

Т.И. Патыка<sup>1</sup>, В.Ф. Патыка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, тел.: (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д03680, Украина

## ТОКСИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭНТОМОПАТОГЕНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

*Проанализированы токсигенные свойства энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* с различным уровнем продуцирования энтомотоксинов (кристаллического δ-эндотоксина, термостабильного β-экзотоксина) с использованием тест-насекомых разных видов (*Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*). Показано, что восприимчивость различных таксонов (насекомых) к энтомопатогенным препаратам обусловлена составом их активных токсинов.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis*, энтомотоксины.

Группа энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* впервые была обнаружена Л. Пастером при изучении нозематоза тутового шелкопряда на юге Франции. Пастер назвал ее *Bacillus bombycis*, а кристаллы эндотоксина — «необыкновенными ядрами». Позднее в Японии С. Ишивата, изучая болезни тутового шелкопряда, несколько подробнее описал как саму болезнь, так и ее возбудителя — бактерию и практически заново открыл *B. thuringiensis* назвав ее *Bacillus sotto*. А в 1911 году эта группа бактерий получила современное название, после того как немецкий ученый Берлинер выделил в Тюрингии аналогичные микроорганизмы, тщательно изучил их и присвоил название *B. thuringiensis*.

В 1962 году эта бактерия получила таксономический статус и вошла в мировую номенклатуру как самостоятельный вид под названием *Bacillus thuringiensis* Berliner [1, 2, 3]. Ученые института Пастера в Париже Бонфуа и де Баржак (1962 г.) разработали схему внутривидовой идентификации разновидностей *B. thuringiensis*, которая базируется на определении структуры жгутикового антигена (серологическая диагностика) и дополняется физиолого-биохимическими характеристиками [4, 5]. О. Лысенко (1985 г.) приводит схему диагностики более 30 серовариантов *B. thuringiensis* по Н-антигену, на основании физиолого-биохимических свойств [2]. На специфичности Н-антигена базируются серодиагностика многообразия биовариантов *B. thuringiensis* [6]. Недавняя всесторонняя переклассификация инсектицидных генов *B. thuringiensis* была осуществлена Crickmore и др. [7]. Выделение и описание новых разновидностей энтомопатогенов во всем мире продолжается. На сегодня описано более 70 подвигов *B. thuringiensis*, эффективных против широкого спектра фитофагов из отрядов *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* и одновременно не токсичных для полезной энтомофауны, рыб, теплокровных животных и человека [2, 8].



Патогенное действие бактерии *B. thuringiensis* на насекомых связано с токсинами и другими метаболитами, которые она продуцирует. Токсины являются важными факторами патогенности, которые вырабатываются микроорганизмами и реализуют основные механизмы инфекционного процесса. Кристаллические белки ( $\delta$ -эндотоксины) рассматриваются как главные токсикологические компоненты биоинсектицидов на основе *B. thuringiensis*, хотя эти бактерии продуцируют еще и другие факторы активности относительно фитофагов (термостабильный водорастворимый  $\beta$ -экзотоксин нуклеотидной природы; фосфолипазы, ( $\alpha$ -экзотоксин,  $\gamma$ -экзотоксин); экзоферменты (лецитиназы, протеазы) и др. [2, 7-9]. Серологические варианты бактерий *B. thuringiensis* по-разному продуцируют перечисленные токсины, причем, их синтез зависит от многих факторов, включая условия культивирования бактерий. Способность продуцировать экзотоксин выявлена у штаммов разных серологических групп. Так, экзотоксиногенные культуры *B. thuringiensis*, относящиеся к серотипам: 1 — *var. thuringiensis*, 4 — *var. kenyae*, 8 — *var. tolworthi*, 9 — *var. morrisoni*, 10 — *var. darmstadiensis* и др., оказывают токсическое действие не только на чешуекрылых насекомых, но и на двукрылых и жесткокрылых. Таким образом, наличие термостабильного экзотоксина в культуре (или препарате в целом) расширяет спектр энтомоцидного действия бацилл группы *thuringiensis*.

