

УДК 632.937

ЭНТОМОЦИДНАЯ И ЛАРВИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ *BACILLUS THURINGIENSIS*

¹Патыка Т.И., ¹Патыка Н.В., ²Патыка В.Ф.

Ентомоцидна та ларвицидна активність *Bacillus thuringiensis*.-Патыка М. І., Патыка Н.В., Патыка В.Ф.- Розглядаються питання відносно вивчення ентомоцидної (ентомотоксичної), ларвицидної активності різних біоваріантів (серотипів) *Bacillus thuringiensis* (BtH1, BtH10, BtH14), які відрізняються специфічністю дії відносно широкого кола господарів-шкідників і високим потенціалом активності для створення біоінсектицидів як надійних контролюючих засобів чисельності цільових об'єктів. Встановлена висока біологічна активність штамів *Bt ssp.* Так, ентомоцидність BtH1, BtH10 для L1-2 *Leptinotarsa decemlineata* Say. – 0,19% КР; екзотоксигенність - 2,5-2,8 мкл/г корма для L2 *Musca domestica*. Ларвицидна активність BtH14 у межах 0,15x10-3% КР для L4 *Aedes aegypti*. Відмічена чутливість комах за віком щодо дії ентомотоксинів *Bt*.

Адреса: 1-Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, 196608, Росія, Санкт-Петербург, Пушкін, ш. Подбельського, 3, e-mail: patykatatyana@mail.ru
2-Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

Entomocycle and larvicidal activity *Bacillus thuringiensis*.-Patyka T.I., Patyka N.V., Patyka V.F.-Questions concerning studying entomocycle (entomotoxic), larvicidal activity of various biovariants (serotypes) *Bacillus thuringiensis* (BtH1, BtH10, BtH14), differing among themselves by specificity, multilateral action concerning a wide range of hosts-insects and the raised potential of activity for creation bioinsecticides as reliable supervising means of number of target objects are considered. High biological activity strains *Bt ssp.* is established. So, entomocycle BtH1, BtH10 for L1-2 *Leptinotarsa decemlineata* Say. - 0,19 % CB; and the maintenance exotoxin - 2,5-2,8 mkl/g a forage for L2 *Musca domestica*. Larvicidal activity BtH14 in limits 0,15x10-3 % CB for L4 *Aedes aegypti*. The age susceptibility of insects to action entomotoxins *Bt* is noted.

Address: All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology Russian Academy of Agricultural Sciences, 196608, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Podbelsky Chossee, 3, e-mail: patykatatyana@mail.ru

В настоящее время накоплен достаточно большой опыт эффективного использования энтомопатогенов *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) с различным механизмом действия для контроля численности разных групп насекомых. Споро-кристаллический комплекс *Bt* и фитозащитные биопрепараты на их основе определяют видовой состав восприимчивых вредоносных насекомых. Для микробиологического контроля вредоносных насекомых в агроценозах наиболее широко и успешно используются препараты на основе трех патовариантов *Bt*:

Патовар *A* - подвиды *Bt*, кристаллы эндотоксинов которых с наибольшей активностью влияют на чешуекрылых (*Lepidoptera*). Продукты таких биопрепаратов как битоксибациллин, (*Bt ssp. thuringiensis*), дендробациллин (*Bt ssp. dendrolimus*),

энтобактерин (*Bt ssp. galleriae*), лепидоцид, дипел (*Bt ssp. kurstaki*) и ряд других. Спектр чувствительных насекомых к этому патоварианту насчитывает свыше 68 видов;

Патовар *B* - подвиды *Bt* (*Bt ssp. israelensis*), которые поражают личинок кровососущих комаров и мошек, а также растительноядных комаров (рисового, шампиньонного и др.). Продукты ларвицидных биопрепаратов бактокулицид, бактицид (Россия), бактимос (Франция), текнар (Швейцария), вектобак (США) и др.;

Патовар *C* - подвиды *Bt* (*Bt ssp. tenebrionis*, *Bt ssp. darmstadiensis*), которые активно влияют на жуков (*Coleoptera*). Продукты биопрепаратов децимид, колорадо, бацикол (Россия), новодор (Дания) и др.

