copies; *cry2, cry4* and *cry3* genes are present in most strains. The following serotypes were identified: *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* with Cry3 genes, *Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA* gene and *Bacillus thuringiensis* strain *Gaoshi-1 16S* with Cry2 genes, also *Bacillus sp. B25* genome with *Lep2* genes, *Bacillus thuringiensis* serovar *coreanensis* with *Cry4* genes and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* with *Cry4* and *Cry2*-genes, also *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* with *Cry3*-genes were identified.

Key words: strain, biochemical characteristics**,** Cry genes, biocontrol, Bt biopesticides, parasporal crystals, organic farming

МАЗМУНУ

ЭНТОМОПАТОГЕНДИК BACİLLUS THURİNGİENSİS БАКТЕРИЯСЫНЫН БИОЛОГИЯСЫ ЖАНА ЗЫЯНКЕЧТЕРГЕ КАРШЫ АКТИВДУУЛУГУ

Бет

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI……………….............................. ii

ПЛАГИАТ ЖАСАЛБАГАНДЫГЫ ТУУРАЛУУ БИЛДИРҮҮ………............ ii

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI……………………………………. iii

КАБЫЛ АЛУУ ЖАНА ЧЕЧИМ………………………………………… iv

KABUL VE ONAY SAYFASI…………………………………………… v

АЛГАЧ СӨЗ……………………………………………………………. vi

КЫСКАЧА МАЗМУНУ (Kırgızça)……………………………………… vii

GENİŞ ÖZET (Türkçe)…………………………………………………. ix

АННОТАЦИЯ (Rusça)………………………………………………… xiii

ABSTRACT (İngilizce)………………………………………………… xv

МАЗМУНУ……………………………………………………………..... xvii

СИМВОЛДОР ЖАНА КЫСКАРТУУЛАР…………………………….. xix

КЕЛТИРИЛГЕН ТАБЛИЦАЛАРДЫН ТИЗМЕСИ…………………........... xx

КЕЛТИРИЛГЕН СҮРӨТТӨРДҮН ТИЗМЕСИ………………………… xxi

КИРИШ СӨЗ.. xxii

1-БӨЛҮК

АДАБИЯТТЫК ТАЛДОО

1.1 Микробдук инсектициддер……….. 3

1.2 Bacillus тукуму…………………………………………………..…............. 4

1.3 *Bt* ……………………………………………………………….............. 4

1.3.1 Энтомопатогендик бактерия *Bacillus thuringiensis* бактериясынын морфологиясы жана биологиясы.. 5

1.4*Bacillus thuringiensis* бактериясынын токсиндүү продуктылары................ 6

1.4.1 *Bt* δ-эндотоксин 7
1.4.2 *Cry* белоктор... 8
1.4.3 Cyt белоктор... 9
1.5 *Bacillus thuringiensis* бактериянын таасир берүү механизми..................... 11
1.6 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын ачылыш тарыхы............................. 14
1.7Кыргызстанда Bacillus thuringiensis бактериясынын изилдөө абалы......... 16
1.8 Кыргызстанда *Bacillus thuringiensis* бактериясынын таралышы.. 19

2- БӨЛҮК

МАТЕРИАЛДАР ЖАНА МЕТОДИКАЛАР

2.1 *Bacillus thuringiensis* бактериясын жаратылыштан бөлүп алуу ыкмалары.. 21
2.1.1 Үлгүлөрдү чогултуу.. 21
2.1.2 Топурактан бөлүп алуу... 21
2.1.3 Өлгөн курт кумурскалардан бөлүп алуу.. 22
2.2 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын нормалдуу өсүшүн камсыздоочу чөйрөлөрдү даярдоо ыкмалары.. 22
2.3*Bacillus thuringiensis* бактериясын боё ыкмалары... 23
2.3.1 Б.В.Логинова жана А.Я.Лескованын ыкмасы.. 23
2.3.2 Пешковдун ыкмасы... 23
2.4 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын молекулярдык - биохимиялык касиеттерин изилдөө ыкмалары.. 24
2.4.1 Спора жана кристаллдардын изилдөөсү.. 24
2.4.2 Каталазалык активдүүлүк... 24
2.4.3 Протеолитикалык активдүүлүк.. 25
2.4.4 Казеин гидролизи... 25
2.4.5 Желатин гидролизи.. 26
2.4.6 Амилолиттик активдүүлүк.. 26
2.4.7 Углеводдордун ферментациясы.. 27
2.5 ПЦР анализи... 28

2.6 Бактериалдык препаратты алуу үчүн технологиялык этаптар................... 29
2.6.1 Bacillus thuringiensis бактериясынын культураларын лабараториялык шарттарда сактоо.. 29
2.7 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын штаммдарынын физиологиялык абалын жана бир тектүүлүгүн текшерүү.. 29
2.7.1 Энелик клеткаларды алуу.. 30
2.8 Штаммдардын биологиялык активдүүлүгүн аныктоо................................ 30

3- БӨЛҮК
ЭКСПЕРИМЕНТАЛДЫК БӨЛҮК ЖАНА ӨЗДҮК ИЗИЛДӨӨЛӨР

3.1 Бөлүнүп алынган штаммдар.. 32
3.2 ЭПА чөйрөсүндө бөлүнүп алынган изоляттарды сүрөттөө...................... 33
3.3 Каталазалык активдүүлүк …....……………………….............................. 34
3.4 Протеолитикалык активдүүлүк... 35
3.5 Казеин гидролизи... 35
3.6 Желатин гидролизи... 36
3.7 Амилолиттик активдүүлүк... 36
3.8 Углеводдордун ферментациясы... 37
3.9 ПЦР анализ менен ПЧР методу менен идентификациялоо....................... 38
3.10 Bacillus thuringiensis бактериясынын жаңы бөлүнүп алынган штаммдарын зыянкечтерге каршы сыноодон өткөрүү..................................... 41
3.10.1 Лабаратордук шарттарда штаммдардын Arge pagana spp. личинкаларын жабыркатуу жолу менен биологиялык активдүүлүгүн аныктоо... 41
3.10.2 Arge pagana spp... 41
3.11 Алма күбөсүнүн личинкасына карата *Bacillus thurungiensis* штаммдарынын активдүүлүгү... 47
3.11.1 Алма күбөсү жөнүндө кыскача маалымат.. 47
3.12 Колорадо коңузунун личинкасына карата *Bacillus thurungiensis* штаммдарынын активдүүлүгү... 50

3.12.1 Колорадо коңузу жөнүндө кыскача маалымат.. 50
КОРУТУНДУЛАР……………………………………………………………...................... 54
КОЛДОНУЛГАН АДАБИЯТТАР…….........................……………………………........... 55
ӨМҮР БАЯН………………...................................……………………………….......... 57

ШАРТТУУ КЫСКАРТУУЛАР:

КПБ : колония пайда кылуучу бирдик

ЭПШ : эт пептон шорпосу

ЭПА : эт пептон агары

ж.б. : жана башка

т.а. : тактап айтканда

м : метр

г/л : грамм, литр

мм : миллиметр

$м^2$: квадрат метри

о.э : ошондой эле

б.з.ч : биздин заманга чейин

б.а : башкача айтканда

мкм : микро метр

н.м : нанометр

КЕЛТИРИЛГЕН ТАБЛИЦАЛАРДЫН ТИЗМЕСИ

Жадыбал 2.2.1 ЭПА (эт пептон агары)……………………………24
Жадыбал 2.4.1 Эт-пептон-желатин (ЭПЖ) чөйрөсү..…........……27
Жадыбал 2.4.2 Крахмал камтыган азык чөйрө 28
Жадыбал 2.4.3 Пептон суусу...28
Жадыбал 2.5.1 LB чөйрөсү (англ. Lysogeny broth).........................29
Жадыбал 3.1.1 Бөлүнүп алынган штаммдардын тизмеси..........…33
Жадыбал 3.9.1 Bt штаммдары..40

КЕЛТИРИЛГЕН СҮРӨТТӨРДҮН ТИЗМЕСИ

Сүрөт 1.1.1	*Bacillus thuringiensis* бактериясынын 3D түзүлүшү	6
Сүрөт 1.1.2	*Bacillus thuringiensis* бактериясынын микроскоп алдындагы көрүнүшү	8
Сүрөт 1.4.1	Клеткада Cry белоктордун камтылышы	10
Сүрөт 1.4.2	Cyt белоктордун структурасы	11
Сүрөт 1.4.3	δ-эндотоксиндин тандоочу таасири	13
Сүрөт 1.5.1	*Bacillus thuringiensis* бактериянын зыянкечке таасир берүү механизми	14
Сүрөт 1.5.2	Prof. Ishiwatari Shigetane	17
Сүрөт 3.2.1	ЭПА чөйрөсүндө (КЖ-1) штаммдын өсүп чыккан колониялар	34
Сүрөт 3.2.2	(1П) штаммдын микроскоп алдындагы көрүнүшү	35
Сүрөт 3.3.1	(Б-1) штаммдын каталазалык активдүүлү	36
Сүрөт 3.5.1	(Кж-1) штаммынын казеин гидролизи	37
Сүрөт 3.6.1	Бөлүнүп алынган штаммдардын желатин гидролизи	37
Сүрөт 3.7.1	(KS) штаммынын амилолиттик активдүүлүгү	38
Сүрөт 3.8.1	Бөлүнүп алынган штаммдардын Глюкозадагы ферментациясы	39
Сүрөт 3.9.1	*Bacillus thuringiensis* диагностикалоодогу үч реакциядан кийин алынган 16 S r RNA генинин электрофорездик профилдери	40
Сүрөт3.10.1	*Arge pagana*	
Сүрөт3.10.2	*Arge pagana spp.*личинкасы	43
Сүрөт3.10.3	*Arge pagana spp.*имагосу	44
Сүрөт3.10.4	Arge pagana spp. личинкаларын алмурут жалбырактарын жабыркатуусу	45
Сүрөт3.10.5	Arge pagana spp. личинкаларын Петри чөйчөкчөлөрүндө Bt штаммдары менен жабыркатуу	46
Сүрөт3.10.6	*Arge pagana spp.* личинкаларын жабыркоосу	46
Сүрөт3.10.7	*Arge pagana spp.* жабыкаган личинкасынын 7 суткадан кийин көрүнүшү	47
Сүрөт3.11.1	*Hyponomeuta malinella личинкасы жана имагосу*	49
Сүрөт3.12.1	*Leptinotarsa decemlineata имагосу жана личинкасы*	53

КИРИШ СӨЗ

Акыркы эки кылымда энтомопатогендүү микроорганизмдер зыянкечтердин инфекциялык илдеттерин чакыруучулары катары дүйнөнүн көпчүлүк окумуштууларынын жана адистеринин көңүлүн алууда.

Энтомопатогендик микроорганизмдердин арасында белгилүү бир түрдөгү курт кумурскалардын организмдеринин шарттарына гана адистешкен патогендер бар.

Белгилүү шарттарда организмдер курт кумурскалардын табигый популяцияларында массалык эпизоотияларды же локалдык энзоотикалык очокторун чакырышат жана натыйжада зыянкечтердин санын табигый жол менен контролдоп турат.

Энтомопатогендик микроорганизмдердин арасынан кристалл пайда кылуучу *Bacillus thuringiensis* группасындагы бактериялар мурдагыдай эле перспективдүү болуп саналат, жана дүйнөнүн көпчүлүк өлкөлөрүндө бул бактерия көп түр зыянкечтер менен биологиялык күрөшүүдө атактуу агент болуп саналат.

Bacillus thuringiensis споруляция учурунда белоктук кристаллдык кушулмаларды бөлүп чыгарган грамм оң болгон бактерия. 60 жылдан бери *Bacillus thuringiensis* бактериясынын ушул кристаллдык кошулмалары биопестициддер катары колдонулуп келе жатат. Жогорку спецификасына жана айлана чөйрөгө зыянсыз болгондугуна себептүү химиялык пестициддерге караганда баалуу альтернатива болуп саналат. (2), (3).

Кыргызстанда энтомопатогендик бактериялардын изилдөөлөрү АН биология Институтунун микробиометоддук лабараторияда 1972-1985жж. өткөрүлгөн. (4)

Изилдөөнүн максаты: *Bacillus thuringiensis* энтомопатогендик бактериянын табыгый штаммдарын Кыргызстандын топурактарынан, өлгөн курт кумурскаларынан бөлүп алуу жана бөлүнүп алынган жаңы штаммдардын морфологиялык, биологиялык жана энтомопатогендик касиеттерин изилдөө.

Бул максаттарды ишке ашырууда төмөндөгүдөй маселелер коюлган:

1. Табигый шарттарда табылган өлүмгө чалдыккан курт-кумурскалардын үлгүлөрүн ошондой эле ар кандай типтеги топурактын үлгүлөрүн лабораториялык шарттарда изилдөө жана *Bacillus thuringiensis* энтомопатогендик бактериянын штаммдарын бөлүп алуу
2. Алардын морфологиялык, физиологиялык жана биохимиялык касиеттерин изилдөө.
3. ПЧР анализинин негизинде идентификациялоо
4. Лабораториялык шарттарда табыгый штаммдардын энтомопатогендик активдүүлүгүн аныктоо үчүн сыноодон өткөрүү.

1- БӨЛҮК.
АДАБИЯТ-МААЛЫМАТТЫК ТАЛДОО

1.1 Микробдук инсектициддер

Микробдук инсектициддер, өзүнүн жогорку адистештирилген таасири жана коопсуздугу менен химиялык инсектициддерге карата альтернатива б.с жана ошондуктан зыянкечтерге каршы комплекстүү күрөшүүдө колдонулат. Мындай инсектициддер микроорганизмдерди же алар тарабынан өндүрүлгөн биологиялык заттарды камтыйт.