Следует напомнить, что патогенность характеризуется специфичностью, т. е. способностью вызвать типичные для данного вида возбудителя патоморфологические и патофизиологические изменения в определенных тканях и органах при естественных для него способах заражения. Патогенность — видовое свойство микроорганизма, проявляющееся по отношению к организму определенного вида при обычных условиях их взаимного влияния друг на друга. Вирулентность же является свойством данного штамма возбудителя, обладающего различной степенью и формой изменчивости, в результате чего взаимоотношения микроорганизмов данного штамма и данной особи хозяина при данных факторах внешней среды не всегда дают одни и те же следствия. Таким образом, вирулентность одного и того же микроорганизма может проявляться по-разному, в зависимости от путей его проникновения в макроорганизм, условий взаимоотношения патогена и его хозяина и влияния различных факторов.

Цель работы состояла в изучении токсигенных характеристик разных серологических вариантов *B. thuringiensis*, проявляющих энтомоцидность к насекомым различных таксономических видов — комнатной мухе (*Musca domestica* L.), комару (*Aedes aegypti*), пчелиной огневке (*Galleria mellonella* L.), колорадскому жуку (*Leptinotarsa decemlineata* Say.).

### Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. thuringiensis*, выделенные из природных популяций больных и погибших насекомых разных эколого-географических регионов и отселектированные в ГНУ ВНИИСХМ экзотоксиногенные штаммы 1-го, 10-го серотипов *B. thuringiensis var. thuringiensis* H<sub>1</sub> и *B. thuringiensis var. darmstadiensis* H<sub>10</sub>; штамм 14-го серотипа — *B. thuringiensis var. israelensis* H<sub>14</sub>.

Для микроскопических исследований использован метод окраски мазка культур по В. А. Смирнову (с учетом споро- и кристаллообразования) [10]. Культивирование штаммов *B. thuringiensis* проводили глубинным методом в колбах Эрленмейера с жидкими питательными средами дрожже-полисахаридного состава на биотехноло-



гической качалке при температуре 28–30 °С, 220 об/мин., в течение 72 часов. Продуктивность культур оценивалась общепринятыми методами в микробиологии (с использованием серийных разведений культуральной жидкости с последующим высевом на МПА и подсчетом выросших колоний). Для оценки уровня биосинтеза термостабильного β-экзотоксина культуральную жидкость *B. thuringiensis* центрифугировали в режиме 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость, содержащую экзотоксин, стерилизовали (1 атм, 20 мин.). Бактериальные суспензии культур *B. thuringiensis*, а также стерильный центрифугат в соответствующих разведениях использовали для дальнейших исследований токсигенного потенциала *B. thuringiensis* на тест-насекомых по методикам ВНИИСХМ [2, 12, 13]. Биотестирование проводили на инсектарных линиях насекомых — комнатной мухе (*Musca domestica* L.), пчелиной огневке (*Galleria mellonella* L.), комаре (*Aedes aegypti*), а также на насекомых, собранных в природе — колорадском жуке (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), комаре (*Aedes aegypti*).

Значение  $LK_{50}$  для биотеста рассчитывается по таким же формулам, как и инсектицидность бактериальных культур (формула Кербера):

$$\lg LK = \lg C_m - \delta \times (\sum n \div n_0 - 0,5)$$

где  $C_m$  — максимальная апробируемая концентрация;

$\delta$  — логарифм отношения каждой предыдущей концентрации к последующей (логарифм кратности разведений);

$\sum n \div n_0$  — сумма отношений числа насекомых, которые погибли от данной концентрации, к общему числу насекомых, которые подверглись действию этой концентрации.

Инсектицидная активность комплекса спор и кристаллов рассчитывалась по формуле Франца:

$$M = 100 \times \left(1 - \frac{K_1}{K_2} \times \frac{P_2}{P_1}\right), \%$$

где:  $K_1$  — количество насекомых в контроле до обработки;

$K_2$  — количество насекомых в контроле после обработки;

$P_1$  — количество насекомых в опыте до обработки;

$P_2$  — количество насекомых в опыте после обработки.

### Результаты и их обсуждение

Насекомые из родов *Diptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* неодинаково чувствительны к β-экзотоксину *B. thuringiensis*. Наиболее восприимчивы личинки двукрылых (комнатная муха), личинки колорадского жука. В то же время мухи не восприимчивы к кристаллическому эндотоксину. Поэтому их гибель от биоагента *B. thuringiensis*  $H_1$  означает токсическое действие экзотоксина (табл. 1). Токсичность культуральной жидкости для насекомых разных систематических групп явилась основанием для дальнейших исследований комплекса полезных свойств *B. thuringiensis* в рамках производства экологически безопасных микробиопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей, как альтернатива инсектицидам химического синтеза.