Принадлежность к тому или иному патовару по энтомоцидному действию обусловлена комплексом практически ценных свойств *Bt* (продуктивностью, уровнем токсинообразования и др.), определяющих их перспективность для защиты растений, животных и человека от вредных агентов.

Цель работы состояла в изучении биологических особенностей разновидностей энтомопатогенных бактерий *BtH1* – *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis*, *BtH10* – *Bac. thuringiensis* var. *darmstadiensis*, *BtH14* – *Bac. thuringiensis* var. *israelensis*, определяющих степень патогенности (энтомоцидность, ларвицидную активность) для насекомых р. *Diptera*, *Coleoptera*.

Материалы и методы.

В работе использовали разновидности штаммов энтомопатогенных бактерий *Bt*, выделенные из природных популяций насекомых разных эколого-географических регионов и отселектированные в ГНУ ВНИИСХМ: экзотоксиногенные штаммы *Bt* var. *thuringiensis* (*BtH1*) и *Bt* var. *darmstadiensis* (*BtH10*); штаммы *Bt* var. *israelensis* (*BtH14*). В качестве инфекционного материала (патогена) использовали:

бактериальные суспензии соответствующих разведений культур *Bt*, выращенных на жидких питательных средах при оптимальных режимах культивирования (включая препаративные формы);

бактериальные суспензии соответствующих разведений биомассы споро-кристаллического комплекса *Bt*, выделенной из культуральной

жидкости 4-5-кратным центрифугированием в режиме 8000 об/мин., в течение 15 минут;

бактериальные суспензии соответствующих разведений надосадочной жидкости (стерильного центрифугата) *Bt*.

Микроскопический анализ культур с учетом образования кристаллов δ -эндотоксина и спор проводили по методу В.А. Смирнова [9].

Оценка продуктивности культур при культивировании их глубинным методом в качестве показателя технологичности штаммов проводилась методом серийных разведений культуральной жидкости (КЖ) с последующим высевом на МПА и подсчетом выросших колоний [7].

В качестве модельных биотестов использовали насекомых природных и инсектарных популяций:

личинок комнатной мухи (*Musca domestica* L.) для *BtH1* и *BtH10*, как специализированный тест на экзотоксиногенность, определение термостабильного β -экзотоксина;

личинок младших возрастов колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), для *BtH1* и *BtH10*, как тест на энтомоцидную активность;

личинок комаров *Aedes aegypti* разных возрастов для *BtH14* в качестве тест-объекта по международному стандарту Института Пастера для определения ларвицидной активности.

Инфицирование тест-насекомых указанными суспензиями *Bt* определенного титра проводили методом *per os* в разных концентрациях, включая сублетальные. Количество личинок в каждом варианте опыта – 25; повторность 3-х кратная. Контроль – стерильная вода и (или) стерильная питательная среда.

Схема опытов:

энтомоцидная активность ВН1 и ВtН10	
биотест	Разведение - 1:2 (0,05 мл/1 г корма); 1:4 (0,025 мл/1 г корма); 1:8 (0,0125 мл/1 г корма); Учет: на 3, 5, 10, 15 сутки.
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say., L1-2	
экзотоксинообразование ВН1 и ВtН10	
<i>Musca domestica</i> , L2	Разведение - 1:4 (0,025 мл/1 г корма); 1:8 (0,0125 мл/1 г корма); 1:16 (0,00625 мл/1 г корма); 1:32 (0,00312 мл/1 г корма); Учет: на 5 сутки (кол-во пупариев); на 9 сутки (кол-во вылет. мух).
ларвицидная активность ВtН14	
<i>Aedes aegypti</i> , L 4	Доза патогена - 0,25 мг/л; 0,125 мг/л; 0,06 мг/л; Учет: на 1-3 сутки

В целях выявления степени патогенности *Bt* (энтомоцидной и ларвицидной активности), количественного определения показателей

летальных концентраций ЛК50 (доз, вызывающих гибель 50% пораженных объектов), уровня биосинтеза β - экзотоксина - применяли методы,

принятые в микробиологии, патологии членистоногих и в соответствии с методическими рекомендациями, указаниями ВНИИСХМ, ВОЗ [2-6, 8].

Результаты и их обсуждение.