Микробдук агенттерди колдонуунун артыкчылыктары болуп алардын эффективдүүлүгү, адам жана жаныбарларга коопсуздугу, азык түлүктө пестициддердин калдыктарын азайтуусу жана экосистемада биоартүрдүүлүктү жогорулатуу саналат. (3)

Акыркы кырк жылдаркы өсүмдүк өстүрүүчүлүк өзүнүн органикалык жана экологиялык концепцияга таянган чарба жүргүзүү менен белгиленүүдө, анткени адамдын ден соолугу өтө маанилүү. Ушуга байланыштуу дүйнө жүзүндө агрардык экосистемаларды өнүктүрүү максатындагы программалар иштелип чыгууда. Бул себептен өсүмдүк культураларын өстүрүүдө жаңы агрономиялык жана биологиялык методдор колдонууда. Көпчүлүк чарбалар табиятка чоң залакат алып келген синтетикалык материалдардан, уу химиялык заттардан ж.б компоненттерден баш тартууда.

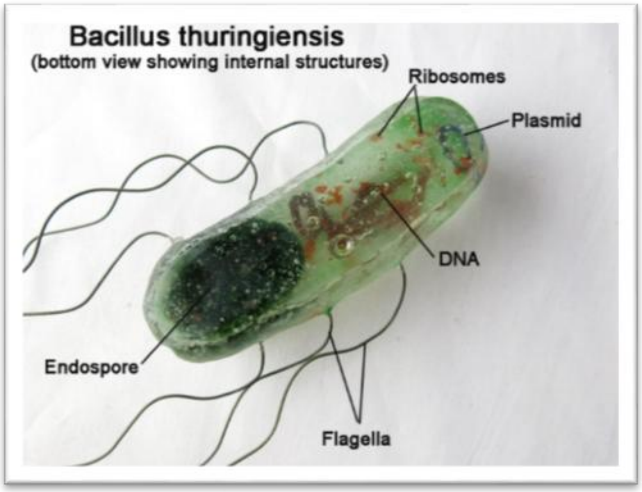
Өсүмдүктөрдү биологиялык коргоо методдору химиялык каражаттарга жакшы альтернатива катары, өсүмдүк өстүрүүдө зыянкечтерди жана ар кандай илдет козгогучтарды контролдоодо колдонулуп келе жатат, анткени жаратылышка, адамга жана жаныбарларга коопсуз. Ошентип, акыркы он жылдын ичинде биопрепараттардын ассортименттик тизмеси өтө жогорулады жана жыл сайын алардын эффективдүүлүгү жана о.э популярдуулугу өсүүдө.

Биопрепараттар инсектициддерден айырмаланып, тирүү организмдердин негизинде жасалат, жана төмөнкү принцип менен таасир этет: энтомопатогендик бактериялар зыянкечтерди жугуштурат жана натыйжада анын өлүмүн чакырат. Ошондой эле биопрепараттардын дагы бир жакшы жери – зыянкечтерге тандоо менен таасир этет, мисалы пайдалуу курт кумурскаларга зыян көрсөтпөйт. (5)

1.2 Bacillus тукуму

Бул тукумга кирген бактериялар таякча түрүндө, грам оң, (Сүрөт *1.1.1)* спора пайда кылган жана факультативдик анаэробдор. Көпчүлүк Грам оң жана эндоспора пайда кылган бактериялар-топурак микроорганизмдери. Бациллдерди споранын формасына жана спорангиянын чоңдугуна жараша үч морфологиялык группага бөлүшкөн. 1 группа энелик клеткада чоңойбогон эллипс түрүндөгү споралар менен мүнөздөлөт. Бул группага топуракта жашаган түрлөр кирет, мисалы, *Bt, B. Sphaericus, B. Subtilis, B. Anthracis*, жана *B. Cereus.* (6)

1.3 Bt



Сүрөт *1.1.1 Bacillus thuringiensis* бактериясынын 3D түзүлүшү

1.3.1 Энтомопатогендик бактерия *Bacillus thuringiensis* бактериясынын морфологиясы жана биологиясы

Классификациясы:

Домен: Бактерия

Тиби: Фирмикулиттер

Класс: Baccillales

Катар: Baccillales

Уруу: Baccillaceae

Тукум: Бацилдер

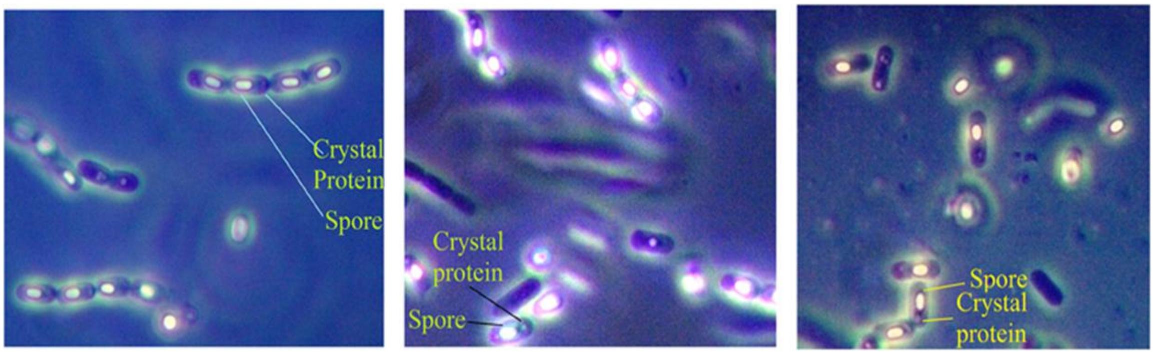
Түр: Bacillus thuringiensis (7)

Bt аэробдук, грам оң, спора пайда кылган бактерия. Хемоорганогетеротроф, факультативдик анаэроб. 1,4-1,8х2,6-3,2мкм чоңдуктагы, таякча бактерия. Бул бактерия спорасында жипче сымал өсүндүүлөр (же пили) бар. Колониялары күңүрт же күңүрт айнек сымал түрдө. Аэробдук шартта Bt жөнөкөй азык чөйрөлөрдө, мисалы, эт пептон шорпосунда өсөт. Азык түгөнгөндө бактерия спора пайда кылуу менен бирге бир же бир нече параспоралдык кристалдарды пайда кылат (сүрөт-*1.1.2).* Токсиндин кристаллы жогоркумолекулярдуу белоктон турган агрегат. Протоксин. Алдын ала активациялоо керек, сууда эрибейт (pH 9,5 жакын болгон курт кумурскалардын ортонку ичегилеринде гана эрийт) жана баардык омурткалууларга (адамга да) жана көбүнчө курт кумурскаларга зыянсыз келет. (5)

Геному: мисалы, *Bacillus thuringiensis* бактериясынын *Al Hakam штаммы* 5257091 п.н өлчөмүндөгү шакекче түрүндөгү эки чынжырлуу ДНК молекуласы менен көрсөтүлгөн, анда 4883 ген камтылган жана анын ичинен 4736 белокторду коддойт. Ошондой эле, бул штаммдын геномунда pALH1 плазмидасы бар, бул да 55939 п.н., өлчөмүндөгү шакекче түрүндөгү эки чынжырлуу ДНК молекуласы менен көрсөтүлгөн, анда 62 ген камтылган жана баардыгы белокторду коддойт. (7)

Споруляция убагынын жети стадиясы бар. Белоктун параспоралдык синтези

споруляциянын II же III стадиясында башталат, жана кристал өзүнүн максималдык өлчөмүнө (божомол менен спора менен тең) V стадияда жетет. Кристалдар өлчөмдөрү менен айырмаланган белоктордон турат. Мындай белоктук кристалдар - эндотоксин же энтомопатогендик кристал деп аталат. Спора жетилгенде клеткалар лизиске учурайт. Кийин бош споралар жана кристалдар чөйрөгө эркин таралат. (8)



Сүрөт *1.1.2 Bacillis thuringiensis* бактериясынын микроскоп алдындагы көрүнүшү

1.4 Bacillus thuringiensis бактериясынын токсиндүү продуктылары

Bacillus thuringiensis бактериясынын сероварианттары, биоварианттары, фаговарианттары жана патоварианттары боюнча, башкача айтканда антигендик жана биохимиялык касиеттери боюнча, фагдарга сезгичтүүлүгү боюнча, жана курт кумурскаларга патогендүүлүгү боюнча айырмалоо сунушталган. Азыркы учурда *Bacillus thuringiensis* бактериясынын идентификациялоо үчүн ПЦР сыяктуу молекулярдык биологиялык ыкмаларды колдонушат. Биологиялык коргоодо патоварианттар боюнча бөлүү маанилүү жана алардын ичинен 3 түрү чоң мааниге ээ: **A, B** жана **C**. **A** патоварианты Lepidoptera түркүмүнө патогендүү, **B-** Diptera үчүн, ал эми **C** Coleoptera үчүн.

Bacillus thuringiensis бактериясынын метаболиттерине ферменттер, антибиотиктер жана токсиндер киргизилет. Бул токсиндүү продуктылардын ичинен 4

компонетти бөлүшөт:

- α-экзотоксин, же фосфолипаза С. Ал бактериялардын өсүп жаткан клеткаларынын продуктусу болуп саналат. Божомолдоо менен бул фермент курт кумурскалардын ткандарындагы алмаштырылгыз фосфолипиддердин ажыроосун чакырат жана өлүмгө алып келет. Фосфолипаза С ичегинин pH 6,6-7,4 болгондо активдүү келет жана буга туруксуз курт кумурскалардын ичегисинин клеткаларынын бузат да бактериялардын дене ичине кирүүсүнө жол ачат.
- β-экзотоксин, же термостабилдүү экзотоксин, өзүнүн атын жогорку температурада жакшы стабилдүүлүгүнө жараша алган: активдүүлүгү автоклавда да 121℃ 15мин боюнча сакталат. Токсин культуралдык суюктуктукта чогула берет, жана анын пайда болушу бактериалдык культуранын өсүү динамикасына дал келет. Токсиндин составына аденин, рибоза жана фосфор 1:1:1 байланышта кирет.
- γ- экзотоксин, жакшы изилдене элек компонент. Азыркы учурда бул идентификацияланбаган фермент (же ферметтердин группасы). Көбүнчө муну фосфолипиддерге киргизишет. Бирок, γ-экзотоксин чыныгы токсиндүү экени далилдене элек.
- δ- эндотоксин, же параспоралык кристаллдык эндотоксин, бактериянын карама каршы бөлүгүндө спора менен бир учурда пайда болот. Башында формасыз тегерек болот, кийин ал туура сегиз бурчтукка айланат. [5].

1.4.1 Bt δ-эндотоксин

δ-эндотоксиндин эки түрүн ***Bt*** штаммдары өндүрөт. Алар Cry жана Cyt белоктору д.а. Ар бир энтомопатогендик кристал бир гана гендин продуктусу. Бул эндотоксиндерди синтездеген гендер чоң плазмидаларда жайгашышат. Cry жана Cyt белоктор ар кандай структураларга ээ. Эң маанилүү өзгөчөлүгү – алардын зыянкечтерге каршы патогендүүлүгү жана кожоюн тандоо жөндөмдүүлүгү.

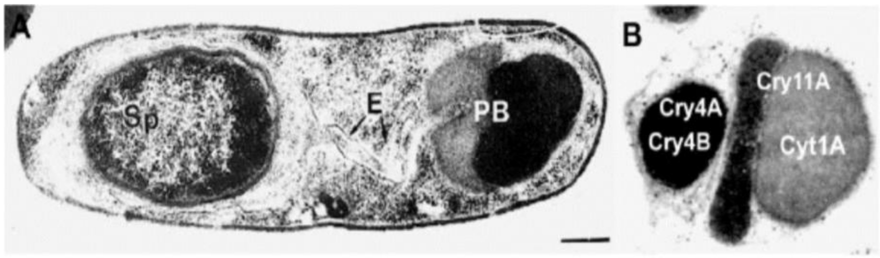
Bt штаммдарынын биологиялык активдүүлүгү δ-эндотоксиндердин саны жана

тиби менен аныкталат. Аминокислоталардын гомологиясына ылайык 300 ашык криогендик гендер 47 группага классификацияланган жана 22 cyt гендер эки класска ажыратылган. (9)

1.4.2 *Cry* белоктор

Cry белоктор көп кездешкен тип. Кристаллдык белоктор криогендик (cry) гендери менен коддолот. Бул белоктун энелик клеткада топтолушу спорасы бар клеткалардын кургак массасынын 20-30% түзүшү мүмкүн. Ар бир кристаллдык белок өзүнө гана ылайык энтомопатогендик спектри менен белгиленет. Ошондуктан, Cry белоктор кожоюн зыянкечтерге карата спецификасы жана аминокислоталык курамынын негизинде классификацияланган. Кристаллдык белоктор ар түрдүү формаларга ээ, (Сүрөт *1.4.1)* мисалы, бипирамидалык (Cry1) же куб формасында (Cry2), тик бурчтуу (Cry3A), тегерек (Cry4A и Cry4B) жана ромба түрүндө (Cry11A).

Cry1, Cry2, жана Cry9 белоктор Lepidoptera түркүмүнө каршы таасирин көрсөтөт. Cry4 жана Cry11 классындагы белоктор Diptera түркүмүнө, ал эми Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry18, Cry34, жана Cry35 болсо Coleoptera түркүмүнө каршы таасирин көрсөтөт. Кээ бир Cry белоктор бирден көп кожоюн зыянкечтерге таасир бериши мүмкүн, мисвлы, Cry1I белогу Lepidoptera ж.о.э Coleoptera тукумуна да таасири бар, жана Cry1B белогу Lepidoptera, Coleoptera, жана Diptera тукумдарына. (10)



Сүрөт *1.4.1* Клеткада Cry белоктордун камтылышы

1.4.3 Cyt белоктор

Cry белоктордон тышкары ***Bt*** штаммдары cyt гендери менен коддолгон цитотоксикалык белокторду синтездейт. Бул δ-эндотоксиндер классы Cry токсиндеринен аминокислоталык курамы жана таасир этүү механизмдери менен айырмаланат, (Сүрөт *1.4.2)* ж.о.э Cyt токсин протоксиндеринин массасы Cry токсиндерден аз (30 кДа). Cyt токсиндери Diptera тукумунуна кирген зыянкечтерде гана табылган, ал эми Cry токсиндери көпчүлүк ***Bt*** штаммдарында кездешет. Cyt токсиндер инсектициддерге карата туруктуулукту жеңүү үчүн ж.о.э микробдук инсектициддердин активдүүлүгүн жогорулатуу үчүн колдонулушу мүмкүн.

