ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО
ШТАММА *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15*С.Д. ГРИШЕЧКИНА¹, В.П. ЕРМОЛОВА¹, Т.К. КОВАЛЕНКО², К.С. АНТОНЕЦ¹,
М.Е. БЕЛОУСОВА¹, В.В. ЯХНО¹, А.А. НИЖНИКОВ¹

Биологические методы регуляции численности вредных организмов — перспективная альтернатива традиционным химическим препаратам. В настоящее время кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* рассматриваются в качестве основы производства биологических инсектицидов, поскольку обладают высокой специфичностью в отношении целевых вредителей, безопасны для человека и окружающей среды. Во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии разработан и получен энтомоцидный биологический препарат широкого спектра действия на основе приоритетного штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (BtH₁) 800/15. Мы впервые установили, что препарат на основе BtH₁ 800/15 увеличивает всхожесть семян, высоту проростков и длину корней у различных сельскохозяйственных культур, а также выявили ингибирующую активность препарата в отношении фитопатогенных грибов. Целью нашей работы было изучение полифункциональных свойств препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15. Штамм выделили из личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) в Ленинградской области, изучили его культурально-морфологические, биохимические, серологические свойства и охарактеризовали согласно классификации Н. De Barjas и А. Bonnefoi. Секвенирование последовательностей, кодирующих 16S рРНК и В-субединицу ДНК-гиразы (*gyrB*), позволило подтвердить, что выделенный штамм 800/15 представляет собой *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Биологический препарат на основе BtH₁ 800/15 в жидкой форме содержал компоненты культуральной жидкости, споры и энтомоцидные экзо- и эндотоксины. Исходные значения биологической активности препарата были следующими: титр — $3,5 \times 10^9$ КОЕ/мл, содержание экзотоксина для личинок комнатной мухи *Musca domestica* Linn. в ЛК₅₀ — 3,1 мкл/г корма, энтомоцидная активность для личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. в ЛК₅₀ — 0,28 %. Полевые испытания, проведенные на разных сельскохозяйственных культурах в 2014-2017 годах в Ленинградской области, Краснодарском и Приморском краях, показали весьма высокую (66,7-100 %) эффективность препарата против колорадского жука, картофельной коровки (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.), капустной моли (*Plutella xylostella* L.), капустной и репной белянок (*Pieris brassica* L., *P. rapae* L.), капустной совки (*Barathra brassicae* L.), желтого крыжовникового пилильщика (*Pteronidea ribesii* Scop.), паутинного клеща (*Tetranychus urtica* L.) и белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum* West.). Лабораторная оценка выявила, что препарат не обладал фитотоксичностью, более того, проявлял ростстимулирующее действие на всхожесть семян (6-21 %), высоту проростков (4-52 %) и длину корней (12-52 %) в зависимости от культуры. Эффективность препарата в отношении фитопатогенных грибов не превышала 54 % и уступала по этим показателям ранее разработанному препарату на основе штамма BtH₁₀ 56. Установлена эффективность (100 %) совместного применения препарата BtH₁ 800/15 и химического инсектицида Децис Экстра, КЭ (концентрат эмульсии) со снижением норм применения соответственно в 2 и 3 раза на картофеле против картофельной коровки. Такая комбинация биологических и химических инсектицидов экономически оправдана и может быть успешно использована в условиях поля при выращивании картофеля.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, насекомые-фитофаги, фитопатогены, полифункциональные свойства, энтомоцидная, антифунгальная и ростстимулирующая активность.

В последнее время наблюдается снижение темпов роста мирового рынка химических пестицидов с одновременной активацией разработки и производства биологических препаратов. Ожидается, что к 2050 году объемы продаж химических и биологических средств борьбы с вредителями достигнут эквивалентного уровня (1). Биологические препараты служат современной альтернативой традиционным химическим средствам для по-

* Работа поддержана проектом прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (ПНИЭР) по лоту шифр 2017-14-579-0030 по теме «Создание микробиологических препаратов для расширения адаптационного потенциала сельскохозяйственных культур по питанию, устойчивости к стрессам и фитопатогенам» (шифр заявки 2017-14-579-0030-013), соглашение № 14.607.21.0178, уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEFI60717X0178.