Следует отметить, что конечный результат действия экзотоксина не может оцениваться исключительно по процентному показателю гибели личинок за определенный период. Поэтому в наших последующих исследованиях вели учет



гибели насекомых на других фазах развития в последующих поколениях, а также учитывали происходящие изменения, которые могут активизировать снижение численности насекомых.

Таблица 1

Энтомоцидное действие  $\beta$ -экзотоксина *B. thuringiensis*

Table 1

Entomocycle effect of  $\beta$ -exotoxin *B. thuringiensis*

Тест-объект	Разведение надосадочной культуральной жидкости (супернатанта)	% гибели насекомых	ЛК <sub>50</sub> , %
<i>Musca domestica</i> L.	Без разведения	100	0,83
	1:10	97	
	1:100	62	
<i>Galleria mellonella</i> L.	1:10	100	3,7
	1:100	70	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.	1:10	100	0,48
	1:100	80	

В многочисленных опытах отмечена сильная степень ингибирования питания личинок колорадского жука ( $L_2$ ) при обработке листьев картофеля жидкой формой препарата *B. thuringiensis*  $H_1$  в 0,5 %. Антифидантный эффект на имаго жука возможен при обработке кормовых растений биопрепаратом или экзотоксином (по отдельности) в более высоких концентрациях (до 2 %).

Чувствительность насекомых к экзотоксину в большей мере зависит от способа введения его в организм. При пероральном введении экзотоксин значительно менее токсичен, чем при парентеральных инъекциях. Действие экзотоксина, введенного в организм *per os*, носит характер хронической интоксикации насекомого. Отчетливого периода ухудшения состояния насекомого сразу после инфицирования при этом не наблюдается (табл. 2).

Таблица 2

Воздействие  $\beta$ -экзотоксина на вес личинок колорадского жука при инфицировании их во втором возрасте

Table 2

 $\beta$ -exotoxin influence on weight of potato beetle larvae at infecting them at the second age

Концентрация $\beta$ -экзотоксина, %	Вес 10 личинок на 7 сутки опыта, мг	Снижение веса, %
0,1	799	37
1,0	412	68
10,0	224	82
контроль	1273	0

Личинки после интоксикации питаются менее активно, отстают в росте и весовых показателях. Установлено, что воздействие экзотоксина происходит, прежде всего, на развивающиеся клетки в период метаморфоза, поэтому отмечается возрастная восприимчивость насекомых и специфическое действие экзотоксина *B. thuringiensis*.



Однако  $\beta$ -экзотоксин действует медленнее кристаллического  $\delta$ -эндотоксина. В споро-кристаллическом комплексе  $\beta$ -экзотоксин действует как синергист, т. е. после разрушения  $\delta$ -эндотоксином стенки кишечника насекомого он активно и быстро проникает в гемолимфу и органы хозяина, вызывая таким образом разноплановые физиологические изменения и летальный эффект. Следовательно, одновременное введение экзо- и эндотоксинов способствует возрастающему энтомоцидному эффекту *B. thuringiensis*.

Из серии опытов, выполненных с яйцекладками различных видов насекомых, установлено, что продуцируемый *B. thuringiensis*  $H_1$ , *B. thuringiensis*  $H_{10}$  экзотоксин обладает овицидным действием (гибель эмбрионов). Яйца пчелиной огневки при этом погибали на 27,8 %, комнатной мухи — 50 %, колорадского жука — 100 %, в зависимости от концентрации экзотоксина. Выявлено, что для каждого вида существуют определенные периоды, когда яйцо более чувствительно или более резистентно к воздействию экзотоксина. Обработка отложенных яиц насекомых экзотоксином оказалась фатальной и для личинок, отродившихся из обработанных яиц. При обработке яиц 1 % суспензией *B. thuringiensis*  $H_1$  без экзотоксина незначительная (30 %) гибель тест-насекомого происходит в постэмбриональный период развития, тогда как от 1 % *B. thuringiensis*  $H_1$  с экзотоксином погибает 4,6 % яиц и все вылупившиеся личинки, что, в общем, составляет 100 %. Так, личинки колорадского жука, пережившие интоксикацию в фазе яйца, погибают в большинстве случаев в течение 10 суток, после отрождения. Гибель отрождающихся личинок происходит, с одной стороны, в результате интоксикации эмбриона, с другой — при заражении их в момент прогрызания хориона.