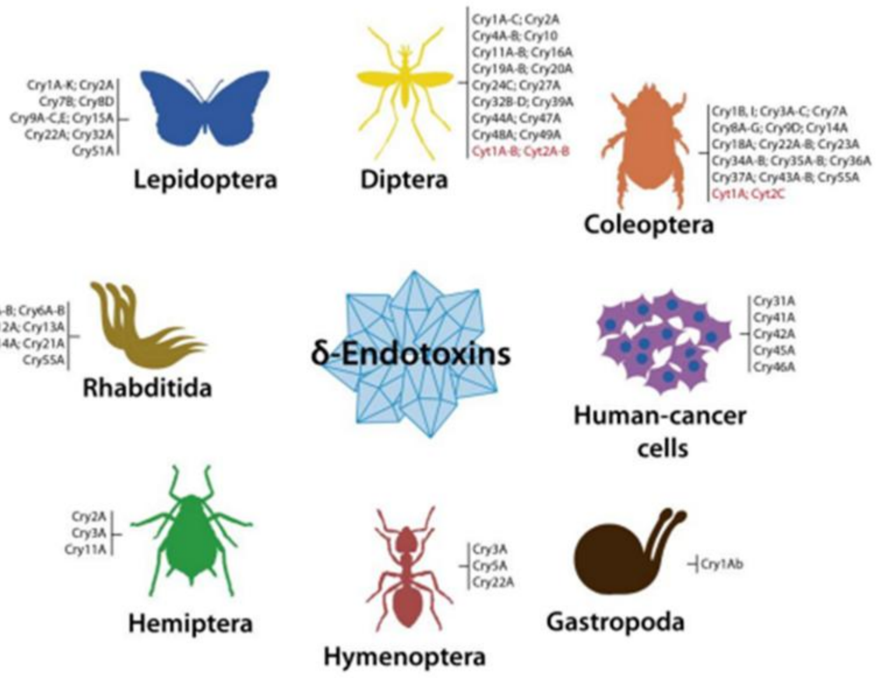
Сүрөт *1.4.2* Cyt белоктордун структурасы

Bacillus thuringiensis бактериясынын көбүнчө түрлөрүндө кристалл жана спора пайда болуусу клетканын кабагынын бузулуусу менен коштолот, натыйжада спора жана кристаллдар бошонуп культуралдык чөйрөгө өз алдынча келишет. Кристаллдар өзүнүн химиялык түзүлүшү боюнча 17,5% азот кирген жана фосфорсуз белоктук

кошулма болуп турат. Кристаллдын структуралык бирдиктүүлүгү белоктун кремний менен болгон байланышы бериши мүмкүн. Химиялык жактан кристаллдык белок споралык каптын белогу менен окшош. Кристаллдар температуранын таасирине начар туруктуу. 80-100℃ температурада 30-40мин боюнча кайнатууда анын структурасын бузат жана токсиндүү касиеттерин инактивдештирет. Ошондуктан δ-эндотоксинди көбүнчө термолабилдүү деп аташат. (Сүрөт 1.4.3) Кристаллдын белогу эритмеге щелочтук чөйрө жогору болгондо (pH 11,0-12,5) өтөт. pH жогору болгон какач канаттуулардын ичегисинде кристаллдын уулуу компоненттери бошонот.

Курт кумурсканын ферменттери кристаллдын протоксиндерин түздөн түз таасир этүүчү чыныгы токсинге айландырат. Кристаллдын таасирине ар түрдүү курт кумурскалардын туруксуздугу in vivo кристаллдардын гидролизин көзөмөлдөгөн ичеги протеазалардын спецификасы чоң рол ойнойт. Мындай протеазаларга баардык эле курт кумурскалар ээ эмес, ошондуктан токсиндин тандоочулук жөндөмдүүлүгү ушундан келип чыгат.

Ичегиде эригенден кийин протеазалар тарабынан майдаланат жана δ-токсинди пайда кылат. Активдүү токсин зыянкечтин ортонку ичегисинин эпителийине жабышат жана клеткалардын ичиндеги да сыртындагы да иондорунун концентрациясын теңдемесине алып келет, натыйжада гусеницанын тамак сиңирүү системасынын жумушун бузат жана гусеницанын ачкадан өлүүсүнө алып келет. (11)

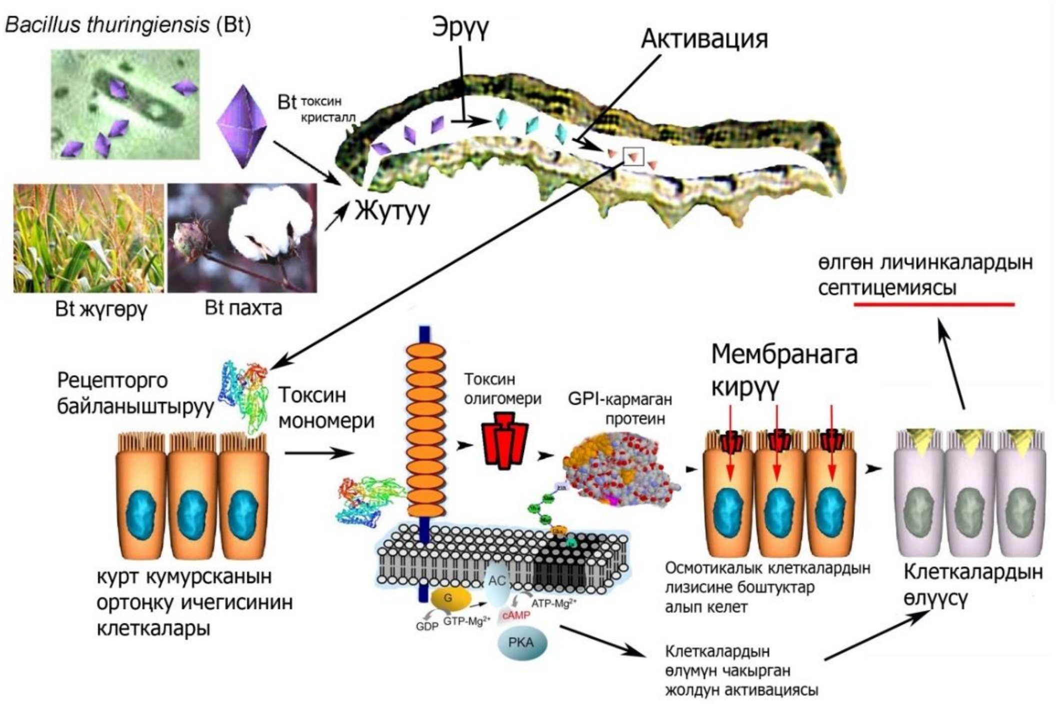


Сүрөт 1.4.3 δ-эндотоксиндин тандоочу таасири

1.5 Bacillus thuringiensis бактериянын таасир берүү механизми

Белоктук кристалл курт кумурсканын ичегисине киргенде ичеги ширесинин щелочтуу чөйрөсүндө эрийт (pH 9,5-10,5); эриген протоксиндер ичегинин трипсино- жана химотрипсиносымал протеолититтик ферменттери менен “чыныгы токсиндерге” чейин активдештирилет. Кристалл курт кумурсканын ичегисине кирип, эрийт; белок ферментативдик гидролизге учурайт, “чыныгы токсин” пайда болот; I жана II домендер мембраналык белок – рецептор менен өз ара аракеттенет; I домендин конформациясы өзгөрөт; токсиндин бир канча молекулалары мембранада тешикти же иондук каналды пайда кылышат; уулу таасирдин стадиясы болуп ичегинин эпителиалдык клеткаларын апикалдык мембранасында белок (рецептор) менен болгон “чыныгы токсиндин” байланышы саналат. Токсинди рецептор менен байланыштыруу кайра калыбына келүүчү болот. Кийин токсин молекуласынын

конформациясынын кайра курулуусу жүрөт жана мембраналык бикатмарга кирет. Мындан кийин токсиндин мембрана менен байланыштыруу процесси кайталанбайт. (12)



Сүрөт 1.5.1 *Bacillus thuringiensis* бактериянын зыянкечке таасир берүү механизми

Ошондой эле *Bacillis thuringiensis* бактериясынын негизинде жасалган препараттардын таасири зыянкечтердин кийинки муундарында да байкалат: популяцияларда илдетке чалдыгып бузулган куурчакчалар пайда боло баштайт, жана алардан чыккан көпөлөктөр тукумсуз муундарды беришет. Bacillis thuringiensisтин негизинде жасалган препараттар чачыратылган өсүмдүктөрдө өзүнүн активдүүлүгүн 8-10 күн боюнча сактай алат, жана фитотоксиндүү эмес, ошондуктан өсүмдүктөрдүн баардык вегетация фазаларында колдоно берүүгө мүмкүн.

Bacillus thuringiensis түрүндөгү энтомопатогендик бактериялар курт кумурскалардын биологиялык контролундагы эң таралган агенттер. Жыл сайын Bacillus thuringiensisтин негизинде көптөгөн бактериалдык препараттар чыгарылат. Ал препараттар адамга жана жылуу кандууларга зыянсыз. Ошондой эле суу чөйрөсүндө колдонууда терс таасири жок. Bacillis thuringiensis түрлөрүнүн мындай тандоочулугу туруксуз курт кумурскалардын ичегисинин эпителиалдык клеткаларынын апикалдык мембранасынын үстүнө чыгарылган белоктун жана δ-эндотоксин эритмесинин спецификалык байланышуусу менен түшүндүрүлөт. *Bacillus thuringiensis* бактериясынын споралары экосистемада көп убакыт боюнча табигый микрофлоранын компоненти катары, бирок концентрациясынын төмөндөшү менен сактала берет.

Көбүнчө бактериалдык препараттарды өндүрүүдө табияттан бөлүнүп алынган штаммдарды колдонушат. *Bacillis thuringiensis* энтомопатогендик түр болгондуктан анын таралышы да кожоюн-курт кумурсканын ареалы менен аныкталышы керек, баццилдар космополиттер жана спора пайда кылуу жөндөмдүүлүгү менен ар кандай жашоо шарттарына оңой адаптацияланат. *Bacillis thuringiensis* факультативдик энтомопатогендик микроорганизм болуп биоценоздун ар кандай звенолорунда кездешет. Энтомопатогендер өлгөн жана ооруган курт кумурскалардан гана бөлүнүп алынбайт, ошондой эле алар соо курт кумурскалардын нормалдуу микрофлорасынын составында да кездешишет. *Bacillus thuringiensis* топурактан, суудан, өсүмдүктөрдүн үстүнкү катмарынан ж.б курт кумурскалар контакталган субстраттардан бөлүп алууга мүмкүн.

Бактериалдык препараттар бир канча деңгээлде спецификалык касиетке ээ, ошондуктан алардын ар кандай курт кумурскаларга болгон вируленттүүлүгү да ар кандай.

Бактериалдык препараттар уу эмес, чачыратылган өсүмдүктөрдүн жытына жана даамына эч кандай таасир бербейт, аларды өсүмдүктүн баардык вегетациялык фазаларында колдонсо болот.

Bacillus thuringiensis бактериясынын негизинде чыгарылган биопрепараттар өзүндө аммиакты бөлүп чыгарган жана нитрификация процессин ишке ашырган,

клетчатканы ажыраткан, азотту эркин фиксациялаган органикалык заттарды ажыраткан микроорганизмдерди камтыйт.

Бактериалдык препараттардын өзгөчөлүгү болуп алардын ичеги аркылуу таасир этүүсү саналат, жана алардын эффективдүүлүгү курт кумурскалардын активдүү тамактануусунда гана байкалат. Ошондуктан препарат менен жалбырактын эки бетин тең чачыратуу керек. Ошондой эле бактериалдык препараттардын гусеницалардын жашына карата таасир этүүсү төмөндөшүн эске алуу керек, ошондуктан мындай препараттарды I же эрте жаштагы гусеницаларга каршы колдонуу сунушталат.

Ар кандай өнөр жайлар *Bacillus thuringiensis* бактериясынын ар кандай штаммдарынын уулуу заттарды, спораларды жана кристаллдарды пайда кылуу жөндөмдүүлүгүн колдонуп, мунун негизинде ар түрдүү бактериалдык препараттарды чыгарышат. (5), (13)

1.6 Bacillis thuringiensis бактериясынын ачылыш тарыхы.

Биринчи жолу *Bacillus thuringiensis* XIX-кылымдын аягында Луи Пастер тарабынан жибек куртунун гусеницасынан бөлүнүп алынган, бирок биринчи жолу жеткиликтүү маалымат Японияда басылып чыккан. 1901-1902-жж япон окумуштуусу (Сүрөт 1.5.2) *Ishiwata* өлгөн жибек курттун көпөлөгүнөн спора пайда кылуучу бактерия бөлүп алып, *Bacillus sotto* деп атаган.

Сүрөт 1.5.2 Prof. Ishiwatari Shigetane

Европада *Bacillus thuringiensis* жөнүндө маалымат Германиядагы Тюрингин провинциясында немец окумуштуусу Берлинер тарабынан ооруган амбар бүлбүлдөгүнөн спора пайда кылуучу бактерия бөлүнүп алынган. Бул бөлүнүп алынган штамм *O.Mattes* тарабынан изилденип, кайра эле амбар бүлбүлдөгүнө каршы колдонгон, бирок тилеке каршы оң натыйжаларды берген эмес.

