

ЭНТОМОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ

УДК 632.951:579.852.11

DOI 10.36305/2712-7788-2021-3-160-50-62

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНСЕКТОАКАРИЦИДЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ:
ИЗУЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ****Татьяна Васильевна Долженко^{1,2}**¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,
196601, Россия, Санкт-Петербург - Пушкин, Петербургское ш., д.2² ООО "Инновационный центр защиты растений",
196608, Россия, Санкт-Петербург - Пушкин, ул. Пушкинская, д. 20
dolzhenkotv@mail.ru

Энтомопатогенные препараты на основе бактерии *Bacillus thuringiensis* Berliner (ВТ) играют ключевую роль в биологической защите растений. Доля ВТ на мировом рынке биопестицидов составляет около 90-95%. Специфичность, экологическая безопасность и спектр действия – это характеристики, позволяющие препаратам на основе этой бактерии занимать важное место среди средств защиты растений. *Bacillus thuringiensis* – это грамположительные почвенные бактерии, поражающие беспозвоночных. Благодаря огромному диапазону хозяев ВТ стал ведущим продуцентом биопестицидов. Энтомоцидное действие бактерии обеспечивается либо токсинами, содержащими белковые кристаллы (Cry и Cyt), продуцируемыми в стационарной фазе, либо растворимыми токсинами семейств Vip и Sip, секрецируемыми вегетативными клетками. В то же время обнаружены многочисленные нетоксичные факторы вирулентности ВТ: металлопротеазы, хитиназы и др. *Bacillus thuringiensis* характеризуется полиферментативными свойствами: обнаружены ферменты из класса гидролаз, поэтому бактерия одновременно проявляет активность против вредных насекомых и фитопатогенных грибов. Отмечены антибактериальные свойства ВТ и способность стимулировать рост растений, индуцируя систему защиты растения от болезней. Токсикологические исследования, проводимые в течение 50 лет во всем мире, показали безопасность ВТ и её метаболитов, включая инсектицидные белки и другие вещества, что и позволяет широко их использовать в практике защиты растений. Новым направлением в защите растений является использование трансгенных растений на основе *Bacillus thuringiensis*. Внедряя гены ВТ, а точнее cry-гены эндотоксина в растения, получают трансгенные растения, устойчивые к вредным насекомым.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* Berliner; эндотоксин; экзотоксин; энтомоцидное действие; биологическая эффективность; биопестициды

Введение

Проблемы экологической безопасности стоят перед человечеством во всех сферах деятельности. Экологически безопасной альтернативой химическому воздействию на экосистемы является микробиологический контроль численности вредных организмов. В нашей стране разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты растений предусмотрены сегодня Стратегией научно-технологического развития Российской Федерации, утвержденной Указом Президента РФ 1 декабря 2016 г. За последние десятилетия ориентация защиты растений в России существенно изменилась в направлении ее биологизации и экологизации. Исследования в области биопестицидов сейчас являются обширной междисциплинарной сферой науки, не уступающей изучению возможностей массового разведения и применения энтомофагов и акариофагов и путей сохранения и использования природных популяций полезных организмов. Необходимо отметить высокую научность экологизации растениеводства вообще и биологизации защиты растений в частности (Жученко, 2008; Долженко, 2017).

Количество биологических инсектицидов и акарицидов, которые разрешены Государственным каталогом пестицидов и агрохимикатов для применения на территории нашей страны в последние годы практически не меняется и составляет 6,3-6,7% от всего количества разрешённых препаратов. Но если рассматривать не только биологические препараты, но и действующие вещества, на основе которых они создаются и могут создаваться в дальнейшем, то доля их, включая энтомопатогенные бактерии, вирусы, грибы, нематоды, микробные токсины и регуляторы роста, развития и поведения насекомых, составит уже около 20% (Долженко, 2017).

Энтомопатогенные препараты являются наиболее распространенными из биопрепаратов. Энтомопатогены – это, как правило, элементы природного биоценоза, которые служат основой биопрепаратов против вредителей растений. В зависимости от природы энтомопатогенов различают бактериальные, вирусные, грибные и другие препараты. Важное преимущество биологических препаратов в том, что их использование способствует сохранению природного биоразнообразия, что обеспечивает участие природных агентов в регуляции численности вредных объектов и приводит к восстановлению естественной саморегуляции биоценозов (Коломиец, 2016; 2017).

Большой интерес сегодня для защиты растений от вредных организмов представляют микробные метаболиты, продуцируемые, например, актиномицетами. Существует мнение, что препараты на основе продуктов жизнедеятельности микроорганизмов – это та же «химия», но естественного, а не искусственного происхождения. По мнению Н.В. Кандыбина (2009), отождествление микробных метаболитов с пестицидами химического синтеза неправомерно: микробы и их метаболиты – это компоненты живой природы и по закону биологической буферности Тортона они (метаболиты) в отличие от химических пестицидов не могут длительно сохраняться в природе и тем более накапливаться.

Бактериальные инсектициды и акарициды. Энтомопатогенные бациллы давно известны как регуляторы численности насекомых и клещей в природе. Основой бактериальных инсектицидов и акарицидов служит бактерия *Bacillus thuringiensis* Berliner (ВТ). Доля ВТ на мировом рынке биопестицидов составляет около 90-95%. Идентифицировано более 70 разновидностей ВТ, эффективных против фитофагов. Разнообразие этой группы бактерий с каждым годом пополняется новыми серотипами. Они обладают высокой селективностью, безопасны для полезной энтомофауны, рыб, теплокровных. Антифидантное, тератогенное и дерепродуктивное свойства обеспечивают их высокую биологическую эффективность (The Manual of Biocontrol Agents, 2014; Ruiç, 2018). Подвидовое и штаммовое биоразнообразие этой бациллы являются, по мнению С.Д. Грищечкиной и др. (2018), неисчерпаемым природным источником для выделения перспективных культур с практически ценными свойствами, позволяющими расширять ассортимент биопрепаратов, необходимых для защиты растений.

Bacillus thuringiensis – почвенная, грамположительная, спорообразующая бактерия, основной отличительной особенностью которой является образование белковых кристаллических включений на стадии споруляции.