В плане патологического эффекта действия на насекомых важно, что продуцируемый *B. thuringiensis* экзотоксин может действовать не только при заражении перорально, но и контактно, то есть через покровы насекомых, а в комбинации со споро-кристаллическим комплексом он является синергистом. Это, в свою очередь, расширяет сферу применения экзотоксинсодержащих препаратов на основе *B. thuringiensis*. Их используют для снижения численности чешуекрылых насекомых, а также представителей отрядов *Coleoptera*, *Diptera*.

Оценка биологического потенциала *B. thuringiensis*  $H_1$  и *B. thuringiensis*  $H_{10}$  в полевых условиях показала в среднем практически одинаковую активность в отношении личинок колорадского жука на картофеле — до 90 % (табл. 3).

Таблица 3  
Фитозащитное действие *B. thuringiensis*  $H_1$  и *B. thuringiensis*  $H_{10}$   
Table 3  
Phytoprotective effect of *B. thuringiensis*  $H_1$  and *B. thuringiensis*  $H_{10}$

Вариант опыта	Норма расхода препарата, кг/га	Количество живых личинок на учетных растениях, экз.			Биологическая эффективность, %	
		до обработки	3-й день	10-й день	3-й день	10-й день
<i>B. thuringiensis</i> H1 (Битоксибациллин)	2,0	462	357	46	16,2	91,1
<i>B. thuringiensis</i> H10 (Бацикол)	2,0	524	225	38	57,1	92,8
Контроль (без обработки)	-	389	480	517	увеличение численности	



Главной отличительной особенностью энтомопатогена *B. thuringiensis*  $H_{10}$  по сравнению с другими вариантами *B. thuringiensis* является его селективное действие в отношении опасных жесткокрылых насекомых-фитофагов, включая имаго [11].

Пораженные энтомотоксинами *B. thuringiensis* насекомые в значительной мере утрачивают вредоносность и способность к размножению. При этом важно, что снижение их вредоносности может сказываться еще до заметного снижения уровня численности популяции насекомого. Применение биоинсектицидов на основе *B. thuringiensis* против насекомых-вредителей целесообразно соотносить с популяционным составом.

*B. thuringiensis*  $H_{14}$  со свойствами ларвицидного действия на двукрылых насекомых явился фактором, который катализирует преимущественную разработку бактериальных ларвицидов для использования их в водной среде, непосредственно в местах вылода комаров и мошек. Уникальность действия бактерий подвида *israelensis* на личинок двукрылых насекомых связана исключительно с особенностями их кристаллического эндотоксина. Эндотоксин, который содержится в оболочке спор и вегетативных клеток, вызывает у личинок комаров деструктивные изменения клеточной стенки кишечника, особенно его среднего отдела. Ларвицидная активность штамма *B. thuringiensis*  $H_{14}$  при титре до 3,0 млрд спор /мл культуральной жидкости по показателю ЛК<sub>50</sub> при свободном поглощении личинками спор и кристаллического эндотоксина из водной суспензии препарата в лабораторных исследованиях составила  $0,126 \times 10^{-3}$  %, что свидетельствует о высокой функциональности патогена для личинок комара *Aedes* 4 возраста (табл.4). В каждом варианте опыта по 25 личинок, 3-х кратная повторность, в контроле — стерильная вода.

Таблица 4

Ларвицидная активность *B. thuringiensis*  $H_{14}$  при инфицировании личинок ( $L_4$ ) *Aedes aegypti*

Table 4

Larvicidal activity of *B. thuringiensis*  $H_{14}$  at infecting of population *Aedes aegypti* ( $L_4$ ) by the sublethal dose

Доза (концентрация) патогена, мг/л	Титр спор, млрд/мл КЖ	Гибель личинок через 24 часа, %	ЛК <sub>50</sub> , % культуральной жидкости ( $\times 10^{-3}$ )
0,5	2,90	100	0,126
0,25	2,90	94,0	0,126
0,125	2,90	44,0	0,126
0,06	2,90	14,0	0,126

В отличие от фитозащитных препаратов на основе *B. thuringiensis*, технология применения ларвицидных биопрепаратов требует особых подходов. Целесообразно проводить учет многих факторов и обстоятельств, таких как характеристика биотопов — водоемов, их площадь, подлежащая обработке и глубина, температура воды. Кроме того, необходимо учитывать особенности водоснабжения, проточность, степень зарастания и органосолевые показатели. Обязательным и естественным фактором при этом остается видовой состав и возрастная структура популяции кровососущих комаров.