1951-ж АКШ-да Штейнхауз окумуштуусу өз байкоолорун жүргүзгөн. *O.Mattes* изилдеген *Bacillus thuringiensis* штаммына 20 жыл өтсө да, ал өзүнүн эффективдүүлүгүн жоготкон эмес. Бул жаңылык көптөгөн окумуштуулардын көңүлүн бууруган.

Bacillis thuringiensis бактериясынын жаңы штаммдарын бөлүп алуу үчүн ар кайсы өлкөлөрдө изилдөөлөр жүргүзүлө баштаган, мисалы, *K.Toumanoff* жана *C.Vago* жибек куртунун көпөлөгүнөн *Bacillis thuringiensis sub sp.dendrolimus (4a-4b),* Н.А.Красильников жана А.Б.Гукасян Томск облусунун токойлорунан какач канаттуулардан *Bacillis thuringiensis Krass et Guk,* Noris окумуштуусу *Bacillis thuringiensis sub sp.tolworthi* штаммдары бөлүнүп алынган.

Бацилла группасындагы *Bacillus thuringiensis* бактериясынын биринчи идентификациялык схемасы *A.H.Heimpel* жана *T.Angus* тараптарынан жүргүзүлгөн.

Авторлор АМК, фосфолипаза жана пигмент пайда кылуусу боюнча 3 түргө бөлүшкөн:

Bacillus thuringiensis, Bacillus entomodicus, Bacillus finitimus.

Кристалл пайда кылуучу *Bacillis thuringiensis* бактериясынын энтомопатогендик касиетин жана идентификациялоосу боюнча фундаменталдык иштер француз *H.D.Barjak* жана *Bonnefoi* окумуштууларына таандык. Алар *Bacillis thuringiensis* бактериясынын эң негизги 35 касиетин аныктап, биринчи жолу серологиялык диагностиканы жүргүзүшкөн. *Bacillus thuringiensis* бактериясынын 24 штаммы чогулуп изилденип, 6 сероварга бөлүнгөн.

1.7 Кыргызстанда Bacillus thuringiensis бактериясынын изилдөө абалы

1972-1985жж. Кыргызстандагы АН биология Институтунун микробиометод лабораторясынын кызматкерлери *Bacillus thuringiensis* группасындагы энтомопатогендик бактериясын табуу боюнча интенсивдүү иштерди жүргүзүшкөн. Кыргызстандын аймагында кан соргуч курт кумурскалардын жана кенелердин энтомопатогендик бактерияларын изилдөөсүн Л.Ф.Ромашева, М.М.Просолова, А.Б.Балыкин профессорлору башташкан. 1970-1976жж. бир топ куш фермалары изилденген, канталалардан, мамык жегичтерден, аргасовдук, гамазовдук жана иксовдук кенелерден жасалган материалдардын чөйрөгө отургузуусу жүргүзүлгөн.

Ошентип, А.Б.Балыкин аргасовдук кененин (Argas persicus) бактериалдык флорасын изилдеп, *Bacillus thuringiensis* бактериясынын Н-5а5b (subsp.galleriae), Н-4а4b (subsp.sotto) жана Н-1 (subsp. Berliner) серотиптерине тиешелүү 80 жергиликтүү штаммдарын бөлүп алган. Бөлүнүп алынган штаммдар аргасовдук кенелерге эле каршы пероралдык жугузууда жогорку патогендүүлүктү көрсөттү, бирок кутикула катмары аркылуу начар көрсөткүчтөргө ээ болду.

Адам канталаларынын нормалдуу жана патогендүү микрофлорасы М.М.Просолова жана В.П.Щербак профессорлору тараптарынан изилденген жана 1,4,1,3 серотиптерине тиешелүү кристалл пайда кылуучу бактериялар табылган. Булардын ичинен кээ бирлери гана жогорку патогендүүлүгүн көрсөтө алышкан. Бул

изилдөөлөр башка биологиялык объекттерди бириктирүү менен улантылган. Л.Ф.Ромашева жана У.Б.Узденованын маалыматтары боюнча *thuringiensis* группасындагы бактерияларды табуу боюнча Ысык-Көлдүн суусунан жана кумунан, бир нече өсүмдүк түрлөрүнөн, бадалдардан, балыктардан жана кемирүүчүлөрдөн үлгүлөр алынган. Бул объекттерден бөлүнгөн бактериялардын көбүнчөлөрү *Bacillus thuringiensis var.dendrolimus* жана *var.insectus* түрлөрүнө киргизилген.

Жапай куштардан чогулган мамыр жегичтердин микрофлорасы У.Б.Узденов тарабынан изилденген.

Үй куштардын мамыр жегичтеринин микрофлорасы Т.Д.Дөөлөткелдиева тарабынан изилденген.

1974-1977жж. Кыргыз ССРнин МСХ биофабрикасы менен бирликте жергиликтүү штаммдардан бактериалдык препараттардын 4400т тажрыйбалык партиясы чыгарылган. Бул препараттардын сыноосу үй куштардын жана КРСтин кан соргуч курт кумурскаларнына жана кенелеринине каршы өткөрүлгөн. Бул сыноолордун натыйжасында бактериалдык препараттардын таасири жөнүндө сунуштоолор түзүлгөн.

У.Б.Узденов бөлүп алган *Bacillus thuringiensis var.berliner* штаммынын негизинде эктопаразитин препараты чыгарылган. Бактериалдык препараттын тажрыйбалык партиялары 1г порошокто 30млрд. титр микробдук клетка болгон “Прогресс” заводунда өндүрүлгөн. Препарат термостабилдүү экзотоксиндин камтылышы менен өзгөчөлөнгөн жана бул өзгөчөлүгү курт кумурскалар жана кенелер менен күрөшүүдө жогорку эффективдүүлүгүн көрсөткөн. 1982-1983жж. бул препараттын таасир берүүсү лабораторлук жана өндүрүштүк шарттарда кан соргуч курт кумурскалардын кээ бир түрлөрүнө каршы, жана ошондой эле жалбырак жегич жана соруучу ооз аппаратына ээ курт кумурскаларга (жубайсыз жибек көпөлөгү, тутовая пяденица, крапивник) каршы колдонулуп көрүлгөн. Сокулук районундагы “Красная заря” колхозунда люцернанын үрөөндүк зыянкечтерине каршы препараттын тажрыйбалык сыноосу өткөрүлгөн. Препараттын эффективдүүлүгү зыянкечтердин түрдүүлүгүнө жараша ар кандай болгон.

Үй куштардын мамык жегичтерине каршы кристалл пайда кылуучу

бактериялардын жана алардын препараттарынын колдонуусун Н.С.Асылбаева, С.Ж.Федорова өткөрүшкөн.

Thuringiensis группасындагы бактериялар жана алардын негизинде өндүрүлгөн препараттар гамазовдук кенелерге *D.gallinae* каршы сыноодон өткөрүлгөн.

Кристалл пайда кылуучу бактерияларды КРСтин тери көгөөндөрүнө каршы иш аракеттерди А.А.Морозов жана Л.Ф.Ромашева өткөрүшкөн.

Кристалл пайда кылуучу бактериялардын кош буттуу кан соргуч организмдерге таасир берүү механизми Т.Д.Дөөлөткелдиева тарабынан изилденген.

А.В.Балыкин жана У.Б.Узденов кристалл пайда кылуучу бактерияларды Кыргызстандын аймагына таратуу боюнча маселе коюшкан. Алардын маалыматтары боюнча *Bacillus thuringiensis subsp.thuringiensis (H-1)* эң көп таралган түр. *Bacillis thuringiensis subsp.thuringiensis (H-5)* таралуу ареалы анча чоң эмес. У.Б.Узденовдун маалыматы боюнча биринчи серотиптеги штаммдар Кыргызстандын Түштүк аймагында Чүй жана Ысык-Көл аймактарына караганда сейрек кездешет.

Ошентип, Кыргызстанда 1972-1985жж. энтомопатогендик бактерияларды табуу жана бөлүп алуу процесстери негизинен кан соргуч курт кумурскалардын жана кенелердин, жапай куштардын жана кээ бир фитофаг курт кумурскалардын организминен алынган. Жогорууда айтылган объектилердин үлгүлөрү Чүй, Ысык-Көл жана жарым жартылай Түштүк Кыргызстандан алынган.

Өз убагында бул изилдөөлөр мамлекеттик органдар тарабынан түшүнүк алган эмес. Препараттардын тажрыйбалык сыноо партиялары министерстволордун ж.б тармактардын талаптарына жооп бере албай, препараттар өндүрүшкө киргизилген эмес. Препараттардын негизин түзгөн штаммдар убакыттын өтүшү менен биринчилик патогендик касиеттерин жоготуп, акыры таптакыр жоголушкан.

Бирок буга карабастан өсүмдүк коргоо адистердин, окумуштулардын Кыргызстандын шартында зыянкечтер менен күрөшүүдө интеграциялык системасын өнүгүүшүндө чоң саалымы бар.

Интеграциялык күрөшүүнүн негизги максаты зыянкечтерге карата селективдик таасир берүүнүн жолдорун табуу жана тандоо болуп саналат. Бул каражаттар сан регуляциялоонун табигый механизмдердин күчтөндүрүүсүн жана сакталышын

камсыздоосу керек.

Энтомопатогендик микроорганизмдерди колдонуу өсүмдүктөрдүн интеграциялык коргоосунун өтө маанилүү элементи болуп саналат. Бул зыянкечтердин табигый душмандарын сакталышын камсыздайт жана айлана чөйрөгө терс таасир тийгизбейт. (4)

1.8 Кыргызстанда *Bacillus thuringiensis* бактериясынын таралышы

Кыргызстанда кристалл пайда кылуучу бактериялар Т.Дөөлөткелдиева тарабынан көп изилденген. Кристалл пайда кылуучу бактерияларды бөлүп алууда ооруган же өлгөн курт кумурскалар, өсүмдүк калдыктары жана топурак үлгүлөрү өлкөнүн ар кандай региондорунан чогултулган.

Ош областы боюнча тоолуу ландшафтардан (деңиз денгээлинен 1700-2300м бийиктикте):

Алай районунун Сары-Булак жана Сопу-Курган айылдары;

Араван районунун Мангыт айылы;

Лейлек районунун Кулунду айылы;

Кара-Суу районунун Төлөйкан айылы.

Жалал-Абад областы боюнча, корук зоналарынан:

Сары-Челек коругу, Аркыт айылы;

Арсланбап-Ата токой коругу, Кара-Алма, Кызыл-Ункүр, Кош-Терек токой чарбалары;

Токтогул районунун Торкент айылы;

Чаткал районунун Каныш-Кыял айылы.

Ыссык-Көл областы боюнча:

Кырчын капчыгайы;

Тору-Айгыр айылы;

Корумду айылы;

Түп районунун Жыргалан зонасы;

Жети-Огуз районунун капчыгайлары.

Нарын областы боюнча:

Ат-Башы районунун Ак-Муз жана Кош-Дөбө айылдары;

Кочкор районунун корук зонасы.

Кыргызстандын аймагында кристалл пайда кылуучу бактериялар көп таралгандыгы Профессор Т.Дөөлөткелдиева тарабынан далилденген жана бактериялардын коллекциясы түзүлгөн. (4)

2- БӨЛҮК.
МАТЕРИАЛДАР ЖАНА МЕТОДИКАЛАР

2.1 Bacillus thuringiensis бактериясын жаратылыштан бөлүп алуу ыкмалары

2.1.1 Үлгүлөрдү чогултуу

Түндүк Кыргызстандын ар кандай аймактарынан топурак жана өлгөн курт кумурскалардын үлгүлөрү чогултулду. Үлгүлөр алынган жерлер Bt-биопестициддери менен эч качан иштетилген эмес. Курт кумурскалардын үлгүлөрү бактериозго шектүү болгон симптомдору менен гана алынды.

Үлгүлөр жай мезгилинин аягында жана күз мезгилинде чогултулду. Топурак үлгүлөрү жерден 10см тереңдиктен алынды.

Үлгүлөр стерилдүү пластмассалык идиштерге салынып, +4°С температурада сакталды. (14)

2.1.2 Топурактан бөлүп алуу:

Кристалл пайда кылуучу бактерияны топурактан бөлүп алууда топурак микробиологиялык анализдөөгө дуушар болот. Асептикалык шарттарда ар бир үлгүдөн 10г топурак стерилдүү фарфор идишинде жанчылат. Эзилген массага 100мл стерилденген суу кошулат, 10мин боюнча жакшылап аралаштырылат. Кийин колбадан 9мл стерилденген суу куюлган 4 пробиркада бир нече суюлтуу жасалат (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}). Эң акыркы суюлтулган суспензиядан чөйрөгө отургузулат. Чөйчөкчөлөр термостатта 27-28°С кармалат. (14)

2.1.3 Өлгөн курт кумурскалардан бөлүп алуу:

Курт кумурсканын денеси спирт ичинде 2-3 мин кармалат. Чыгарып, оттун жалыны аркылуу тез арада өткөрүлөт жана дисстирленген сууга салынат да бир нече жолу жуулат. Кийин 1мл дисстирленген сууда жакшылап жанчылат. Пайда болгон гомогенаттан 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4} болгон суюлтуулар даярдалат. Эки акыркы суюлтуулган суспензиялардан азык чөйрөгө отургузулат. Чөйчөкчөлөр термостатта 27-28℃ кармалат. (14)

2.2 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын нормалдуу өсүшүн камсыздоочу чөйрөлөрдү даярдоо ыкмалары

Bacillus thuringiensis бактериясынын бөлүп алууда жана лабораториялык шартта сактоодо колдонулган атайын азык чөйрөлөрүнүн курамы***:***

Таблица 2.2.1 ЭПА (эт пептон агары)

1	ЭПА	35г
2	Дистиллирленген суу	1л

ЭПА – катуу, жасалма чөйрө. 96-100°С температурада эрийт жана бөлмө температурасында катууланат. Бул чөйрө органикалык азотко жана аминокислоталарга бай болуп эсептелет.