Эпоха ВТ началась в 1901 г., когда японский ученый - Шигетан Ишивата выделил бактерию из мёртвых гусениц шелкопряда во время изучения причины «болезни сотто» (болезнь внезапного коллапса). Это заболевание являлось причиной массовой гибели шелкопряда в Японии и в окружающих регионах. Ишивата назвал бактерию *Bacillus sotto*. Спустя несколько лет после этого в 1911 г. немецкий ученый Эрнст Берлинер выделил штамм из мертвых личинок мельничной огневки, найденных им на мельнице в Тюрингии. Бактерия была названа *Bacillus thuringiensis*. Изучая бактерию, Берлинер обнаружил включения рядом со спорой. В 1953 г. включения были

названы «параспорными кристаллами» Кристофером Ханнаем (Ibrahim, 2010). Затем было продемонстрировано инсектицидное действие этих включений и определен белковый состав. Первый коммерческий инсектицид, основанный на ВТ, Sporine, был произведен во Франции в 1938 г. и использовался главным образом для борьбы с амбарными огневками. В СССР первым бактериальным инсектицидом был Энтобактерин, промышленное производство которого было организовано в начале 50-х годов на Бердском и Степногорском заводах (Кандыбин, 2009). В США первые коммерческие ВТ-препараты были произведены в 1958 г. Биопрепараты, созданные на основе ВТ, технологичны при производстве и применении. За рубежом на основе ВТ производили и производят следующие препараты: Bactospeine, Foray и Biobit (производитель – Valent BioSciences), DiPel (Biocontrol Network), (Rincon-Vitova) и (Valent BioSciences), Cordalene (Agrichem) и (Intrachem Bio Italia), Baturad (Cequisa), Able, Cutlass [EG2371], Delivery, Lepinox [GC-91], CoStar и Javelin [EG2348] (Certis), Ecotech Bio [EG2371] и Ecotech Pro [EG2348] (Bayer), Rapax [EG2348] (Certis) и (Intrachem), Forwart (Forward International), Bactosid K (Sanex), Biocot (Du Pont), Bactec Bt 32 (Plate Agrobac (Tecomag), Thuricide (Biocontrol Network), (Certis) и (Valent BioScienc), Delfin (Certis) и (Kwizda), Larvo-BT и Troy-BT (Troy), Scutello и Scutellc (Biobest), Collapse (Calliope), Bactospeine Koppert (Koppert), Insectobiol (Samabiol), Halt (Biostadt), Hil-Btk (Hindustan), Lipel-K (Agri Life), Bactimos (используется в сфере здравоохранения), Teknar, Gnatrol и Skeetal (Valent Biosciences), VectoBac (Rincon-Vitova) и (Valent Biosciences), Aerobe (BASF), Aquabac (Becker Microbial Products), (Biocontrol Network) и (Rincon-Vitova), Vectocide (Sanex), Bactis (Caffaro), Hil-Bti (Hindustan), Mosquitp Dunks (Rincon-Vitova) и (Biocontrol Network), Liper-I (Agri Life), Antibac Uz и многие другие (Хужамшукуров и др., 2017). В Беларуси создан, производится и применяется комплексный препарат Ксантрел, Ж, на основе спорово-кристаллического комплекса ВТ и спор, и продуктов метаболизма *Bacillus subtilis*, эффективный против листогрызущих вредителей, а также возбудителей ряда заболеваний растений: фитофтороза, альтернариоза и фомоза (Трапашко и др., 2017). О российских бактериальных инсектицидах мы скажем далее.

ВТ встречается повсеместно в природе – в разных типах почв, на поверхности растений, в листовом опаде, в телах живых и мертвых насекомых. Изоляты ВТ обнаруживаются на разных континентах и в большинстве стран мира.

Препараты на основе ВТ являются безопасными для человека и теплокровных животных, нецелевых организмов и окружающей среды. В силу этого они разрешены для применения в органическом земледелии как за рубежом (The Manual of Biocontrol Agents, 2014), так и в Российской Федерации (ГОСТ Р 56508-2015 и ГОСТ 33980-2016).

Механизм действия. Эффект действия ВТ, а также его специфичность к хозяину обычно определяют либо параспоральные токсины, содержащие белковые кристаллы (Сту и Сyt), продуцируемые бактериями в стационарной фазе, либо растворимые токсины Vip и Sip, секретируемые вегетативными клетками. В то же время были обнаружены многочисленные нетоксичные факторы вирулентности ВТ, включая металлопротеазы, хитиназы, аминополиоловые антибиотики и фрагменты, имитирующие нуклеотиды (Malovichko *et al.*, 2019).

Такой набор факторов вирулентности действует в разной степени и в разных сочетаниях на насекомых разных видов. Бактерии вызывают заболевания, которые сопровождаются септициемией, при которой гемолимфа и её фагоцитарные и неспецифические механизмы иммунитета уже не в состоянии подавлять размножение микроорганизмов, беспрерывно проникающих в неё. Клетки поражённых тканей разрываются, и бактерия переходит в больших количествах в гемолимфу, вызывая септициемию (Krieg, 1961; Патыка, 2010; Xu *et al.*, 2014).

Кристаллический дельта-эндотоксин – это термолабильный белок. Форма кристаллов варьирует в зависимости от подвида. Они могут быть бипирамидальные, округлые, квадратные. Кристаллы нерастворимы в воде, но растворимы в щелочных растворах. Эндотоксин, попадая в организм насекомого, под действием энзимов кишечника деградирует, выделяя при этом истинный токсин, который первым вызывает патологические процессы – структурную дезорганизацию кишечного эпителия, облегчая участие в них самой бактерии, с появлением в конечном итоге септического процесса (Штерншис и др., 2016). Гидролизованные токсины обладают свойством связывания со специфическими рецепторами средней кишки насекомого. Это нарушение приводит к увеличению водопроницаемости клеточных мембран. Большое поглощение воды вызывает набухание клетки и, в конечном итоге, разрыв клеточной мембранны кишечника (Xu *et al.*, 2014). Много физиологических изменений происходит у насекомых под действием кристаллического эндотоксина (Кандыбин и др., 2009; Долженко, 2017).

Отсутствие токсичности кристаллов для млекопитающих объясняется тем, что у млекопитающих первичное пищеварение белков проходит при низких показателях рН. Под действием желудочного фермента пепсина, для которого оптимальное значение рН равняется 2, кристалл деградирует до нетоксичного соединения. Таким образом, белок-токсин оказывается токсичным только для узкой группы энтомофауны и совсем безопасен для разнообразных представителей зооценоза, человека и скорее всего не способствует формированию резистентных популяций энтомофагов (Патыка, 2010).