Наличие в препаратах *B. thuringiensis* основных энтомоцидных компонентов (спор, кристаллического  $\delta$ -эндотоксина и термостабильного  $\beta$ -экзотоксина) не только усиливает энтомоцидный эффект, но, что очень важно, расширяет спектр их действия, предопределяет видовой состав восприимчивых к этим препаратам вредоносных насекомых. Но не следует забывать, что эффективность использования биопрепаратов *B. thuringiensis* зависит не только от их качественных и функциональных показателей, но и от технологий применения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. (Болезни насекомых) /Под ред. Гилярова М. С. — М.: Колос, 1972. — 640 с.
2. Кандыбин Н. В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика. — М.: Агропромиздат, 1989. — 172 с.
3. Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами /Под ред. М. С. Гилярова. — М.: Колос, 1976. — 583 с.
4. de Barjac, H. and Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et serrologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis* //Entomophaga. — 1962. — 7. —P. 5–31.
5. de Barjac, H. and Bonnefoi, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis berliner* with a key to their differentiation //Journal of Invertebrate Pathology. — 1968. — 11. —P. 335–347.
6. M. M. Lecadet, E. Frachon, V. Cosmao Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thierry. Uniter des Bacter ies Entomopathogè'nes, Institut Pasteur, Paris, France. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis* //Journal of Applied Microbiology. — 1999. — 86. —P. 660–672.
7. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins //Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 1998. — 62. —P. 807.
8. Патыка В. Ф., Патыка Т. И. Экология *Bacillus thuringiensis*. — К.: изд-во ПГАА, 2007. — 216 с.
9. Добрица А. П., Корецкая Н. Г., Гайтан В. И., Коломбет Л. В., Дербышев В. В., Жиглецова С. К. Разработка биопестицидов против колорадского жука //Российский химический журнал (ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 2001, т. XLV, № 5,6. — С. 174-184.
10. Smirnofj W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* //Insect. Pathol. — 1962. — P. 384-386.
11. Кандыбин Н. В., Смирнов О. В. Микробиологизация — альтернатива химизации при получении экологически чистой продукции. Производство экологически безопасной продукции растениеводства. Региональные рекомендации (под ред. Соколова М. С., Угрюмова Е. П.). — Вып. 1. — Пущино, 1995. — С. 66-72.
12. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей. — М., 1984. — 27 с.
13. Лескова А. Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств. — Л., 1984. — С. 17-19.



**Т.І. ПАТИКА<sup>1</sup>, В.П. ПАТИКА<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкін, шосе Подбельського, 3, тел. (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

## **ТОКСИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЕНТОМОПАТОГЕНІВ *BACILLUS THURINGIENSIS***

### **Реферат**

Проаналізовано токсигенні властивості ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* з різним рівнем продукування ентомотоксинів (кристалічного  $\delta$ -ендотоксину, термостабільного  $\beta$ -екзотоксину) з використанням тест-комах різних видів (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera). Показано, що чутливість різних таксонів комах до ентомопатогенних препаратів обумовлена природою, складом та структурою токсинів.

**К л ю ч о в і с л о в а:** ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis*, ентомотоксини.

**Т.І. ПАТЮКА<sup>1</sup>, V.F. ПАТЮКА<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology  
Russian Academy of Agricultural Sciences,  
196608, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Podbelsky str., 3,  
тел. (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, Zabolotny str., 154,  
Kyiv of DSP, D03680, Ukraine

## **THE TOXIGENE PROPERTIES OF ENTOMOPATHOGENIC *BACILLUS THURINGIENSIS***

### **Summary**

There were analysed the toxigen properties of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* with various level of formation entomotoxins (crystal  $\delta$ -endotoxin, thermostable  $\beta$ -exotoxin) with use of test insects of different species (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera). It is shown that the susceptibility of various taxons of the insects to entomopathogenic preparations is caused by the structure of their active toxins.

**К e y w o r d s:** entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*, entomotoxins.