Пептиддердин жана пептондордун булагы болуп триптон саналат. Дрож экстрактында витаминдер жана микроэлементтер камтылган. Транспорттоо жана осмостук баланс үчүн өтө маанилүү натрийдин иондорун чөйрөгө натрийдин хлориди түрүндө кошушат. Ошондой эле триптон алмаштырылсыз аминокислоталардын булагы катары белгилүү.

Таблица 2.5.2 **LB чөйрөсү (англ. Lysogeny broth)**

1	Триптон	10гр
2	Дрож экстракт	5гр
3	NaCl	10гр
4	Дис.суу	1л

LB чөйрөсү (англ. Lysogeny broth) – бактериялдык культураларды өстүрүүдө колдонулган, өтө бай азык чөйрө. LB деген кыскартуу лизогенндик чөйрө деп ачыкланат.

Баардык компонеттер дис.сууда эритилип, автоклавка салынат, жана 121°С 20мин боюнча кармалат.

2.3 *Bacillus thuringiensis* бактериясын боё ыкмалары

2.3.1 Б.В.Логинова жана А.Я.Лескованын ыкмасы:

6 суткалык культурадан алынган мазок фиксацияланат, ага 5%-түү малахит жашылынын эритмеси 2-3 тамчы куюлат жана спиртовканын үстүнөн жай өткөзүп буу пайда болгонго чейин ысытылат. Айнекти муздатылып, дистирленген суу менен жуулат. Нымдуу препараттын үстүнө уксус-ацетон эритмеси куюлуп, 1мин ичинде боёлот, кайрадан боёк жуулат, фильтр кагазы менен кургатылат. Мазок 5%-түү нейтрал кызыл менен боёлот, дистирленген суу менен жуулат жана кургатылат. *Боёнун жыйынтыгы:* споралар изумруд-сымал жашыл түскө боёлот, кристаллдар көк-сыя же кара түскө боёлот. Вегетативдик клеткалар кызыл-күрөң түскө боёлот. Кээ бир учурларда боёну 5%-түү эозиндинкарбол эритмеси менен жүргүзүүгө болот. Эритме препараттын үстүнө куюлат, оттун жалынында буу чыкканга чейин кармалат, 2мин кийин суу менен жуулуп, кургатылат.

2.3.2 Пешковдун ыкмасы:

Фиксацияланган препаратка Леффилердин метил көк боёгу куюлат жана 3мин күйүп турган спиртовка жалынынын үстүнөн буу чыкканга чейин фиксацияланат. Суу менен жуулуп, сафронин эритмеси менен боёлот.

Боёнун жыйынтыгы: кристаллдар кызыл түскө боёлот, споралар түзсүз, вегетативдик клеткалар кызыл түскө боёлот.

2.4 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын молекулярдык - биохимиялык касиеттерин изилдөө ыкмалары

2.4.1 Спора жана кристаллдардын изилдөөсү

Изоляттар вегетативдик клеткалардын, спораларалдын жана параспоралдык кристаллдардын морфологиясынын негизинде фазалык-контрасттык микроскопия методу аркылуу аныкталды.

Изоляттар ЭПА чөйрөсүндө 37°С 48саат боюнча өстүрүлгөн. Өсүп чыккан колониялардан препараттар даярдалып, фуксин боегу менен боелуп жана иммерсиялык май тамчылатылып, микроскоп алдында изилденди. Спорангиялык клеткаларда споранын жанында жакшы көрүнгөн параспоралдык кристаллдары бар изоляттар Bt катары идентификацияланган.

2.4.2 Каталазалык активдүүлүк

Каталаза – бул өтө кычкыл суутекти кычкылтекке жана сууга ажыраткан, клетка ичинде ээриген фермент. Ошондой эле бул фермент кычкылтектин меттаболиттеринин токсиндүү формаларын жок кылуу үчүн кычкылтектүү чөйрөдө жашаган микроорганизмдер тарабынан бөлүнүп чыгарылат. Каталаза өтө кычкыл суутектин бактерициддик таасирин нейтралдаштырып, бактерияны коргойт.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Изоляттар ЭПА чөйрөсүндө 37℃ 24саат өстүрүлгөн. Предметтик айнекке 3% суутектин өтө кычкылы (перекись водорода) бир тамчысы куюлуп, анын ичине илгичтин жардамы менен таза культура киргизилет жана аралаштырылат. Реакция оң болгондо (каталазанын бар болуусунда) перекись водорода суунун пайда болуусу жана кычкылтектин бөлүнүүсү менен ажырайт жана көбүк пайда болот. Терс реакцияда көбүк пайда болбойт. (15)

2.4.3 Протеолитикалык активдүүлүк

Протеолиз бактериалдык клеткалардын өсүү учурунда протеазаларды бөлүп чыгаруусун түшүндүрөт. Протеолитикалык активдүүлүк көбүнчө желатина гидролизи менен аныкталат. Бирок, ошондой эле протеолитикалык активдүүлүк казеин гидролизи менен да аныкталат.

2.4.4 Казеин гидролизи

Казеин – бул пептиддик байланыштар менен байланган жана аминокислоталардан турган макромолекула, жана клеткалык мембранадан өтүүгө өтө чоң белок. Ошондуктан, бактериянын клеткалары протеолиттик казеиназа экзоферментин бөлүп чыгарышат жана бул фермент белокту аминокислоталарга чейин ажыратат. Кийин аминокислоталар клеткалык мембранадан өтүп, клетка тарабынан колдонулат.

Казеин гидролизин аныктоо үчүн сүт – агар чөйрөсү колдонулат. Ал стерилдүү, майсыз сүттөн жана стерилдүү 3%түү суу агарынан турат (канташтык нормасы 50/50 болуш керек). Казеин гидролизи колониялардын четтеринде пайда болгон түссүз зоналарга карата аныкталат.

2.4.5 Желатин гидролизи

Желатин – бул коллаген д.а компонеттен алынган белок. Мындай тест организмдин желатинди ээрите турган - желатиназа ферметин бөлүп чыгуу жөндөмдүүлүгүн аныктоо үчүн жүргүзүлөт. Бул процесс 2 ыраттуу реакцияда жүрөт. Биринчи реакцияда желатиназалар желатинди полипептиддерге чейин ажыратат. Кийин полипептиддер аминокислоталарга айланат. Натыйжада, бул аминокислоталар бактериянын клеткасы тарабынан колдонула баштайт.

Желатин гидролизин аныктоо үчүн эт-пептон-желатин (ЭПЖ) чөйрөсү колдонулат.

Таблица 2.4.1 Эт-пептон-желатин (ЭПЖ) чөйрөсү

1	Эт пептон шорпо	13гр
2	Желатин	150гр

Баардык компонеттер дис.сууда үзгүлтүксүз аралаштырууда эритилип, 9мл-ден пробиркаларга куюлуп, 121℃ 15мин автоклавка коюлат.

Кээ бир организмдер, желатиндин курамына кирген желатиназа ферментин бөлүп чыгарышат жана бул ферменттин таасир астында желатин гидролизге учурап, гельдик касиетин жоготот.

Чыккан пробиркалар бөлмө температурасына чейин муздатылат. Культура бактериалдык илгичтин жардамы менен, укол методу аркылуу киргизилет жана 35℃ 24-48саат инкубацияланат. Жыйынтыктар ар кандай убакытта эсептелинет, ал үчүн пробиркалар муздаткычка коюлат. Муздатылган пробиркаларды кылдаттык менен жантайтып, чөйрөнүн ээригенин же каттуу бойдой калышы аныкталат.

2.4.6 Амилолиттик активдүүлүк

Амилаза – бул крахмалды канттарга ажыраткан фермент.

Крахмал камтыган азык чөйрө агарына бактерия культурасы отургузулат жана 24саат боюнча 37℃ температурада өстүрүлөт. Өсүп чыккан колониянын үстүнө 5-10мл Люголь эритмеси коюлат. Крахмал амилаза ферментинин негизинде гидролизге учурайт. Чөйрөнүн көк түстө болгону менен колониянын четтери түзсүздөнөт.

Таблица 2.4.2 Крахмал камтыган азык чөйрө

1	Эт пептон шорпо	13гр
2	Крахмал индикатор	4гр
3	агар	15гр

2.4.7 Углеводдордун ферментациясы

Углеводдордун ферментациясы көбүнчө бактерияларды 0,5-1% ар кандай углеводдорду камтыган (Глюкоза, Сахароза, Мальтоза) пептондук сууда өстүрүү менен аныкталат. Микроорганизмдер углеводдорду ажыратканда кислота п.б. Кислотанын пайда болушу изилденип жаткан чөйрөнүн pH төмөндөтөт жана индикатордун түсүнүн өзгөрүшү менен аныкталат. Түстүн өзгөрүшү кислотанын жетиштүү гана өлчөмү п.б өзгөрөт, анткени, бактериялар пептон бөлүп чыгарган щелочтуу продуктуларды пайдаланышы мүмкүн. Кислотанын пайда болушу индикаторду кошуу менен аныкталат, мисалы, Андредэ эритмеси. Андредэ эритмесинин pH 7,2 жана мала сары же түссүз болот; кислота пайда болгондо кызыл түскө айланат.

Таблица 2.4.3 Пептон суусу

1	Пептон	10гр
2	NaCl	5гр
3	Дис.суу	100мл

Ар бир 100мл пептондук сууга 0,5гр колдоно турган углевод жана ошодой эле 1мл-ден Андредэ индикатору кошулат. (15)

2.5 ПЦР анализи

ПЧР - полимераза чынжыр реакциясы – биоматериалда ДНК-нын белгилүү фрагменттеринин аз концентрациясынын бир нече жолу репликацияга учуротуусуна негизделген молекулярдык биологиянын экспереметалдык методу. ПЧР методун Кэри Муллис окумуштуусу тарабынан ачылган жана бул эмгеги үчүн 1993-жылы Нобель сыйлыгына татыган.

Bt штаммдары 10мл LB чөйрөсүндө 37℃ 24саат боюнча шейкерде өстүрүлгөн. Клеткаларды центрифуга аркылуу (4,850 rpm 10мин) чогултулган.

Таблица 2.5.1 **LB чөйрөсү (англ. Lysogeny broth)**

1	Триптон	10гр
2	Дрож экстракт	5гр
3	NaCl	10гр
4	Дис.суу	1л

ПЦР анализин универсалдуу праймерлердин 27f (5’-GTTTGATCMTGGCTCAG-3’), 1492R (5’-TACGGYTACCTTGTTACGCTT-3’) колдонуусу менен генетикалык анализатордо өткөрүлөт.

Амплификация 25мкл кошулмада өткөрүлгөн: 1*полимераза үчүн буффер BioTaq (17mM(NH4)SO4, 6mM Трис-HCl, pH 8.8, 2mM MgCl2), 5нМ dNTP, 50нг ДНК-матрицасы, 12,5пМ праймери жана 1,25 ед.акт. BioTaq- ДНК-полимеразасы. Температуралык-убакыттык профиль: биринчи цикл 94℃, 2мин; кийинки 40 цикл-94℃, 20с, 40℃, 30с жана 72℃, 90с; акыркы элонгация – 7мин 72℃.

Амплификацияга учураган фрагменттерди 1,5% агардык гелде электрофорездин жардамы менен детектиризацияланат.

2.6 Бактериалдык препаратты алуу үчүн технологиялык этаптар

2.6.1 Bacillus thuringiensis бактериясынын культураларын лабараториялык шарттарда сактоо.

Штаммдарды сактоо төмөнкү жолдор менен жүрөт:

- Кургатылган абалда, жантайган агардын бетинде;
- Фильтр кагазында кармоо;
- Тоңдурулган абалда;
- Вазелин майынын алдында

Бул ыкмаларда баардык культуралар муздаткычка салынып 4℃ температурада сакталат. Ал эми тоңдурулган абалдагы штаммдар -20℃ температурада сакталат.

2.8 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын штаммдарынын физиологиялык абалын жана бир тектүүлүгүн текшерүү

Bacillus thuringiensis бактериясынын физиологиялык талабына жооп берген

чөйрөлөрдү тандоо. Бир калыпта өсүүсүн текшерүүдө эң негизги ЭПА, казеин суюк чөйрөсүндө жана жүгөрү шагын камтыган суюк чөйрөдөлөрдө аныкталды.

2.7.1 Энелик клеткаларды алуу.

Культура 100мл чөйрөсү бар 750млдик колбада тегерек айлаткычта (220об/мин) 48 саат боюнча 28-30°С температурада чайкалып өстүрүлөт. Ал эми отургузуучу материал катары 5-10 суткалык культура керектелет. 2-3мин ичинде 100°С бир аз ысытылган культура алынат. Отургузулган материалдын көлөмү 1мл чөйрөдө 100млн клетка түзүшү керек.

2.8 Штаммдардын биологиялык активдүүлүгүн аныктоо

Лабараториялык шартта штаммдардын активдүүлүгүн аныктоо ар кандай жаштагы соо зыянкечтерди жабыркатуу менен аныкталат.

- Лабараториялык шартта *Bacillus thuringiensis* бактериясы катуу чөйрөдө 5-7 сутка боюнча 28°С температурада өстүрүлөт. Стерилденген суу менен колониядан жуулуп, суспензия алынат. Анын ичине жаш жалбырактар чыланат, бир аз кургатылгандан кийин алар жем катары гусеницаларга же личинкаларга берилет.
- Лабараториялык шартта *Bacillus thuringiensis* бактериясы суюк чөйрөдө 48 саат ичинде шейкердин ичинде (айлануусуу 220об/мин), 28°С температурада өстүрүлөт. Өсүп жаткан өсүмдүккө туздөн түз тажрыйба жүргүзүлөт. Өсүмдүктүн жалбырактарына чачыратылат жана бираз кургатылат. Кийин ал марли менен жабылып, ичине 10 гусеница же личинка кое берилет. Тажрыйба 3-5 жолу кайталанат. 7 суткадагы суммардык өлүм штаммдын вируленттүүлүгүн аныктайт.