В настоящее известно большое количество продуцируемых ВТ дельта-эндотоксинов. Это разнообразие обусловлено генетической пластичностью ВТ. Доказано, что гены, кодирующие дельта-эндотоксины, расположены на плазмидах бактериальной клетки (Штерншис и др., 2016). В результате многочисленных работ по биотехнологическому получению инсектицидных белков, потребовалась систематизация как генов, так и продуцируемых ими токсинов. В настоящее время пользуются номенклатурой, предложенной группой ученых во главе с N. Crickmore (2020). Гены, кодирующие инсектицидные белки дельта-эндотоксина, обозначили как Сгу, а сами токсины как Сту. В дополнение к инсектицидным Сгу-белкам обнаружены цитолитические Сут-белки у диптеро-специфичных штаммов (Штерншис и др., 2016). В настоящее время идентифицировано 793 Сгу-гена и 40 Сут-генов (Crickmore *et al.*, 2020). Такое разнообразие генов, а, следовательно, и кодируемых ими продуктов, позволяет считать ВТ неисчерпаемым источником получения новых биологических препаратов для защиты растений.

Кристаллическим токсинам ВТ принято уделять больше всего внимания, в силу их ключевой роли в инсектицидном действии бактерии. К кристаллическим токсинам относят белковые парапоральные Сут- и Сгу-включения, формируемые клетками бактерий во время фазы стационарного роста.

Сгу – токсины – это большая группа токсинов, на данный момент включающая 74 типа (с Сгу1 по Сгу74), согласно номенклатуре ВТ-токсинов (Crickmore *et al.*, 2020). Ранее полагались, что все Сгу-токсины имеют трехдоменную структуру, однако теперь описаны и другие варианты структуры (Palma, 2014; Shikov *et al.*, 2020). Токсины обладают выраженной индивидуальной токсичностью в отношении разных мишеней, включая чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, перепончатокрылых, полужесткокрылых, некоторых нематод (рис. 1).

Трехдоменные Сгу-белки являются самым многочисленным классом. Домен I или перфорирующий домен, расположенный на N-конце, состоит из семи аспиральных кластеров, которые подвергаются протеолитическому расщеплению во время активации токсина, и это может быть причиной введения токсина в мембрану и

образования поры. Домен II (центральный или средний домен) состоит из трех антипараллельных β -листов и играет важную роль во взаимодействиях токсина и рецептора. Домен III (галактозосвязывающий домен), способен протеолитически расщепляется в некоторых трехдоменных Сгу-белках, он представляет собой два антипараллельных сэндвича β -листа, который также участвует в связывании рецепторов и образовании пор (Xu *et al.*, 2014).

Трехдоменные Сгу-белки ВТ проявляют энтомоцидную активность против насекомых из следующих отрядов: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera (некоторые тлей).

Механизм действия трехдоменных кристаллических белков изучался в основном у чешуекрылых насекомых. Были предложены три различные модели для объяснения способа действия трехдоменных Сгу-токсинов: «классическая» модель, модель последовательного связывания и модель сигнального пути (Vachon *et al.*, 2012).

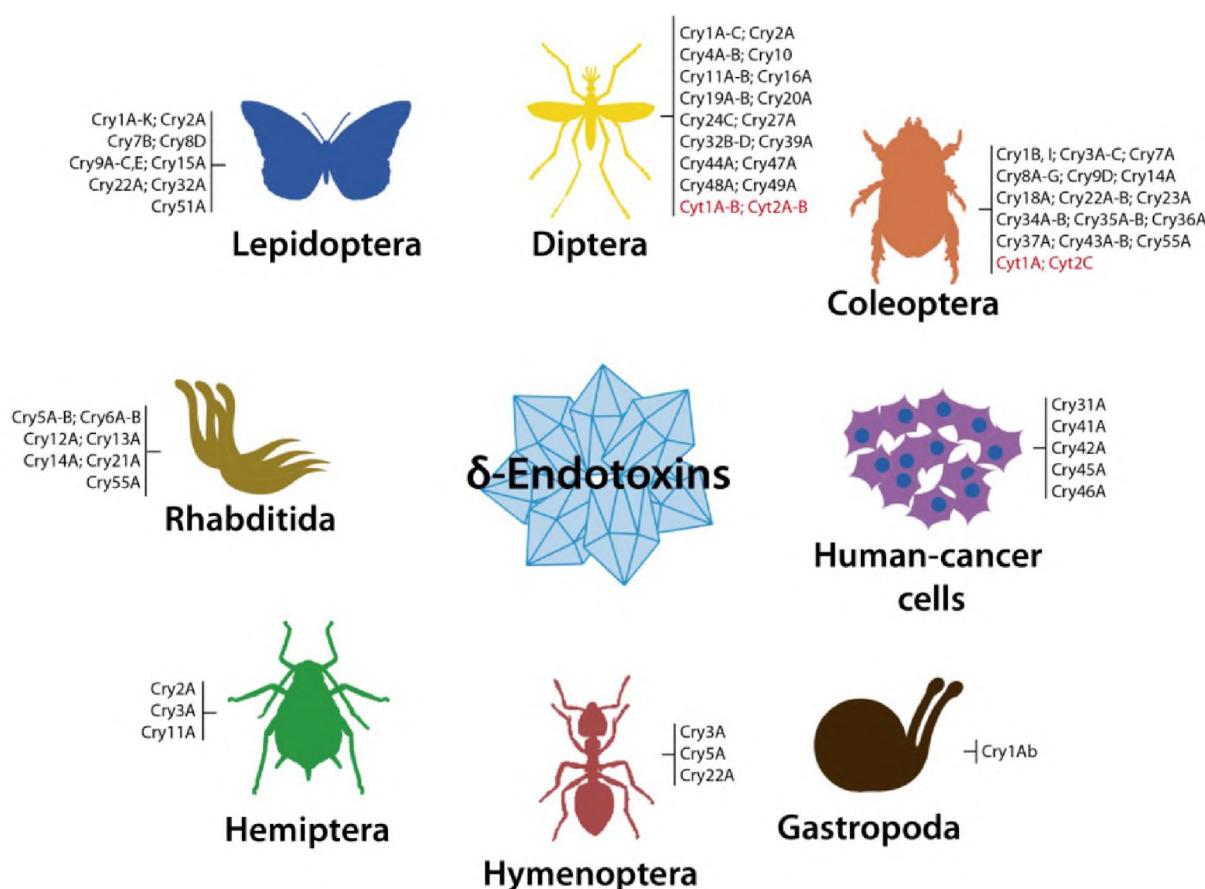


Рис. 1 Спектр действия δ -эндотоксинов (Cry и Cyt) ВТ (Palma, 2014)
Fig. 1 Spectrum of action of δ -endotoxins (Cry and Cyt) BT (Palma, 2014)