давления численности вредных организмов. Они не загрязняют окружающую среду, безопасны для человека, теплокровных животных и полезных организмов, обладают высокой селективностью, эффективны в отношении целевых видов вредителей (2, 3).

Для защиты сельскохозяйственных культур разрабатываются препараты на основе бактерий из рода *Bacillus*, которые обладают патогенными свойствами в отношении вредных насекомых-фитофагов (4-6), фитопатогенов (7-9), а также фитопатогенных нематод (10). По масштабам производства лидерство принадлежит препаратам, созданным на основе разных подвидов энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* Berliner (Bt) (11-13). Для биологического контроля насекомых в агробиоценозах наиболее широко используются препараты на основе трех патовариантов Bt. Патовар А — это подвиды Bt (var. *thuringiensis*), кристаллы эндотоксинов которых с наибольшей активностью влияют на чешуекрылых (*Lepidoptera*), патовар В — подвиды Bt (var. *israelensis*), которые поражают личинок двукрылых (*Diptera*), патовар С — подвиды Bt (var. *tenebrionis*, var. *darmsstadensis*), активные против жесткокрылых (*Coleoptera*) (4). Выявлен также новый патовар F (от *fungi*, грибы) с действием на фитопатогенные грибы (14).

Инсектицидные свойства Bt связаны с продукцией разнообразных токсинов (15-17), среди которых наиболее значимо семейство Сгу, относящееся к кристаллическим дельта-эндотоксинам (18, 19). В кишечнике насекомого белковый кристалл превращается в протоксин, переходящий под действием сериновых протеаз в истинный токсин. Последний вызывает патологические процессы, сопровождаемые септициемией — поражением, при котором микроорганизмы колонизируют кровеносную систему насекомого, вызывая его гибель. Важное значение имеет термостабильный водорастворимый β -экзотоксин нуклеотидной природы, продуцируемый бактерией во внешнюю среду, который оказывает метатоксический эффект, включаясь в процессы роста и метаморфоза насекомого-хозяина (4, 20).

Препараты на основе Bt характеризуются полиферментативными свойствами, в них обнаружены различные ферменты из класса гидролаз, благодаря чему, по-видимому, проявляется активность против вредных насекомых и грибов (21, 22). Механизм антифунгального действия Bt связан также с продуцированием других литических ферментов, в частности протеаз и хитиназ, которые разрушают клеточные стенки фитопатогенных грибов (23, 24). В последнее время отмечают, что бактерии рода *Bacillus* образуют липопептидные антибиотики, отвечающие за антагонистический эффект (25-27).

Один из аспектов полифункциональной активности бактерий рода *Bacillus* — их способность стимулировать рост растений (28-30). Они колонизируют почвенную ризосферу и ризоплану, продуцируют физиологически активные вещества, могут быть связаны с активизацией генов устойчивости растений (31). Для создания новых препаратов Bt ведется поиск и отбор активных штаммов из природных источников (почва, больные насекомые, зараженные ткани и органы растений), включая селекционные исследования на технологичность, активность и спектр действия (32).

Во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСХМ) разработана жидкая форма препарата широкого спектра действия против массовых вредителей-фитофагов на основе штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH₁ 800/15) (патент РФ № 2514211 от 27.04.2014) (33), легко разбавляемая водой до необходимой рабочей концентрации и удобная для применения с использованием серийной опрыскивающей аппаратуры.

В представленной работе впервые исследована ростстимулирующая активность препарата на основе BtH₁ 800/15, а также его антифунгальное действие в отношении фитопатогенных грибов. Установлено, что препарат увеличивает всхожесть семян (от 6 до 21 %), высоту проростков (от 4 до 52 %) и длину корней (от 12 до 52 %) у различных сельскохозяйственных культур. Его ингибирующая активность в отношении фитопатогенов достигает 54 %.

Целью работы было изучение полифункциональных свойств препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15.

Методика. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH₁ 800/15) выделили из мертвых личинок колорадского жука, собранных в Ленинградской области, изучили культурально-морфологические, биохимические, серологические свойства штамма и идентифицировали его согласно классификации Н. De Barjas и А. Bonnefoi (34-36).