Кийин ар бир зыянкечке штаммдын таасир берүүсүнүн орточо проценти

чыгарылат. Ал Аббот формуласы менен эсептелинет:

$$\mathbf{A}=\frac{\text{Mo}-\text{Mк}}{\mathbf{100}-\text{Mк}} * \mathbf{100\%}$$

А – вирулентүүлүк (%);

M_0 – өлгөн зыянкечтердин проценти;

$M_к$ – контролдо өлгөн зыянкечтердин проценти.

Зыянкечтин организминде болуп жаткан патологиялык өзгөрүүсүн изилдөө үчүн жабыркаган зыянкечтин гемолимфасы менен соо зыянкечтин гемолимфасын салыштырышат. Гемолимфадан мазок жасалат, 10-12мин метанол менен фиксацияланат, Романовский-Гимза азур-эозин менен боёлот (боёдон биринчи боёгучтан 30 тамчы алынып, 10мл дис.суу менен аралаштырылат). Микроскоп алдында изилденет. Клетканын жана ядронун узундугун жана туурасын окулярдык микрометрдин жардамы менен өлчөнөт. Гемоциттердин %-тик катнашы 10 эсе көрүү талаасында 100 клеткага чейинки көрунүшү саналат.

Ал эми энтомопатогендик бактериянын өсүмдүктүн жалбырактарында сакталышын жана жалбырак бетиндеги суспензияны жууп жана чөйрөгө отургузуу менен аныкталат.

3- БӨЛҮК.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛДЫК БӨЛҮК ЖАНА ӨЗДҮК ИЗИЛДӨӨЛӨР

3.1 Бөлүнүп алынган штаммдар

Түндүк Кыргызстандын ар кандай аймактарынан чогултулган топурак жана өлгөн курт кумурскалардын үлгүлөрүнөн *Bacillus thuringiensis* бактериясынын он беш штаммы бөлүнүп алынды. Жарык жана фазово-контрастык микроскоп астында изилдөө өткөргөндө, бөлүнүп алынган изоляттар өндүргөн параспоралык денечелердин формалары бипирамидалдуу жана куб түрүндө болгону аныкталды.

Таблица 3.1.1 Бөлүнүп алынган штаммдардын тизмеси

Алынган булактар	**Изоляттардын лабараторияда кыскартылган аттары**
Талаа топурагы	**1п**
Талаа топурагы	**2п**
Талаа топурагы	**3п**
Өлгөн коңуз	**К-2**
Өлгөн коңуз	**К-3**
Балыкчы топурагы	**Б-1**
Капуста зыянкечи	**Км-1**
Капуста зыянкечи	**Км-2**
Кажы-сай топурагы	**Кж-1**
Кашка-Суу топурагы	**KS**
Арча бутагы	**AB**
12 Каминов топурагы	**12K**
Өлгөн гусеница	**BB**
Орто-Сай топурагы	**OS**

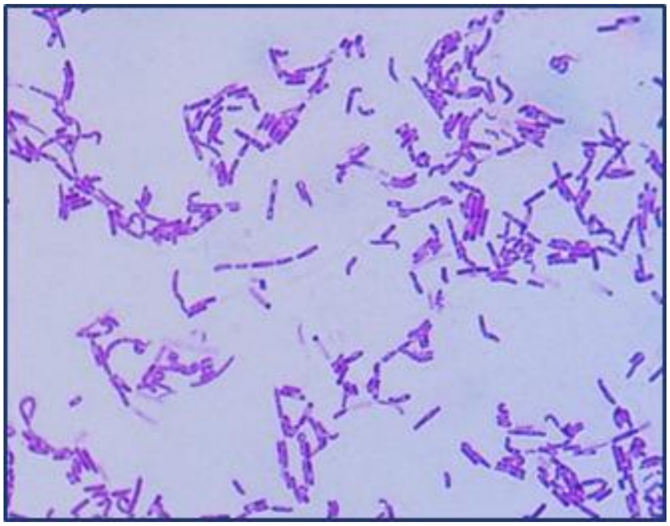
3.2 ЭПА чөйрөсүндө *бөлүнүп алынган изоляттарды сүрөттөө:*

ЭПА чөйрөсүндө өстүрүүдө бактерия консистенциясы боюнча илешкек, 6-10мм диаметрдеги тегерек же туура эмес формадагы тиштүү четтери менен колонияларды пайда кылды. Колониялардын рельефтери жалпак, үстүнкү катмары тегиз жана жылмакай, боз түстүү. Бул чөйрөдө культуралар бат өстү, ЭПАнын үстүндө 2-3 сутканын ичинде пайда боло баштады. (Сүрөт 3.2.1)

Сүрөт 3.2.1 ЭПА чөйрөсүндө (КЖ-1) штаммдын өсүп чыккан колониялар

Вегетативдик клеткалар Bt тибинде, ал эми баардык изоляттардын спораларынын жайгашуусу субтерминалдуу болду. (Сүрөт 3.2.2) Кээ бир учурларда, параспоралдык кошулмалар эндоспорадан тышкары пайда болушу байкалды. Көбүнчө кристаллдардын формасы тегерек, куб түрүндө болду. Кристаллдык

белоктун морфологиясы ар кандай болушунун себеби, айлана чөйрө шарттарынын генетикалык өзгөрүүлөрү менен аныкталышы мүмкүн.



Сүрөт 3.2.2 (1П) штаммдын микроскоп алдындагы көрүнүшү

3.3 Каталазалык активдүүлүк

Баардык изоляттар каталазалык активдүүлүктү көрсөттү. (Сүрөт 3.3.1)

Сүрөт 3.3.1 (Б-1) штаммдын каталазалык активдүүлү

3.4 Протеолитикалык активдүүлүк

Протеазалык активдүүлүктү аныктоодо желатиназа тести казеиназа тестинен айырмаланды.

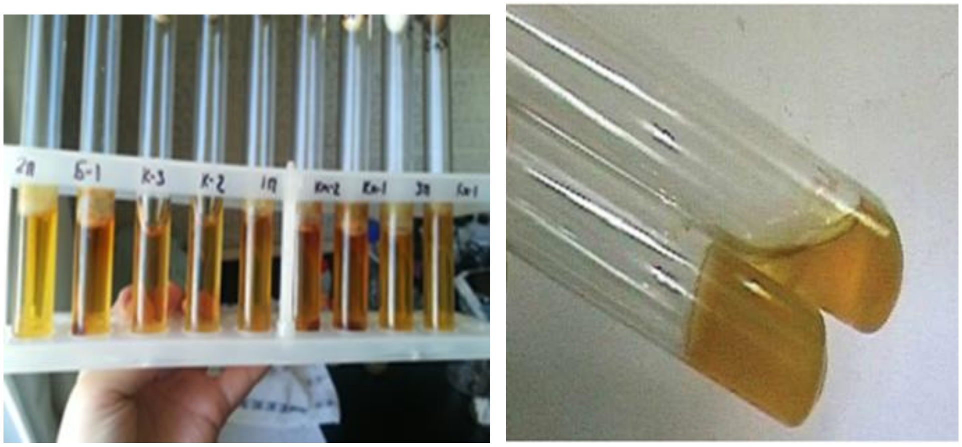
3.5 Казеин гидролизи

Баардык изоляттар казеинди гидролизге учуратышы аныкталды. (Сүрөт 3.5.1)

Сүрөт 3.5.1 (Кж-1) штаммынын казеин гидролизи

3.6 Желатин гидролизи

Баардык изоляттар желатинди гидролизге учуратышы аныкталды. Көбүнчө изоляттар оң таасирди 48саат ичинде көрсөтө алды, ал эми калган изоляттар 7 күн инкубациялоодон кийин гана. (Сүрөт 3.6.1)

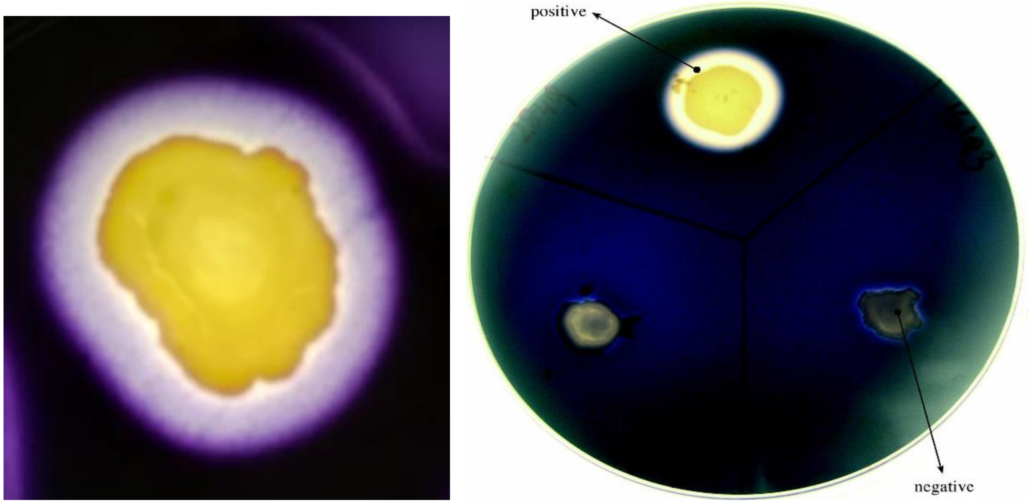


Сүрөт 3.6.1 Бөлүнүп алынган штаммдардын желатин гидролизи

3.7 Амилолиттик активдүүлүк

Крахмал камтыган азык чөйрөлөрдү, Bt штаммдарын ферментациясында, көмүртектин негизги булагы катары колдонушат.

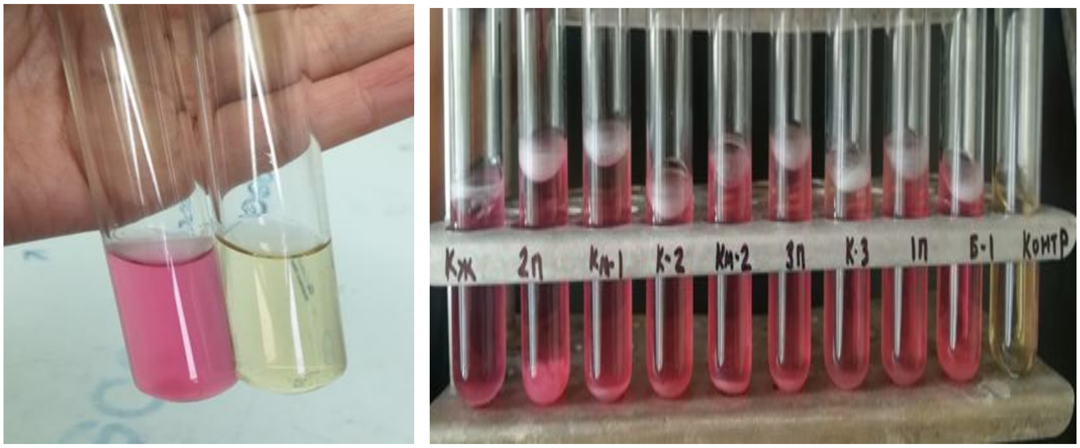
Изилденип жаткан баардык изоляттарда крахмал камтыган чөйрөдө амилаза пайда кыла турганы аныкталды. (Сүрөт 3.7.1)



Сүрөт 3.7.1 (KS) штаммынын амилолиттик активдүүлүгү

3.8 Углеводдордун ферментациясы

Баардык штаммдар Глюкоза, Сахароза, Мальтоза ферментациясына оң таасир көрсөттү жана 24саат ичинде кислотаны пайда кылып, ферментативдик шорпонун түсүн мала сарыдан кызыл түскө өзгөрттү. (Сүрөт 3.8.1)



Сүрөт 3.8.1 Бөлүнүп алынган штаммдардын Глюкозадагы ферментациясы

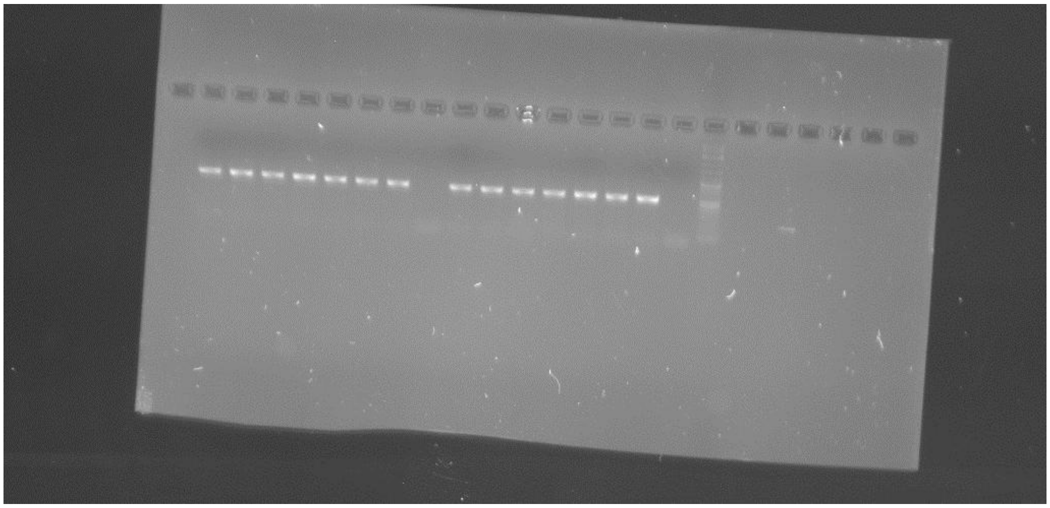
3.9 ПЦР анализ менен ПЧР методу менен идентификациялоо

Иштин жүрүшүндө 3 этап аткарылды:

- Биринчилик денатурация 94˚С температурада 3 мин кармалат
- 30сек. 50˚С кармоо
- 3мин. 72˚С кармоо
- Элонгация 5мин. 72˚С кармоо менен 35 жолу кайталануу ишке ашырылат.