«Классическая» модель в основном предполагает, что токсин действует на эпителиальные клетки среднего отдела кишечника восприимчивых насекомых следующим способом: 1) поглощение кристаллов токсина насекомым и растворение в щелочной среде кишки; 2) протеолитическая активация, благодаря которой изначальный Сгу-белок (протоксин) преобразуется в более мелкие протеазоустойчивые токсичные полипептиды; 3) связывание фрагментов токсина с определенными рецепторами на поверхности эпителиальных клеток средней кишки; 4) образование

неселективных пор, проницаемых для неорганических ионов, аминокислот и сахаров. Такие поры вызывают лизис эпителиальных клеток и, следовательно, расстройство функционирования средней кишки, приводящее к смерти насекомых. Кроме того, если вместе с токсином в кишечник хозяина попадают споры, то в гемолимфе бактерии активно размножаются, и насекомое умирает в процессе септицемии. Хотя эта схема была принята в течение многих лет, некоторые детали все еще остаются плохо изученными (включая детали о структуре пор и механизме их сборки) (Vachon *et al.*, 2012; Штерншис и др., 2016; Долженко, 2017; Белоусова, 2019).

Модель последовательного связывания предполагает, что Сгу-токсины, активированные кишечными протеазами, связываются с кадгериноподобными белками (трансмембранными гликопротеинами, которые функционируют как рецепторы токсинов) и подвергаются конформационному изменению, которое способствует протеолитическому удалению α -спирали из домена I и образования олигомерной структуры. Затем происходит связывание со вторым рецептором – аминопептидазой, и уже этот комплекс встраивается в мембрану клеток и вызывает их гибель (Palme, 2014; Штерншис и др., 2016).

Сyt (цитотоксические) белки, кодируются *cyt*-генами, представляют собой другое семейство инсектицидных белков ВТ. В отличие от Сгу-белков, Сyt-белки обладают общей цитолитической (гемолитической) активностью *in vitro* и преимущественно активностью в отношении двукрылых насекомых *in vivo*. Сyt-белки представляют собой однодоменные, трехслойные альфа-бета-белки (рис. 2).

На сегодняшний день Сyt-белки делятся на три семейства (Cyt1, Cyt2 и Cyt3), токсичные в основном для двукрылых (Crickmore *et al.*, 2018). Однако, некоторые штаммы различных подвидов ВТ, например, *subsp. morrisoni*, produцируют Сyt-белки с токсической активностью против более широкого круга насекомых, включая Diptera, Lepidoptera и Coleoptera. Для белка Сyt2C описана активность против нематод (Rhabditida).

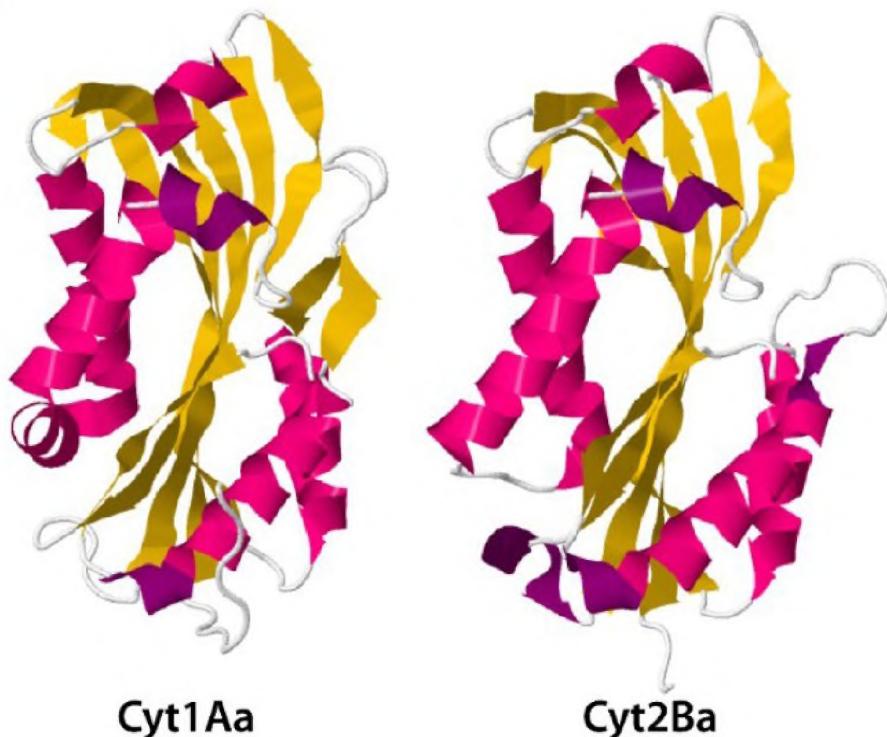


Рис. 2 Трехмерная структура Сyt1Aa и Сyt2Ba токсинов (Palme, 2014)
Fig. 2 Three-dimensional structure of Cyt1Aa and Cyt2Ba toxins (Palme, 2014)

Одной из важнейших особенностей Сгу-токсинов является их способность усиливать инсектицидную активность других токсинов (Сгу или Vip3) и снижать уровень устойчивости нечувствительных насекомых к некоторым Сгу-токсинам (Soberon *et al.*, 2013).

