

статистической обработки результатов исследований). – 5-е изд, доп. и перераб / Б. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

УДК 632.937

© 2009

Т. И. ПАТЫКА

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН

В. Ф. ПАТЫКА

Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины

ТОКСИГЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS* *THURINGIENSIS*

*Проанализированы токсигенные особенности 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 действующие энтомотоксичные метаболиты препаратов на основе *Bt* предопределяют видовой состав восприимчивых насекомых-вредителей.*

*Ключевые слова: энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis*, энтомотоксины.*

Группа энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) 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 *Bt*, 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 *Bacillus thuringiensis*. В 1962 году эта бактерия получила таксономический статус и вошла в мировую номенклатура как самостоятельный вид под названием *Bacillus thuringiensis* Berliner [1, 2, 3]. Ученые института Пастера в Париже Бонфуа и де Баржак разработали схему внутривидовой идентификации разновидностей Bt, которая базируется на определении структуры жгутикового антигена (серологическая диагностика) и дополняется физиолого-биохимическими характеристиками [4, 5]. На основании физиолого-биохимических свойств О. Lysenko приводит схему диагностики более 30 серовариантов Bt по H-антигену [2]. На специфичности H-антигена базируются серодиагностика многообразия биовариантов Bt [6, 7]. Выделение и описание новых разновидностей энтомопатогенов во всем мире продолжается. Известно более 70 разновидностей Bt, 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 Bt 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 (δ -эндотоксины) рассматриваются как главные токсикологические компоненты биоинсектицидов на основе Bt, хотя эти бактерии продуцируют еще и другие факторы активности относительно фитофагов (термостабильный водорастворимый β – экзотоксин нуклеотидной природы; фосфолипазы, (α -экзотоксин, γ -экзотоксин); экзоферменты (лецитиназы, протеазы) и др. [2, 7-9]. Серологические варианты бактерий Bt 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 Bt, 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 двукрылых, 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 *Vt*, проявляющих энтомоцидность к насекомым различных таксономических видов – комару (*Aedes aegypti*), колорадскому жуку (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), комнатной мухе (*Musca domestica* L.) как тест-объекту на экзотоксиногенность.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *Vt*, выделенные из природных популяций больных и погибших насекомых разных эколого-географических регионов и отселектированные в ГНУ ВНИИСХМ: экзотоксиногенные штаммы 1-го, 10-го серотипов - *Vt* var. *thuringiensis* (*Vt*H1) и *Vt* var. *darmstadiensis* (*Vt*H10); штамм 14-го серотипа - *Vt* var. *israelensis* (*Vt*H14).

Для микроскопических исследований использован метод окраски мазка культур по В.А. Смирнову (с учетом споро- и кристаллообразования) [10]. Культивирование штаммов *Vt* проводили глубинным методом в колбах Эрленмейера с жидкими питательными средами дрожже-полисахаридного состава на биотехнологической качалке при температуре 28-30°C, 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 *Vt* центрифугировали в режиме 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость, содержащую экзотоксин, стерилизовали (1атм, 20 мин.). Бактериальные суспензии культур *Vt*, а также стерильный центрифугат в соответствующих разведениях использовали для дальнейших исследований токсигенного потенциала *Vt*

на тест-насекомых по методикам ВНИИСХМ [2, 12, 13]. Биотестирование проводили на инсектарных линиях насекомых - комнатной мухе (*Musca domestica* L.), комаре (*Aedes aegypti*), а также на насекомых, собранных в природе - колорадском жуке (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), комаре (*Aedes aegypti*).

Значение ЛК₅₀ для биотеста рассчитывали по формулам, используемым для определения инсектицидности бактериальных культур (формула Кербера):

$$\lg \hat{E} = \lg \times \tilde{N}_i - \delta \times \left(\sum n \div n_0 - 0 \right)$$

C_m - максимальная апробируемая концентрация;

o - 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 спорокристаллического комплекса

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

где K₁ - количество насекомых в контроле до обработки;

K₂ - количество насекомых в контроле после обработки;

P₁ - количество насекомых в опыте до обработки;

P₂ - количество насекомых в опыте после обработки.

Результаты и обсуждение. Насекомые из родов Diptera, Lepidoptera, Coleoptera неодинаково чувствительны к действию β-ε-экзотоксина Vt. Наиболее восприимчивы личинки двукрылых (комнатная муха), личинки колорадского жука. В то же время мухи не восприимчивы к кристаллическому эндотоксину. Поэтому их гибель от биоагента VtH1 означает токсическое действие экзотоксина (табл.1). Токсичность культуральной жидкости для насекомых разных систематических групп явилась основанием для дальнейших исследований комплекса

полезных свойств Вt в рамках производства экологически безопасных микробиопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей, как альтернатив инсектицидов химического синтеза.