Жыйынтыгында 1.0%түү горизонталдуу агар гелинде этидиум бромид менен боелуп электрофорезден өткөрүлүп, ультра фиолет нурунда каралды (3.2.1-сүрөт).

ПЧР методунун артыкчылыгы-белгилер байкала электе патогендин бар же жок экенин аныктооого болот.



Сүрөт 3.9.1. *Bacillus thuringiensis* диагностикалоодогу үч реакциядан кийин алынган 16 S r RNA генинин электрофорездик профилдери

1п 2п 3п К-2 К-3 Б-1 Км-1 Км-2 Кж-1 KS AB 12K BB OS

Таблица 3.9.1 Bt штаммдары

Штаммдар	Бөлүнүп алынган булак	Gene sequences (5'_3') of primer	PCR продуз ундугунун өлчөмү (bp)	BT штаммдарын GenBank-та аныктоо
12-К	(Coleoptera)	Cry 4-genes DipIF (5' CAA GC CAAATCTTGTGGA-3') Cry 4-genesDipIR (5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC 3')	933	Bacillus thuringiensis serovar coreanensis strain ST7.GenBank: CP016194.1
Км-2	(Coleoptera)	Cry 4-genes DipIF (5' CAA GC CAAATCTTGTGGA-3') Cry 4-genes DipIR (5' ATGGCTTGT TTCGCTACATC-3')	745	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1 GenBank: CP010005.1
1П	Топурак	Cry 2-genes II (+) (5' - TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT-3')	1421	Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA gene, strain B20

		Cry 2-genes II (-) (5' -AACTCCA TCGTTATTGTAG-3')		GenBank : LN890196.1
ЗП	Топурак	Cry 2-genes II (+) (5' - TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT-3') Cry 2-genes II (-) (5' -AACTCCAT CGTTATTGTAG-3')	1500	Bacillus thuringiensis strain Gaoshi-1 16S ribosomal GenBank : GU201858.1
К-3	(Coleoptera)	Cry 2-genes II (+) (5' - TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT-3') Cry 2-genes II (-) (5' - AACTCCATCGTTATTGTAG-3')	1478	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain NCIM 2 GenBank : KR109266.1
КМ-1	(Lepidoptera)	Cry 3 - genes Coll F (5' - GTCCGTATATTCAGGTG-3') Cry 3 - genes Coll R (5' - CACTTAATCCTGTGACGCCT-3'	933	Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29, complete genome GenBank: CP010089.1
Б-1	Топурак	Cry 3 - genes Coll F (5' - GTCCGTATATTCAGGTG-3') Cry 3 - genes Coll R (5' - CACTTAATCCTGTGACGCCT-3')	933	Bacillus thuringiensis serovar galleriae strain HD-29, complete genome GenBank: CP010089.1
KS	Топурак	Lep 2F (5' -CCGAAAGTCAA ACATGCG-3') Lep 2R (5' -TACATGCCCTTTCA CGTTCC-3')	933	Bacillus sp. B25(2016b) genome GenBank: CP016285.1

3.10 *Bacillus thuringiensis* бактериясынын жаңы бөлүнүп алынган штаммдарын зыянкечтерге каршы сыноодон өткөрүү

3.10.1 Лабаратордук шарттарда штаммдардын *Arge pagana spp.* личинкаларын жабыркатуу жолу менен биологиялык активдүүлүгүн аныктоо.

Bacillus thuringiensis штаммдарынын энтомопатогендүүлүк активдүүлүгү in vitro шарттарында текшерилди. Лабораториялык шарттарда ***Arge pagana spp.*** личинкасына тажрыйба жүргүздүк.

3.10.2 *Arge pagana spp.*

Сүрөт 3.10.1 *Arge pagana*

Падышачылык:	Animalia
Тип:	Euarthropoda
Класс:	Insecta

Катар:	Hymenoptera
Уруу:	Argidae
Тукум:	Arge
Түр:	A. Pagana

Жалган личинка, топуракта кыштайт. Имагосунун узундугу 6 мм чейин, аркасы жылтыраак, кара түстө, канатары кара, буттары дагы кара түстө, жанба жагы сары түстө болот. Таарыгыч келбети менен арыга окшош. Ургачылар өсүмдүктүн жаш өсүндүүлөрдүн башына жумуртка таштайт. Жумурткадан чыккан жалган личинкалар жаш өсүмдүктүн ичине кирип, 4 см деги жолдорду жасашат. Жабыркаган өсүмдүктөр карайып соолуп калат. Күз мезгилинде жалган личинкалар топуркка кыштоого кетишет. (16)

Сүрөт 3.10.2 *Arge pagana spp.*личинкасы

Сүрөт 3.10.3 *Arge pagana spp.*имагосу

Таарыгычтын личинкасы жумурткадан чыгып өсүмдүктү жабырката баштайт. Булар личинка стадиясында көпөлөктөрдүн личинкаларына окшош келишет, бирок, гусеницаларда 5 жуптан көп буттары жана алты көздөрү болот, ал эми таарыгычтын болсо, 6 же 8 жуп буттары жана 2 эле көздөрү болот, ошондуктан булардын личинкаларын жалган личинкалар деп аташат.

Өсүмдүктү жабыркатткандан кийин таарыгычтын гусеницалары бактан жерге түшүп, куурчакчага айланат. Жай мезгилинин ортосунда зыянкечтердин экинчи мууну пайда болот, ал эми бир эле сезон ичинде таарыгычтар 4 муунга чейин бериши мүмкүн, жана жашыл жалбырактарды жаз мезгилинен баштап күзгө чейин жабыркатат.

Баардык таарыгычтар өсүмдүктөрдүн жашыл массасы менен азыктанышат. Ар бир түр белгилүү жапайы же маданий өсүмдүктө жашап, аны жабыркатып жана тканы менен азыктанышат. (17)

Сүрөт 3.10.4 Arge pagana spp. личинкаларын алмурут жалбырактарын жабыркатуусу

Лабараториялык шартта *Bacillus thuringiensis* бактериясы суюк LB чөйрөсүндө 48 саат боюнча шейкердин ичинде (айлануусуу 220об/мин), 28℃ температурада өстүрүлгөн.

Штаммдардын активдүүлүгүн аныктоо үчүн бионализ стерилдүү, 9см диаметриндеги ичинде тегерек фильтр кагазы менен Петри чөйчөкчөлөрүндө өткөрүлдү. Ар бир чашкага үчтөн алмуруттун соо жалбырактары BT изоляттарынын суспензияларына чыланып коюлду. Arge pagana spp. личинкалары лабораторияга алып келинип, 2-3 күн боюнча кармалды. Arge pagana spp. личинкалары кокустан тандалып, ар бир чашкага 10-дон салынды. Ошол эле учурда, контроль катары препаратка чыланбаган жалбырактар чашкага коюлган.

Сүрөт 3.10.5 Arge pagana spp. личинкаларын Петри чөйчөкчөлөрүндө Bt штаммдары менен жугушутуруу тажрыйбалары

Сүрөт 3.10.6   *Arge pagana spp*. личинкаларын жабыркоосу

7 суткадагы суммардык өлүм штаммдын вируленттүүлүгүн аныктады.

Сүрөт 3.10.7 *Arge pagana spp.* жабыкаган личинкасынын 7 суткадан кийин көрүнүшү

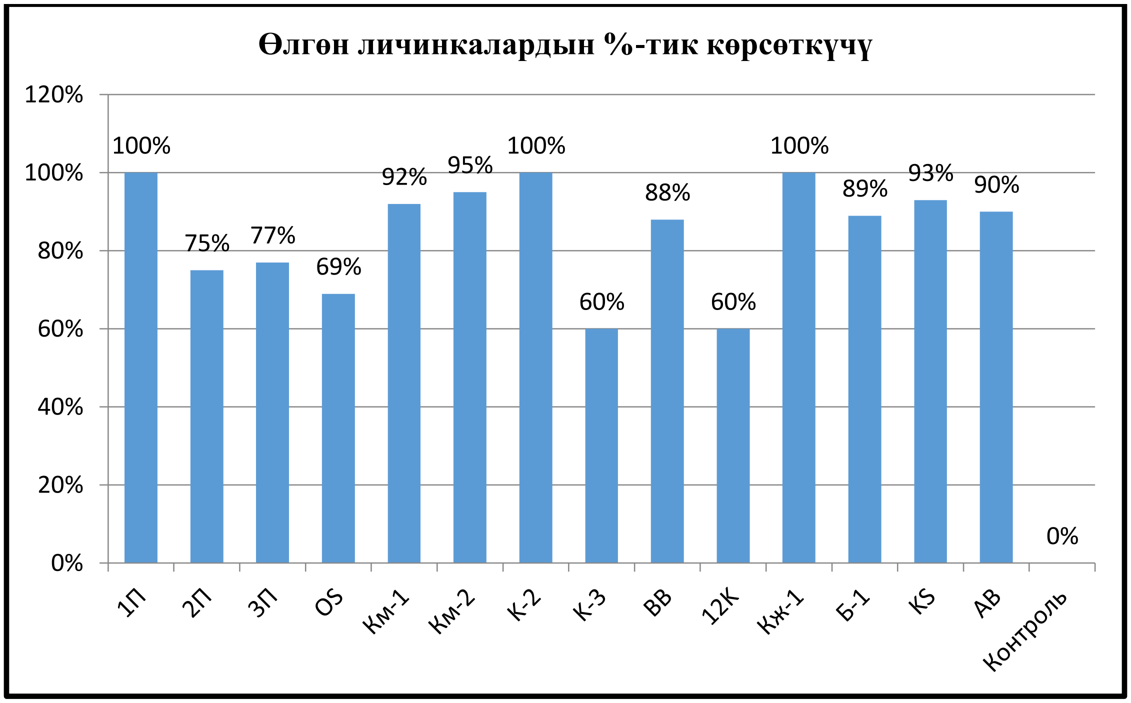


Диаграмма 3.10.1 Bt штаммдарынын Arge pagana spp. Личинкаларына каршы биологиялык активдүүлүгү

Эң жогорку мааниге ээ болгон штаммдардын таасир берүүсүнүн орточо проценти чыгарылды. Ал Аббот формуласы менен эсептелинди:

$$\mathbf{A}=\frac{\text{Мо}-\text{Мк}}{\mathbf{100}-\text{Мк}}*\mathbf{100\%}$$

А – вирулентүүлүк (%);

M_0 – өлгөн зыянкечтердин проценти;

$M_к$ – контролдо өлгөн зыянкечтердин проценти.

Натыйжада, 1П, К-2 жана Кж-1 штаммдары 100%-тик вирүлентүү болгону аныкталды.

3.11 Алма күбөсүнүн личинкасына каршы *Bacillus thurungiensis* штаммдарынын активдүүлүгү

Bacillus thurungiensis штаммдарынын энтомопатогендүүлүк активдүүлүгү in vitro шарттарында текшерилди. Лабораториялык шарттарда алма күбөсүнүн личинкасына тажрыйба жүргүздүк.

3.11.1 Алма күбөсү жөнүндө кыскача маалымат

Алма күбөсү (лат. *Hyponomeuta malinella)* – Yponomeutidae уруусуна кирген майда көпөлөк. Алма бактарынын өтө коркунучтуу зыянкечи.

Сүрөт 3.11.1 Алма күбөсүнүн личинкасы жана имагосу

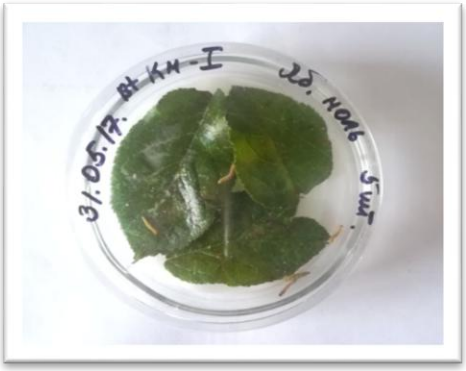
Алма күбөсүнүн денеси жалтыроо менен ак түстүү. Мурутчалары тынч абалында артка учкаштырылган. Алдыңкы канаттары ак, (Сүрөт 3.11.1) 3 туура эмес узунунан кеткен 18-20 чекиттери менен. Арткы канаттары астыңкы жагынан болгон алдыңкы канаттарындай эле эки жагынан тең боз түстүү; узундугу божомолдоо менен 20мм.

Жашоо циклы

Жумуркалар топтолуп сары былжыр зат менен капталган болот (кошумча жыныстык бездердин бөлүп чыгаруусу) жана ал жумуртка топторуна калкан пайда кылат. Кийин ал боз-күрөң түскө айланат. Бир топто 15-65 сүйрү саргыч жана диаметри боюнча 4-5мм жумурткалар болот. 3,5-4 жумадан кийин кара-күрөң башы менен саргыч гусеницалар чыга баштайт. Алар калкан астында кыштоого калышат. Жаз мезгилинде гусеницалар алма жалбырактардын паренхимасында пайда болушат жана бир жалбырактан экинчи жалбырака өтө беришет.

Км-1, Кж-1, Ж-3, Б-1, 3п штаммдардын биологиялык активдүүлүгү алма күбөсүн жугуштуруу менен сыноо өткөрүлдү.