В период вегетативного роста некоторые штаммы ВТ продуцируют инсектицидные белки, которые секретируются в среду. Впервые Vip-токсины были обнаружены в середине 1990-х, на данный момент описано 176 Vip-токсинов, распределенных на 4 класса: Vip1, Vip2, Vip3 и Vip4 (Crickmore *et al.*, 2018). Vip1 и Vip2 представляют собой бинарные белковые соединения с высокой инсектицидной активностью в отношении некоторых жесткокрылых вредителей. Свое действие на целевую клетку Vip1 и Vip2 токсины реализуют в паре, при этом Vip1 представляет собой рецепторосвязывающий домен, обеспечивающий путь в клетку для ADP-рибозилазы токсина Vip2. Vip3 – это линейный, не бинарный токсин, активный в отношении широкого спектра чешуекрылых насекомых. Для Vip3-токсинов была показана способность образовывать каналы в клеточной стенке чувствительного насекомого. При этом Vip3-токсин связывается с эпителиальными клетками средней кишки восприимчивых насекомых, вызывает их лизис, паралич кишечника и смерть (Yu *et al.*, 2012). Однако, этот механизм действия отличается от работы Сгу-токсинов по механизму связывания с рецептором и свойствам ионного канала. Кроме того, обширные исследования *in vitro* и *in vivo* показали почти полное отсутствие перекрестной резистентности между Vip3A и Сгу1 белками. Наличие Vip3 токсинов открывает возможность использования биопестицидов на основе ВТ в отношении большего числа вредителей, а также препятствует развитию устойчивости насекомых к Сгу-белкам (Bravo *et al.*, 2011).

Диапазон чувствительных хозяев и механизм действия Vip 4-токсина пока остается неизвестным. Однако, выявлена его филогенетическая близость с Vip1 белками (Crickmore *et al.*, 2020).

Еще одним белком, секрецируемым ВТ в среду в период вегетативного роста, является Sip-токсин. Токсичность Sip может обуславливаться образованием пор, но пока точный механизм неизвестен (Malovichko *et al.*, 2019).

Некоторые подвиды ВТ продуцируют небелковые, термостабильные, секрецируемые вторичные метаболиты, имеющие неспецифичную активность в отношении широкого спектра насекомых. Эти токсины также известны как β-экзотоксины, или турингиезины. Энтомоцидный эффект реализуется за счет ингибирования ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Экзотоксиногенными культурами ВТ, по данным Н.В. Кандыбина и др. (2009), являются подвиды *thuringiensis*, *kenyaae*, *tolworthi*, *morrisoni*, *darmstadiensis* и др., и эти культуры являются перспективными для производства препаратов, ввиду их более широкого спектра энтомоцидного действия. Экзотоксин вызывает, в большей части, метатоксический эффект, включаясь в процессы роста и метаморфоза насекомого-хозяина. Отмечается тератогенез, антифидантное действие, снижение жизнеспособности дочерних поколений. В высоких концентрациях экзотоксин обладает овицидным действием. В отличие от эндотоксина он может проникать через покровы насекомых. Многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных учёных показано, что экзотоксин, попадая во внешнюю среду, не накапливается, а быстро разрушается и инактивируется (Yilmaz *et al.*, 2012; Штерншис и др., 2016).

ВТ характеризуется полиферментативными свойствами: обнаружены ферменты из класса гидролаз, поэтому бактерия одновременно проявляет активность против вредных насекомых и фитопатогенных грибов. Механизм антифунгального действия ВТ связан с рядом факторов. Бактерии продуцируют и выделяют во внешнюю среду

литические ферменты, в частности протеазу и хитиназу, которые лизируют клеточные стенки фитопатогенных грибов. Кроме того, они могут вырабатывать антибиотики, которые угнетающе действуют на грибы (Белоусова и др., 2020). Ряд авторов отмечает антибактериальные свойства ВТ и способность стимулировать рост растений, индуцируя систему защиты растения от болезней (Калмыкова, 2016; Мунтян и др., 2016).

Токсикологические исследования, проводимые в течение 50 лет во всем мире, показали безопасность ВТ и её метаболитов, включая инсектицидные белки и другие вещества, что и позволяет широко их использовать в практике защиты растений. С другой стороны, учитывая способность ВТ к синтезу пяти типов белковых энтомотоксинов с последующей их кристаллизацией, многие авторы отмечают отсутствие процесса формирования резистентности у насекомых к ВТ (Sanchis, Bourguet, 2008; Патыка, 2010).

Применение. Российскими учеными разработан достаточно большой ассортимент бактериальных инсектицидов. Из них первыми, как мы уже говорили, были Энтобактерин, а затем Дендробациллин, которые сегодня не производятся. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории Российской Федерации (2021) включает в себя следующие бактериальные инсектициды и инсектоакарициды: на основе спорово-кристаллического комплекса *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* – Лепидоцид, П (БА-3000 ЕА/мг, титр не менее 60 млрд. спор/г), СК (БА-2000 ЕА/мг, титр не менее 10 млрд. спор/г); на основе спорово-кристаллического комплекса *B. th.* var. *kurstaki* Z-52 - Лепидобактоцид, Ж (БА-2000 ЕА/мг, титр не менее 10 млрд спор/г); на основе спорово-кристаллического комплекса *B. th. var. thuringiensis* – Битоксибациллин, П (БА-1500 ЕА/мг, титр не менее 20 млрд. спор/г) - содержит в себе три энтомоцидных компонента: споры, кристаллический эндотоксин и термостабильный экзотоксин; на основе *B. th. var. thuringiensis*, штамм В-501 - Лептоцид, Ж (титр не менее 10^9 КОЕ/мл); на основе *B. th. var. thuringiensis*, ИПМ-1140 - Инсетим, Ж (титр не менее 2×10^9 КОЕ/см³); на основе *Bacillus thuringiensis* - Биослип БТ, П (титр не менее 1×10^{10} КОЕ/г).

До 2017 г. был разрешён к применению инсектицид Битиплекс, СП (200 г/кг) – полипептид (сумма аминокислот), этот препарат получали путём отделения эндотоксина от балластных веществ, он содержал активированный эндотоксин кристаллов *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (пептиды).

Мы изучали действие ВТ-препаратов на крыжовниковых пилильщиков (*Nematus ribesii* Scop., *Pristiphora pallipes* Lep.), на яблонную плодожорку (*Cydia pomonella* L.), на комплекс крестоцветных блошек (род *Phyllotreta*) и рапсового цветоеда (*Meligethes aeneus* F.), на западного цветочного трипса (*Frankliniella occidentalis* Perg.) и приморского мучного червеца (*Pseudococcus obscures* Essig.), обыкновенного паутинного клеща (*Tetranychus urticae* Koch.).