Широкий диапазон восприимчивых групп и видов насекомых к *BtH1* (чешуекрылые, некоторые двукрылые, перепончатокрылые, жуки) объясняется присутствием в препаратах не только споро-кристаллического комплекса, но и небольшого количества экзотоксина. Поэтому энтомотоксичность *Bt* для насекомых разных систематических групп является основанием для детального исследования образования экзотоксина штаммами, механизмов его действия на насекомых и основанием для разработок биопрепаратов, содержащих кроме спор, два токсичных для насекомых компонента - кристаллический δ -эндотоксин и термостабильный β -экзотоксин.

Исследования по оценке энтомоцидной и ларвицидной активности штаммов *Bt* на биотестах показали (табл. 1), что при стабильных титрах спор и кристаллов 3-3,6 млрд/мл культуральной жидкости и их оптимальном соотношении (1:1) количественные показатели ЛК50 для тест-насекомых не превышали общепринятых стандартных показателей, и обладали более высокой активностью, т.е. меньшими показателями летальных концентраций (ЛК50 для L4 *Aedes aegypti* не должна превышать показателя 1,5±0,3 мкл/л воды; ЛК50 для *Musca domestica* не более 3,5 мкл/г корма; ЛК50 для *Leptinotarsa decemlineata* не должна превышать 0,35%).

Для комаров *Aedes* ларвицидность *BtH14* составила 0,13-0,15х10⁻³%, экзотоксиногенность штаммов 1 и 10 серотипов на уровне 2,5-2,8 мкл/г корма и их энтомоцидность в пределах 0,19%, что свидетельствует о высокой активности и функциональности штаммов, продуцирующих энтомотоксины.

Таблица 1. Биологическая характеристика энтомопатогенов *Bt*.

Штамм	Титр спор, млрд/мл	Энтомоцидная активность (по ЛК ₅₀ для L ₁₋₂ <i>Leptinotarsa decemlineata</i>), % КЖ	Содержание β -экзотоксина (по ЛК ₅₀ для <i>Musca domestica</i>), мкл/г корма	Ларвицидная активность (по ЛК ₅₀ для L ₄ <i>Aedes aegypti</i>) через 24 часа, % КЖ x 10 ⁻³
<i>BtH₁</i>	3,0	0,18	2,50	-
<i>BtH₁₀</i>	3,5	0,19	2,75	-
<i>BtH₁₄</i>	3,6	-	-	0,124 - 0,146

Наиболее чувствительными к экзотоксину являются личинки комнатной мухи. В то же время они не восприимчивы к кристаллическому эндотоксину. Поэтому гибель мух от биоагента *BtH1* означает токсическое действие β -экзотоксина.

Следует отметить, что механизм действия экзотоксинсодержащих препаратов на основе *Bt* на насекомых иной, чем препаратов с кристаллическим эндотоксином, т.е. первые проявляют свою активность медленнее и, как известно, экзотоксин усиливает энтомоцидность и расширяет спектр действия фитооцидных препаратов. Характер интоксикации организма насекомого экзотоксином свидетельствует, что при заглатывании его целостность эпителия средней кишки не нарушается и токсин остается в организме длительное время. Та часть токсина, которая включалась в физиологические процессы,

не выводится из организма, оказывая влияние в первую очередь на метаморфоз и последующие фазы развития насекомого. Экзотоксин способен ингибировать питание насекомых, но с меньшей интенсивностью.

Уникальные ларвицидные свойства *BtH14* демонстрируют широкий диапазон возможностей в защитных мероприятиях против кровососущих комаров и мошек. Однако уникальность действия бактерий подвида *israelensis* на личинок двукрылых насекомых связана исключительно с особенностями их кристаллического δ - эндотоксина (*BtH14* не продуцирует экзотоксин). Личинки *Aedes* являются более чувствительными к биоагенту *BtH14*, чем ранее исследуемые нами личинки комара из рода *Anopheles*. При этом, как и в других случаях, личинки младших возрастов чувствительнее личинок старших возрастов (табл. 2).