Для определения изолята методами молекулярной филогенетики использовали последовательности генов, кодирующие 16S рРНК и В-субъединицы (*gyrB*). Штамм 800/15 растили на среде ТУ в течение 1 сут, после чего 10⁸ клеток бактерий переносили в буфер TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) и инкубировали 10 мин при 95 °С. Полученную ДНК использовали для амплификации последовательностей, кодирующих 16S рРНК (праймеры 27f 5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (37) и *gyrB* (*gyrB_F* 5'-CTTGAAGGACT-AGARGCAGT-3', *gyrB_Rf* 5'-CCTTCACGAACATCYTCACC-3') (38) методом ПЦР. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл, включая 1 мкл бактериальной ДНК, 0,5 мкл каждого праймера и 10 мкл Fermentas-DreamTaq green PCR master mix («Thermo Fisher Scientific», США). ПЦР проводили с использованием термоциклера T100tm Thermal Cycler («Bio-Rad», США) по следующей программе: 15 мин при 95 °С (начальная денатурация); 30 с при 94 °С (денатурация), 30 с при 55 °С (отжиг), 1 мин при 72 °С (элонгация) (31 цикл); 10 мин при 72 °С (заключительная элонгация). Секвенирование проводили на оборудовании ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» (ФГБНУ ВНИИСХМ) по методу Сэнджера (39) Для определения штаммов, наиболее близких по последовательностям 16S рРНК и *gyrB*, использовали программу BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Штамм BtH₁ 800/15 был депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ФГБНУ ВНИИСХМ под регистрационным номером 611 в группе споровых микроорганизмов. Культуру BtH₁ 800/15 выращивали на плотных питательных средах — мясопептонном агаре (МПА) и на рыбном агаре (РА) при 28-30 °С до полного образования спор и кристаллического эндотоксина. Микроскопию выполняли с использованием черного анилинового красителя на 7-е сут (40). Продуктивность штамма определяли на дрожже-полисахаридных средах при выращивании глубинным способом в колбах Эрленмейера на качалке с аэрацией (220 об/мин) в течение 72 ч при 28 °С.

На основе этого штамма на базе филиала «Экос» ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург—Колпино) получили партии жидкого биологического препарата. Число клеток, энтомоцидную активность (в ЛК₅₀ для личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say природной популяции) и содержание экзотоксина (в ЛК₅₀ для личинок комнатной мухи *Musca domestica* Linn.) определяли согласно методике (32).

Антифунгальную активность Bt против различных фитопатогенных грибов определяли методом агаровых блоков в чашках Петри (41). Испы-

тивали препарат на основе штамма BtH₁ 800/15 в сравнении с препаратом на основе BtH₁₀ 56 (эталон). Тест-культурами служили фитопатогенные грибы *Botrytis cinerea* Pers. (штамм С-5), *Pythium* spp. (штамм С-2), *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shomaker (штамм С-20), *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. (штамм С-8), *F. solani* App. et Wr. (штамм С-15), *Verticillium dahlia* Kleb. (штамм 27). Жидкий препарат Bt (концентрация 5 %) вносили в расплавленную и охлажденную до 40 °С среду Чапека. На поверхность застывшего агара помещали блоки, вырезанные из 10-суточной культуры испытуемых грибов. Контролем служила среда без добавления препарата. Диаметр колоний гриба измеряли через 5 сут. Ингибирующую активность Bt учитывали по формуле W.S. Abbot (42):

$$X = \frac{Дк-До}{Дк} \times 100,$$

где X — степень ингибирования роста колоний гриба, %; Дк и До — диаметр колонии гриба соответственно в контроле и опыте, см.

Фиторегуляторную активность препарата на основе штамма BtH₁ 800/15 оценивали в лабораторных опытах по проращиванию семян в рулонах фильтровальной бумаги при 26 °С и влажности 86 %. Семена томата (*Solanum lycopersicum*), огурца (*Cucumis sativum*), кабачка (*Cucurbita pepo* var. *giromontina*), свеклы (*Beta vulgaris*), тыквы (*Cucurbita pepo*), капусты (*Brassica oleraceae*) замачивали на 3 ч в культуральной жидкости (КЖ) штамма BtH₁ 800/15 и в питательной среде (контроль). Через 5 сут учитывали всхожесть семян, через 3 нед измеряли высоту проростков и длину корней (43).