Из полученных данных можно сделать вывод, что Битоксибациллин (БТБ), П (1,0%) и Лепидоцид, П (0,2%) высокоэффективны против *N. ribesii* и *P. pallipes* во время отрождения личинок и в фазе личинок I-II возраста. Биологическая эффективность Битоксибациллина составляла уже на третьи сутки после обработки 94,8–100%, Лепидоцида – 93,3–96,8%.

Действие Битоксибациллина оценивали также и в качестве акарицида против обыкновенного паутинного клеща (*Tetranychus urticae* Koch.) на розе защищённого грунта (сорт Гранд Гала) и на розе открытого грунта (сорт Глория Дей). Схема опыта: Битоксибациллин, П (БА-1500 ЕА/мг) – 0,5% и 1,0%, Вертимек, КЭ (18 г/л) – 0,05% (эталон), контроль (Долженко, 2017).

В защищённом грунте численность обыкновенного паутинного клеща на розе до обработки БТБ составляла в среднем 66,3–87,5 особей/лист. Уже к третьим суткам

после обработки численность клещей снизилась до 2,3-4,5 особей/лист в вариантах с применением БТБ и до 1,8 особей/лист – в эталоне (в контроле – 84,5 особей/лист). Таким образом, биологическая эффективность препарата составила при 0,5% концентрации – 95 – 97,5 – 93,6% соответственно на 3, 7 и 14 сутки учётов после обработки и 97,6 – 98,1 – 93,6% при концентрации 1%, что и обеспечило защиту растений в течение 14 суток.

В открытом грунте опыт был заложен в начале заселения розы обыкновенным паутинным клещом. На трети сутки после обработки численность вредителя снизилась, в то время как в контроле наблюдалось его увеличение. Оценка биологической эффективности Битоксибациллина показала, что препарат в концентрации 0,5 % снижал численность клещей на 59,3 - 91,6 - 84% по суткам учётов соответственно, а в концентрации 1% – на 83,5 - 98,4 - 82,2 %. Таким образом, БТБ в концентрации 1% обеспечил защиту розы от обыкновенного паутинного клеща в течение 7 суток (Долженко, 2017).

Аналогичное акарицидное действие Битоксибациллина в отношении красного плодового клеща на яблоне описывает Л.П. Ягодинская (2016): на седьмые сутки после обработки биологическая эффективность составила 90%, также автор отмечает овицидное действие препарата.

Т.А. Рябчинская и Г.Л. Харченко (2006) отмечают, что при использовании БТБ, П и Лепидоцида, П в благоприятных погодных условиях быстро достигается высокая биологическая эффективность (90–99%) в борьбе с открытопитающимися гусеницами серой волосистой пяденицы и кистехвоста пятнистого на яблоне.

Еще одним, но пока экспериментальным ВТ-препаратом, является Бацикол, созданный на основе *Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis* и содержащий компоненты культуральной жидкости, споры, энтомоцидные и фунгицидные экзо- и эндотоксины, благодаря которым он обладает полифункциональными свойствами. Бацикол, подобно БТБ, обладает антифидантным эффектом, а тератогенное и дерепродуктивное действие не отмечено. Препарат эффективен против опасных жесткокрылых фитофагов, включая имаго (Гришечкина, Коваленко, 2017).

Опыты по оценке возможности использования Бацикола в борьбе с сосущими вредителями проводились нами в Ботаническом саду им. В.Л. Комарова РАН. Преобладающими сосущими вредителями в указанном году были обыкновенный паутинный клещ (*Tetranychus urticae* Koch.), западный цветочный трипс (*Frankliniella occidentalis* Perg.) и приморский мучнистый червец (*Pseudococcus affitis* Mask.). Кормовые растения были выбраны по принципу наибольшего предпочтения вредителями. Проведённая нами оценка применения препарата показала, что Бацикол эффективен в борьбе с обыкновенным паутинным клещом в условиях оранжереи (биологическая эффективность достигала 85% на 7-е сутки после обработки) в то время, как для западного цветочного трипса этот показатель составлял 60,0%, для приморского мучнистого червеца достигал 61,7% (Долженко, 2017).

Необходимо учитывать, что особенностью бактериальных препаратов на основе ВТ является проявление их эффективного действия при активном питании насекомых и клещей, то есть наибольшая гибель вредителей наблюдается при их высокой пищевой активности, которая наступает, как правило, при температуре не ниже 17–18 °C, обычно оптимальная температура составляет 24–32 °C. Наиболее чувствительны к бактериальным препаратам личинки младших возрастов фитофагов. ВТ-препараты, обладая замедленным действием, могут уступать химическим препаратам по летальному эффекту. Гибель фитофагов, как правило, наступает на 3–5 сутки после обработки, достигая максимума на 7–10 день. Однако анорексия наступает у личинок уже через несколько часов после попадания препарата в организм, что уже снижает

ущерб, наносимый ими растениям. Также немаловажно помнить, что действие препаратов на основе ВТ складывается из первичного, летального, действия, а также метатоксического, антифидантного, а иногда и эпизоотологического действий (Кандыбин и др., 2009, Долженко, 2017). Применение этих препаратов возможно в органическом земледелии. Срок ожидания 5 дней.

Новым направлением в защите растений является использование трансгенных растений на основе *Bacillus thuringiensis*. Внедряя гены ВТ, а точнее *cry*-гены эндотоксина в растения, получают трансгенные растения, устойчивые к вредным насекомым. Впервые *cry*-гены ВТ были введены в растения табака в 80-е годы 20 века, и было показано, что насекомые, поедающие эти растения, погибают от действия эндотоксина ВТ. Использование этих растений имеет ряд преимуществ по сравнению с технологией опрыскивания бактериальными препаратами: во-первых, токсины непрерывно продуцируются в каждой клетке растения, и не остается особей фитофага, избежавших поглощения ВТ-токсинов; во-вторых, система поставки ВТ-белков растением обеспечивает расширение круга хозяев, включая сосущих и скрыто живущих вредителей. В России эти растения пока только исследуются (Штерншиц и др., 2016). Как свидетельствует мировой опыт, выращивание ВТ-растений в экологическом отношении вполне безопасно, хотя и связано с потенциальным экологическим риском прямого и косвенного негативного воздействия на нецелевую биоту агроценоза. Однако, при защите растений от фитофагов экологические последствия ВТ-генно-инженерно-модифицированных растений гораздо менее значимы, чем при их химической защите (Ibrahim, 2010).