Таблица 2. Активность *BtH14* - продуцента бактоулициды (ВНИИСХМ) для личинок комаров разных возрастов

Вид комаров	ЛК50 мкл/л воды			
	L1	L2	L3	L4
<i>Aedes aegypti</i> (инсектарная популяция)	0,59	0,75	0,90	1,35
<i>Aedes ssp.</i> (природная популяция)	0,71	0,98	1,19	1,68

Под влиянием *BtH14* у личинок комаров проявляются явные признаки токсикоза: их тело становится стекловидным с хорошо заметной ригидностью. Пораженные личинки не реагируют на прикосновение, скапливаются группами и затем опускаются на дно. При полном отсутствии подвижности личинки некоторое время остаются живыми. При различных колебаниях температурного режима воды ларвицидная активность *BtH14* остается на высоком уровне.

Главной отличительной особенностью энтомопатогена *BtH10* по сравнению с аналогичными биопрепаратами *Bt* является его селективное действие в отношении опасных

жесткокрылых насекомых-фитофагов, в частности личинок колорадского жука (табл. 3).

Препараты на основе *BtH10*, подобно биоагентам *BtH1* - продуцентам битоксибациллина /БТБ/, обладают антифидантным эффектом [1, 3], надо полагать, что наличие в препарате экзотоксина, сходного с таковым у *BtH1* (по действию на мух), должно вызывать разносторонние эффекты, свойственные подобным продуцентам фитозащитных препаратов, например, метатоксический, складывающийся из физиологического, таратогенного и дерепродукционного действий и другие.

Таблица 3. Энтомоцидность *BtH10* - продуцента бацикола (ВНИИСХМ) для L1-3 возрастов колорадского жука (лабораторный опыт)

Вариант опыта	Концентр. суспензии, %	L1		L2		L3	
		гибель на 7-е сутки, %	LK50, %	гибель на 7-е сутки, %	LK50, %	гибель на 7-е сутки, %	LK50, %
<i>BtH10</i> , с.п., 40 млрд спор/г	0,02	86,0	0,01	75,0	0,0135	60,0	0,02
	0,1	100		100		92,0	
	0,5	100		100		100	
<i>BtH10</i> , паста, 38 млрд спор/г	0,02	64,0	0,023	48,0	0,031	38,0	0,048
	0,1	78,0		73,0		62,0	
	0,5	100		100		98,0	
Контроль (без обработки)	-	2,1	-	2,0	-	0	-

В спорокристаллическом 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 *Bt*. Комбинация разных протоксинов *Bt* может существенно влиять на активность их взаимодействия в организме насекомого, предотвращая непродуктивное связывание или

наоборот, проявляя синергизм действия. Однако эффективность использования биопрепаратов как средств защиты растений, животных и человека от насекомых-вредителей зависит не только от их качественных и функциональных биологических показателей, но и от технологий применения в конкретных эколого-географических регионах, поскольку частота и интенсивность массового развития вредителей сильно варьируют по регионам, зонам, местностям из-за многообразия почвенно-климатических, погодных, технологических и других условий, т.е. разной

степенью соответствия в системе «растение-хозяин-паразит-среда».

Таким образом, изучение биологического потенциала природных метаболитов, энтомопатогенов *Bt*, как продуцентов биологически активных веществ, позволяет создавать серии высокоэффективных препаратов данного типа и разрабатывать технологические приемы их производства и применения в агробиоценозах для контроля численности насекомых-вредителей (как альтернатив инсектицидов химического син-

теза). Специфическое влияние *Bt* на насекомых-вредителей, малая вероятность возникновения резистентных форм вредителей из-за комплекса активных энтомоцидных и ларвицидных компонентов штаммов-продуцентов, экологическая приоритетность свидетельствуют о высокой суммарной эффективности и расширяют научные представления по биоразнообразию свойств *Bt*, спектра их действия в отношении разных вредных видов насекомых.

1. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. М.: Россельхозакадемия, 2005. – 154 с.
2. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1982. – 463 с.
3. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика. М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
4. Лабинская С.А. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 269 с.
5. Лескова А.Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств. – Л., 1984. – С. 17-19.
6. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей. – М., 1984. – 27 с.
7. Методы почвенной микробиологии. – МГУ, 1986. – 256 с.
8. Рекомендации к практикуму по бактериозам насекомых. – Саранск, 1985. – 118 с.
9. Smirnov W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* // *Insect. Pathol.* – 1962. – P. 384-386

Отримано: 24 грудня 2008 р.

Прийнято до друку: 29 травня 2009 р.