1. Энтомоцидное действие β

Вt экзотоксина

Биотест	Разведение надосадочной культуральной жидкости (супернатанта)	% гибели насекомых	ЛК50, %
Musca domestica L.	Без разведения	100	0,83
	1:10	97	
	1:100	62	
Leptinotarsa decemlineata Say.	1:10	100	0,48
	1:100	80	

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.

В полевых опытах отмечена сильная степень ингибирования питания личинок колорадского жука (L_2) при обработке листьев картофеля жидкой формой препарата ВtН₁ в 0,5%. Антифидантный эффект на имаго жука возможен при обработке кормовых растений биопрепаратом или экзотоксином (по отдельности) в более высоких концентрациях (до 2%).

Следует отметить, что чувствительность насекомых к экзотоксину в большей мере зависит от способа введения его в организм. При пероральном введении экзотоксин значительно менее токсичен, чем при парэнтеральных 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).

2. Воздействие β -экзотоксина на вес личинок колорадского жука при инфицировании их во втором возрасте

Концентрация β -экзотоксина, %	Вес 10 личинок на 7 сутки опыта, мг	Снижение веса, %
0,1	799	37,0
1,0	412	68,0
10,0	224	82,0
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 Vt. Однако β экзотоксин действует медленнее кристаллического δ эндотоксина. В споро-кристаллическом комплексе β -экзотоксин действует как синергист, т.е. после разрушения δ -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 Vt.

Из серии опытов, выполненных с яйцекладками различных видов насекомых, установлено, что продуцируемый VtH₁, VtH₁₀ 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 VtH₁ без экзотоксина незначительная (30%) гибель тест-насекомого происходит в постэмбриональный период развития, тогда как от 1% VtH₁ 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 Vt экзотоксин может действовать не только при заражении перорально, но и контактно, то есть через покровы насекомых, а в комбинации со спорокристаллическим комплексом он является синергистом. Это, в свою очередь, расширяет сферу применения экзотоксинсодержащих препаратов на основе Vt. Их используют для снижения численности чешуекрылых насекомых, а также представителей отрядов Coleoptera, Diptera.

Оценка биологического потенциала VtH₁ и VtH₁₀ в полевых условиях показала в среднем практически одинаковую активность в отношении личинок колорадского жука на картофеле – до 90,0% (табл. 3).

3. Влияние препаратов на основе VtH₁ и VtH₁₀ на личинок *Leptinotarsa decemlineata* Say.

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
VtH ₁ (Битоксибациллин)	2,0	462	357	46	40,7	97,0
VtH ₁₀ (Бацикол)	2,0	524	225	38	57,1	95,8
Контроль (без обработки)	-	389	480	517	увеличение численности	

Отличительной особенностью энтомопатогена VtH₁₀ по сравнению с другими вариантами Vt является его селективное действие в отношении вредоносных жесткокрылых насекомых, включая имаго [11]. Пораженные энтомотоксинами Vt 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 Vt против насекомых-вредителей целесообразно соотносить с популяционным составом.

VtH₁₄ со свойствами ларвицидного действия на двукрылых насекомых явилось фактором, катализировавшим преимущественную

разработку бактериальных ларвицидов для использования их в водной среде, непосредственно в местах выплода 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 VtH_{14} при титре до 3,5 млрд спор /мл культуральной жидкости по показателю LK_{50} при свободном поглощении личинками спор и кристаллического эндотоксина из водной суспензии препарата в лабораторных исследованиях составила $0,13 \times 10^{-3}\%$, что свидетельствует о высокой функциональности патогена для личинок комара *Aedes* 4 возраста (табл.4).

4. Ларвицидная активность VtH_{14} при инфицировании популяции *Aedes aegypti* (L.) сублетальной дозой

Доза патогена (концентрация), мг/л	Титр спор, млрд/мл КЖ	% гибели через 24 часа	LK_{50} , % культуральной жидкости ($\times 10^{-3}$)
0,5	3,5	100	0,13
0,25		94,0	
0,125		44,0	
0,06		14,0	

Примечание: В каждом варианте опыта по 25 личинок, контроль – стерильная вода.

В отличие от фитозащитных препаратов на основе *Vt*, 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 *Vt* основных энтомоцидных компонентов (спор, кристаллического δ -эндотоксина и термостабильного β -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 Вt зависит не только от их качественных и функциональных показателей, но и от технологий применения.

Библиографический список

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 sérologique 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. Thie'ry. Unite' des Bacte'ries Entomopathoge'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. Smirnoff 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. – Пушино, 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 *V. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств. – Л., 1984. – С. 17-19.