Заключение

Bacillus thuringiensis синтезирует необычайное разнообразие инсектицидных белков, перспективных для биоконтроля. В настоящее время существует большое количество данных по широкому кругу вопросов, связанных с ВТ. Среди инсектицидных белков ВТ есть как кристаллические, так и секрециируемые белки, высокотоксичные против широкого спектра беспозвоночных видов. Определенные природные штаммы ВТ были успешно включены в производство биоинсектицидов, где активный ингредиент представляет собой смесь спор и кристаллов. Внедрение инновационных технологий еще больше увеличит арсенал токсинов в защите растений от вредителей и повысит их эффективность.

Литература / References

Белоусова М.Е. Энтомоцидная активность новых штаммов и экспериментальных инсектицидов на основе *Bacillus thuringiensis* Berliner. Автореф. дисс...канд. биол. наук: 06.01.07 – защита растений / ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». СПб, 2019. 20 с.

[Belousova M.E. Entomocidal activity of new strains and experimental insecticides based on *Bacillus thuringiensis* Berliner. Extended abstract of dissertation of Cand. Biol. sciences: 06.01.07 - plant protection / Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev. St. Petersburg, 2019. 20 p.]

Белоусова М.Е., Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Антонец К.С., Марданов А.В., Ракитин А.Л., Белецкий А.В., Равин Н.В., Нижников А.А. Секвенирование генома штамма *Bacillus thuringiensis* var. *Darmstadiensis* 56 и изучение инсектицидной активности биологического препарата на его основе // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55, № 1. С. 87–96. DOI:10.15389/agrobiology.2020.1.87rus

[Belousova M.E. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Antonets K.S., Mardanov A.V., Rakitin A. L., Beletsky A.V., Ravin N.V., Nizhnikov A.A. Genome sequencing of the *Bacillus*

thuringiensis strain var. *Darmstadiensis* 56 and the study of the insecticidal activity of a biological drug based on it. *Agricultural biology*. 2020. 55 (1): 87–96.

DOI: 10.15389/agrobiology.2020.1.87rus]

[Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Романова Т.А., Нижников А.А. Поиск природных изолятов *Bacillus thuringiensis* для создания экологически безопасных биологических препаратов // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, № 5. С. 1062–1069. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062rus]

[Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Romanova T.A., Nizhnikov A.A. Search for natural isolates of *Bacillus thuringiensis* for the creation of environmentally safe biological preparations. *Agricultural biology*. 2018. 53 (5): 1062–1069.

DOI: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062rus]

[Гришечкина С.Д., Коваленко Т.К. Эффективность микробиологического препарата Бацикол против 28-точечной картофельной коровки *Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch. (Coleoptera, Coccinellidae) на Дальнем Востоке // Вестник защиты растений. 2017. № 1 (91). С. 48–52.

[Grishechkina S. D., Kovalenko T. K. The effectiveness of the microbiological preparation Bacicol against the 28-point potato cow *Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch. (Coleoptera, Coccinellidae) in the Far East. *Bulletin of Plant Protection*. 2017. 1 (91): 48–52]

[Долженко Т.В. Биологизация и экологическая оптимизация ассортимента средств защиты сельскохозяйственных культур от вредителей. Автореф. дисс...докт. бiol. наук: 06.01.07 – защита растений / ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». СПб. – Пушкин, 2017. 44 с. [Dolzhenko T.V. Biologization and ecological optimization of the range of crop protection products from pests. Extended abstract of dissertation of doct. biol. sciences: 06.01.07-plant protection / FGBOU VO "Russian State Agrarian University-Moscow Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev". St. Petersburg-Pushkin, 2017. 44 p.]

[Жученко А.А. Роль биологических методов в адаптивно-интегрированной системе защиты растений // Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем. Вып. 5. Краснодар, 2008. С. 5–32.

[Zhuchenko A.A. The role of biological methods in the adaptive-integrated plant protection system // Biological plant protection-the basis for the stabilization of agroecosystems. Vol. 5. Krasnodar, 2008. P. 5–32]

[Калмыкова Г.В. Скрининг антагонистической и ростостимулирующей активности штаммов *Bacillus thuringiensis* // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Вып. 9. Краснодар, 2016. С. 238–240.

[Kalmykova G.V. Screening of antagonistic and growth-stimulating activity of *Bacillus thuringiensis* strains // Biological plant protection-the basis for stabilization of agroecosystems. Issue 9. Krasnodar, 2016. P. 238–240]

[Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка В.Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. СПб., Пушкин, 2009. 244 с.

[Kandybin N.V., Patyka T.I., Ermolova V.P., Patyka V.F. Microbiocontrol of insect abundance and its dominant *Bacillus thuringiensis*. St. Petersburg, Pushkin, 2009. 244 p.]

[Коломиец Э.И. Вклад микробиологической науки в развитие агротехнологий в Республике Беларусь // Наука и инновации. 2016. № 6. С. 23–25.

[Kolomiets E.I. Contribution of microbiological science to the development of agricultural technologies in the Republic of Belarus. *Science and innovations*. 2016. 6: 23–25]

[Коломиец Э.И. Биологические средства защиты растений как основа оздоровления и стабилизации агробиоценозов // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2017. № 52. С.172–179.

[*Kolomiets E.I.* Biological means of plant protection as a basis for improving and stabilizing agrobiocenoses // The information bulletin of the VPRS MOBB. 2017. 52: 172–179]

Мунтян Е.М. Перспективы создания полифункциональных средств защиты растений на основе *Bacillus thuringiensis* // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Вып. 9. Краснодар, 2016. С.269–272.

[*Muntyan E.M.* Prospects for creating multifunctional plant protection products based on *Bacillus thuringiensis* // Biological plant protection-the basis for stabilizing agroecosystems. Issue 9. Krasnodar, 2016. P. 269–272]

Патыка Т.И. *Bacillus thuringiensis* в микробиологическом контроле численности насекомых. Автореф. дисс...докт. сельскохозяйственных наук: 03.00.07 - микробиология / Уманский государственный аграрный университет. Умань, 2010. 39 с. [*Patyka T.I.* *Bacillus thuringiensis* in the microbiological control of the insect population. Extended abstract of dissertation of Doct. Agricultural Sciences: 03.00.07 - Microbiology /Uman State Agrarian University. Uman, 2010. 39 p.]