Лабараториялык шартта штаммдардын топтолгон биомассаларынан суспензиялар даярдалды (9мл дис.суу+биомасса). Алма жалбырактары сууга таза жуулуп, даярдалган суспензияларга бир нече убакыт боюнча чыланды. Стерилдүү Петри чөйчөкчөлөргө фильтр кагаздарын салып, ар бир чөйчөкчөгө 2-3 алма жалбырагын койдук. Ар бир Петри чөйчөкчөгө 5 алма күбөсүнүн личинкасы киргизилди. Кийин ар бирине 24, 48, 72 саат сайын байкоо жүргүзүлдү.



(Сүрөт 3.11.2) Алма күбөсүнүн личинкасын *Км-1* штаммы менен жабыркатуу

(Сүрөт 3.11.3) Алма күбөсүнүн личинкасын *К-1* штаммы менен жабыркатуу

Лабораториялык шарттарда бөлүнүп алынган штаммдар менен алма күбөсүнүн личинкаларын жабыркатууда белгилүү сааттардын ичинде өзгөрүүлөр байкалган жок. Бирок ага карабастан тажрыйбадагы жабыркаган личинкалар 5 жана 6 суткаларда алсызданып, *Кж-1, Б-1 жана Км-1 штаммдары* менен жабыркаган 5 личинкалардын ичинен 1 же 2 өлүмгө учурады.

Өлүмгө учураган личинкалардын гемолимфасынан препараттар даярдалып, микроскоп алдынан каралды (Сүрөт 3.11.2).

Диаграмма 3.11.1 Сыноонун натыйжасында *Км-1, Кж-1, Ж-3, Б-1, 3п* штаммдарынын ичинен *Км-1, Кж-1* жана *Б-1* штаммдары личинкаларга таасир бергени аныкталды. Бул штаммдар личинкалардын 20-25% өлүмүнө алып келди.

3.12 Колорадо коңузунун личинкасына карата *Bacillus thurungiensis* штаммдарынын активдүүлүгү

Bacillus thurungiensis штаммдарынын энтомопатогендүүлүк активдүүлүгү in vitro шарттарында текшерилди. Лабораториялык шарттарда колорадо коңузунун личинкасына тажрыйба жүргүздүк.

3.12.1 Колорадо коңузу жөнүндө кыскача маалымат

Сүрөт 3.12.1 Колорадо коңузунун имагосу жана личинкасы

Колорадо коңузу *(лат. Leptinotarsa decemlineata)* – (Сүрөт 3.12.1) Chrysomelidae уруусуна кирген жалбырак жегич коңуз. Имагосу топуракта 20-50см тереңдикте кыштайт. Жаз мезгилинде алар сыртка чыгып жаңы чыккан өсүмдүктөр менен тамактанып, көбөйө башташат; эгерде ургаачылары күз мезгилинде катнашууга жетишип калса жазында алар дароо жумуртка таштай башташат. Ошентип, бир эле ургаачысы коңуздардын таралуу очогунун башталгычы болушу мүмкүн.

Жумурткаларын жалбырактын астыңкы бетине ташташат. Бир күндүн ичинде 5-80 жумурткага чейин. Температурага карата личинкалар жумурткадан 5-17 күн ичинде чыгышат. Личинкалар өтө интенсивдүү тамактанышат (Сүрөт 3.12.1) жана 2-3 жума ичинде куурчакчага айланууга топуракка 10см тереңдике кирип кетишет. 10-20 күндүн ичинде куурчакча пайда болот. Имагосу сыртка чыгат же келерки жазга чейин диапаузага кетет.

Имагосу да, личинкасы да паслен культурасындагы өсүмдүктөр: картошка, томат, баклажан жана ошондой эле тамекинин да жалбырактарын жейт. Буга байланыштуу колорадо коңузу айыл чарбадагы абдан коркунучтуу зыянкечтеринин бири болуп эсептелет.

Км-1, Кж-1, Ж-3, Б-1, 3п, 2п, Ж-2 штаммдардын биологиялык активдүүлүгү колорадо коңузунун личинкасын жабыркатуу менен сыноо өткөрүлдү.

Лабараториялык шартта штаммдардын топтолгон биомассаларынан суспензиялар даярдалды (9мл дис.суу+биомасса). Помидордун жалбырактары сууга таза жуулуп,

даярдалган суспензияларга бир нече убакыт боюнча чыланды. Стерилдүү Петри чөйчөкчөлөргө фильтр кагаздарын салып, ар бир чөйчөкчөгө 2-3 помидордун жалбырагын койдук. Ар бир Петри чөйчөкчөгө 5 колорадо коңузунун личинкасы ктргизилди. Кийин ар бирине 24, 48, 72 саат сайын байкоо жүргүзүлдү.

Сүрөт 3.12.2 Колорадо коңузунун личинкасын *Б-1* штаммы менен жабыркатуу

Сүрөт 3.12.3 Колорадо коңузунун личинкасын *Кж-1* штаммы менен жабыркатуу

Лабораториялык шарттарда бөлүнүп алынган штаммдар менен колорадо коңузунун личинкаларын жабыркатууда 24, 48 сааттан кийин көбүнчө личинкалар алсызданып, жабыркаганы байкалып турду. 72 сааттан кийин *3п, Б-1, Кж-1, Ж-3* жана *2п* штаммдары менен жабыркоо жүргүзүлгөн Петри чөйчөкчөлөрүндөгү личинкалардын өлүмгө учуроосу байкалды. 5 сутка өткөндөн кийин жыйынтыктар чыгарылды.

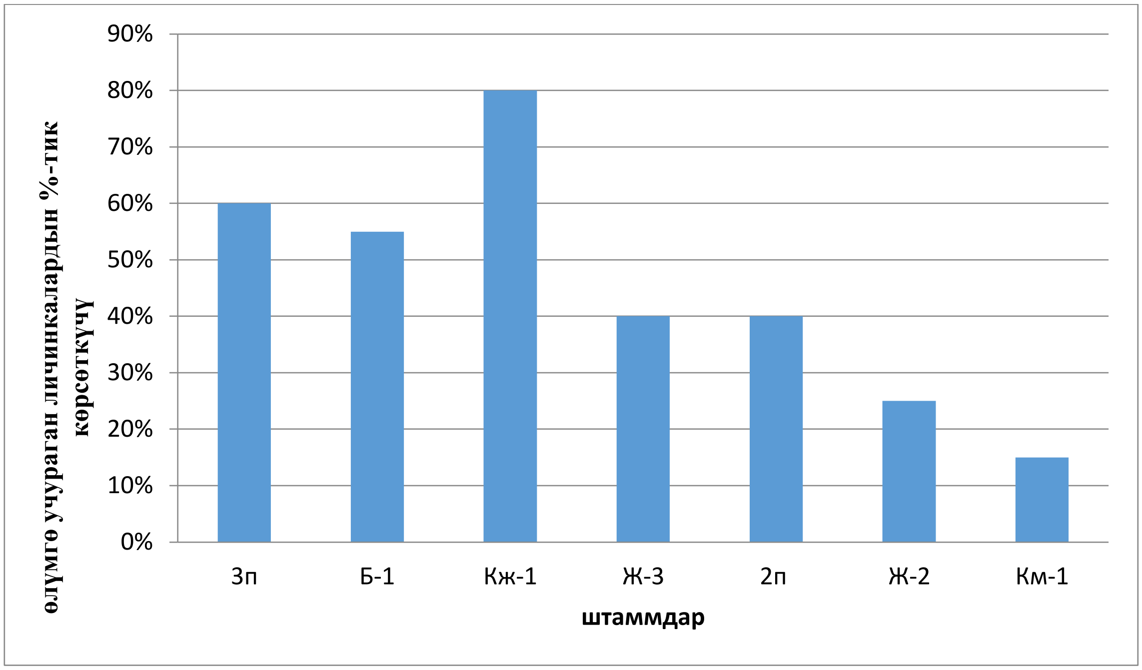


Диаграмма 3.12.1 Колорадо коңузунун личинкаларын жабыркатуу

Диаграмма 3.12.1 көрсөтүлгөндөй сыноонун натыйжасында *3п, Б-1, Кж-1, Ж-3, 2п, Ж-2, Км-1* штаммдарынын ичинен *3п, Б-1* жана *Кж-1* штаммдары личинкаларга таасир бергени аныкталды. Бул штаммдар личинкалардын 55-80% өлүмүнө алып келди.

КОРУТУНДУЛАР

1. Түндүк Кыргызстандын ар кандай аймактарынан чогултулган топурак жана өлгөн курт кумурскалардын үлгүлөрүнөн *Bacillus thuringiensis* бактериясынын он беш штаммы бөлүнүп алынды.
2. Бөлүнүп алынган штаммдардын физиологиялык талаптарына жооп берген курамы бар катуу жана суюк чөйрөлөрдү тандоо максатында үстүнкү бетте жана тереңдикте өстүрүү ыкмалары колдонулду.
3. Бөлүнүп алынган штаммдардын морфологиялык, физиологиялык жана биохимиялык касиеттери изилденди.
4. Изоляттар биохимиялык, молекулярдык жана биологиялык скринингтин негизинде мүнөздөлдү.
5. ПЦР анализи жүргүзүлдү. Он беш изоляттардын ичинен сегиз изолят cry гендерине туура келген копияларды камтыганы аныкталды.
6. Көпчүлүк штаммдарда cry2, cry4 жана cry3 гендери көп кездешкени аныкталды. Bacillus thuringiensis серотиби galleriae Cry3 гени менен, Bacillus thuringiensis серотиби partial 16S rRNA гени менен, Bacillus thuringiensis Gaoshi-116S Cry2 гени менен, Bacillus sp. B25 Lep2 гени менен, жана ошондой эле Bacillus thuringiensis coreanensis Cry4 гени менен, Bacillus thuringiensis kurstaki Cry4 жана Cry2 гендери менен жана Bacillus thuringiensis серотиби galleriae Cry3 гени менен идентификацияланды.
7. Лабораторялык шарттарда табигый штаммдардын энтомопатогендик *Arge pagana spp., Hyponomeuta malinella, Leptinotarsa decemlineata* каршы активдүүлүктөрү аныкталды. Натыйжада, 1П (Bacillus thuringiensis partial {Cry 2}), К-2, Bacillus thuringiensis kurstaki {Cry4 жана Cry2}) , Кж-1, Км-1 (Bacillus thuringiensis galleriae{Cry3}), Б-1 (Bacillus thuringiensis galleriae) жана 3П (Bacillus thuringiensis Gaoshi{Cry2}) штаммдары 100%-тик вирүлентүү болгону аныкталды.

КОЛДОНУЛГАН АДАБИЯТТАР

[1]. Bacillus thuringiensis ürünleri ve böceklerde dayanıldılığın önemİ. Celal TUNCER, Osman ECEVIT. Samsun : Turkish Journal of Entomology, 1994 г.

[2]. BACILLUS THURINGIENSIS GENERAL FACT SHEET. Center, National Pesticide Information. 2015.

[3]. Crickmore, Zenas George and Neil. Bacillus thuringiensis Applications in Agriculture. 2012.

[4]. Т.Доолоткельдиева. Энтомопатогенные кристаллофорные бактерии Кыргызстана и их значение.

[5]. United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. Microbial Pest Control Agent BACILLUS THURINGIENSIS. Geneva : World Health Organization 1999, 1999.

[6]. Perkins, Daniel R. Zeigler and John B. The Genus Bacillus. New York : б.н., 2009.

[7]. https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_thuringiensis. [В Интернете]

[8]. THE BIOCHEMISTRY OF THE PROTEIN CRYSTAL TOXIN OF BACILLUS THURINGIENSIS. t, P a u l G. F a s. Canada : б.н.

[9]. Peritrophic membrane contribution to Bt Cry δ-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. Johanna S. Reesa, *Paul Jarrettb, David J. Ellara. Wellesbourne : Journal of Invertebrate Pathology, 2009 г.

[10]. Thuringiensin: a toxin from Bacillus thuringiensis. Wiest S.L.F., Pilz Júnior H.L. , Fiuza L.M. Brazil : б.н., 2015 г.

[11]. Evaluation of Bacillus thuringiensis bioinsecticidal protein effects on soil microorganisms. L.H.P.L. Ferreira, J.C. Molina, C. Brasil & G. Andrade. б.м. : Plant and Soil , 2003 г.

[12]. Bt: Mode of Action and Use. Wingerd, Mark E. Whalon* and Byron A. б.м. : Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2003 г.

[13]. Bacillus thuringiensis as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. ROH, JONG YUL, JAE YOUNG CHOI, MING SHUN LI, BYUNG RAE JIN, AND YEON HO JE. Seoul : J. Microbiol. Biotechnol, 2007 г.

[14]. Isolation and characterization of native Bacillus thuringiensis isolates from Saudi Arabia. Talat A. El-kersh*, Yazeed A. Al-sheikh, Raid A. Al-akeel and Alaa A. Alsayed. б.м. : African Journal of Biotechnology , 2012 г.

[15]. Characterization and Biological Activity of Bacillus thuringiensis Isolates that Are Potentially Useful in Insect Pest Control. Loto, Analía Alvarez and Flavia del Valle. б.м. : Biodiversity Enrichment in a Diverse World, 2012 г.

[16]. Morphology of the immature stages of Arge pagana (Panzer, 1798)(Hymenoptera: Argidae) with notes on its biology. Ya-Guang Zhao, Bao-Zhen Hua. China : Journal of Asia-Pacific Entomology, 2016 г.

[17]. Arge xanthogaster (Hymenoptera: Argidae): A New Threat to Rose Plants in

Meghalaya. D. M. Flrake, G. T. Behere, P. D. Firake, D. J. Rajkhoa. India : Florida Entomological Society, 2013 г.
[18]. Bacillus thuringiensis A genomics and proteomics perspective. Mohamed A. Ibrahim, 1 Natalya Griko,1 Matthew Junker2 and Lee A. Bulla1,3,*. USA : б.н., 2010 г.
[19]. Людмила Прищепа, Антанина Станкявичене, Вилия Снешкене. Спектр активности Bacillus thuringiensis бактериальных препаратов против вредителей. Miestų želdynų formavimas. 2016 г.