Рябчинская Т.А., Харченко Г.Л. Экологизация защиты яблони от вредных организмов. М.: Росинформагротех, 2006. 188 с.

[*Ryabchinskaya T.A., Kharchenko G.L.* Ecologization of apple tree protection from harmful organisms. Moscow: Rosinformagrotech, 2006. 188 p.]

Трапашко Л.И., Быковская А.В., Немкеевич М.Г. Эффективность применения бактериальных биопрепараторов для снижения вредоносности стеблевого кукурузного мотылька // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Минск: Беларуская навука, 2017. С.188–190.

[*Trepashko L.I., Bykovskaya A.V., Nemkevich M.G.* The effectiveness of the use of bacterial biological products to reduce the harmfulness of the corn stem moth // Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects. Minsk: Belorusskaya navuka, 2017. P. 188–190]

Хужамшикуров Н.А., Газиева Ш.К., Агзамова Х.К. Системный анализ эффективности биопрепарата Antibac Uz против хлопковой совки на хлопчатнике // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. 2017. № 52. С. 308–313.

[*Khuzhamshukurov N.A., Gazieva Sh.K., Agzamova Kh.K.* System analysis of the effectiveness of the biological preparation Antibac Uz against cotton scoops on cotton // The information bulletin of the VPRS MOBB. 2017. 52: 308–313]

Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П., Шпатова Т.В., Леляк А.А., Бахвалов С.А. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2016. 233 с.

[*Shternshis M.V., Belyaev A.A., Tsvetkova V.P., Shpatova T.V., Lelyak A.A., Bakhvalov S.A.* Biological preparations based on bacteria of the genus *Bacillus* for plant health management. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS, 2016. 233 p.]

Ягодинская Л.П. Эффективность акарицидов против клещей-фитофагов на плодовых культурах // Сборник научных трудов ГНБС. 2016. Т 142. С. 128–138.

[*Yagodinskaya L.P.* The effectiveness of acaricides against phytophagous mites on fruit crops.

Collection of scientific works of the SNBG. 2016. 142: 128–138]

Bravo A., Likityvatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2011. Vol. 41. P. 423–431.

Crickmore N., Berry C., Paneerselvam S., Mishra R., Connor T.R., Bonning B.C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins // Journal of Invertebrate Pathology. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>.

Ibrahim M.A., Griko N., Junker M. *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective // Bioengineered Bugs. 2010. Vol. 1 (1). P. 31–50.

Krieg A. *Bacillus thuringiensis* Berliner. Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung in der Biologischenschädlingsbekämpfung (In memoriam Dr. Ernst Berliner (1988-1957)) // Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Förstwirtschaft. Berlin, Dahlem. Heft 103, April. 1961. P. 7–66.

Malovichko Y.V., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions // Toxins. 2019. Vol. 11 (6). P. 347. <https://doi.org/10.3390/toxins11060347>

Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballer P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity // Toxins. 2014. Vol. 6 (12). P. 3296–3325.

Ruiu L. Microbial Biopesticides in Agroecosystems // Agronomy. 2018. Vol. 8 (11). P. 235.

Sanchis V., Bourguet D. *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management // Agronomy for Sustainable Development. 2008. Vol. 28. P. 11–20.

Shikov A.E., Malovichko Y.V., Skitchenko R.K., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. No more tears: mining sequencing data for novel Bt Cry toxins with CryProcessor // Toxins. 2020. Vol. 12. P. 204. [Https://doi.org/10.3390/toxins12030204](https://doi.org/10.3390/toxins12030204)

Soberón M., López-Díaz J.A., Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms // Peptides. 2013. Vol. 41. P. 87–93.

The Manual of Biocontrol Agents. BCPC. Alton, UK, 2014. 304 p.

Vachon V., Laprade R., Schwartz J-L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review // Journal of Invertebrate Pathology. 2012. Vol. 111. P. 1–12.

Xu C.; Wang B.C.; Yu Z.; Sun M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins // Toxins. 2014. Vol. 6. P. 2732–2770.

Yilmaz S., Ayvaz A., Akbulut M., Azizoglu U., Karabörklü S. A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects // Journal of Stored Products Research. 2012. Vol. 51. P. 33–40.

Yu X., Liu T., Sun Z., Guan P., Zhu J., Wang S., Li S., Deng Q., Wang L., Zheng A. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* // Current microbiology. 2012. Vol. 4. P. 326–331.

Статья поступила в редакцию 28.07.2021 г.

Dolzhenko T.V. Bacterial insectoacaricides for plant protection: study and prospects of application // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2021. № 3 (160) P. 50-62.

Entomopathogenic preparations based on the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (BT) play a key role in the biological protection of plants. The share of BT in the global market of biopesticides is about 90–95%. Specificity, environmental safety and spectrum of action are the features that allow preparations based on this bacterium to occupy an important place among plant protection products. *Bacillus thuringiensis* is a gram-positive soil bacterium that affects invertebrates. Due to the huge range of hosts, BT has become a leading producer of biopesticides. The entomocidal effect of the bacterium is provided either by toxins containing protein crystals (Cry and Cyt) produced in the stationary phase, or by soluble toxins of the Vip and Sip families secreted by vegetative cells. At the same time, numerous non-toxic virulence factors of BT were found: metalloproteases, chitinases, etc. *Bacillus thuringiensis* is characterized by poly-enzymatic properties: enzymes from the class of hydrolases have been detected, so the bacterium simultaneously shows activity against harmful insects and phytopathogenic fungi. The antibacterial properties of BT and the ability to stimulate plant growth, inducing a plant protection system against diseases, are noted. Toxicological studies conducted for 50 years around the world have shown the safety of BT and its metabolites, including insecticidal proteins and other substances, which allows them to be widely used in plant protection practice. A new direction in plant protection is the use of transgenic plants based on *Bacillus thuringiensis*. By introducing BT genes, or rather cry-endotoxin genes into plants, transgenic plants that are resistant to harmful insects are obtained.

Key words: *Bacillus thuringiensis* Berliner; endotoxin; exotoxin; entomocidal effect; biological efficacy; biopesticides