Полевые испытания эффективности жидкого препарата против массовых вредителей проводили в хозяйствах Ленинградской области, Краснодарского и Приморского края в 2014-2017 годах. Вегетирующие растения картофеля (*Solanum tuberosum*) обрабатывали суспензией жидкого препарата в период отрождения личинок колорадского жука L₁₋₂. В Краснодарском крае испытания проводили в полевых условиях на сое (*Glycine max*) против паутинного клеща (*Tetranychus urtica* L.) и в защищенном грунте на огурцах против паутинного клеща и белокрылки (*Trialeurodes vaporariorum* West.). Норма применения препарата — 15-20 л/га, расход рабочей жидкости — 200-400 л/га.

В Ленинградской области препарат испытывали на белокочанной капусте (*Brassica oleraceae*) против капустной моли (*Plutella xylostella* L.), капустной и репной белянок (*Pieris brassica* L., *P. rapae* L.), капустной совки (*Barathra brassicae* L.) (10-15 л/га), на крыжовнике (*Ribes viva-crispa*) против желтого крыжовникового пилильщика (*Pteronidea ribesii* Scop.) (20 л/га). В Приморском крае против картофельной коровки (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.) на картофеле испытывали биопрепарат и химический инсектицид Децис Экстра, КЭ (концентрат эмульсии) (Decis®, «Bayer AG», Германия) в рекомендуемых дозах применения — соответственно 15 и 0,03 л/га, а также при их совместном использовании в баковых смесях со снижением норм в 2 и 3 раза (7,5 л/га и 0,01 л/га).

Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 % (44). Рассчитывали средние (*M*) и стандартные ошибки средних ($\pm$ SEM). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при доверительном интервале 95 % (*p* < 0,05).

Результаты. На основании классического подхода (34-36) штамм 800/15 ранее был охарактеризован как *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Мы подтвердили его таксономическую принадлежность методами молекулярной систематики. С помощью программы BLAST были найдены штаммы, по-

следовательность 16S рПНК которых оказалась наиболее близка к 800/15 — *Bacillus cereus* VLS-S-1, *Bacillus thuringiensis* HC2, *Bacillus toyonensis* PgBe301. Следовательно, локус 16S рПНК был слишком консервативным для точной идентификации таксономического положения исследуемого штамма, однако позволил подтвердить его принадлежность к роду *Bacillus*.

Для уточнения филогенетического положения штамма 800/15 мы секвенировали ген *gyrB*, кодирующий В-субъединицу ДНК-гиразы. Этот локус менее консервативный, чем последовательность 16S рДНК, что позволяет различать филогенетически близкие группы. Последовательность *gyrB* штамма 800/15 была наиболее близка к последовательности штамма *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 и *Bacillus thuringiensis* Bt 407, ранее отнесенного к серотипу BtH₁ (37). То есть методом молекулярной систематики было подтверждено, что штамм 800/15 представляет собой *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Далее мы выяснили, обладает ли препарат на основе BtH₁ 800/15 полифункциональными свойствами. На первом этапе образцы проверяли на активность. Титр составлял 3,5-3,6±0,2 млрд КОЕ/мл, содержание экзотоксина для личинок *Musca domestica* в ЛК₅₀ — 3,1-3,2±0,1 мкл/г корма, энтомоцидная активность для личинок *Leptinotarsa decemlineata* в ЛК₅₀ — 0,26-0,28±0,02 %.

В полевых испытаниях биологическая эффективность полученного препарата достигала 70-100 % гибели насекомых (табл. 1). При применении препарата отмечали прибавку урожайности относительно контроля у картофеля (Ленинградская обл., Краснодарский край) и капусты (Ленинградская обл.) (данные не приведены).

1. Эффективность жидкого препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 против вредителей-фитофагов в различных географических зонах (2014-2017 годы)

Вид насекомого-вредителя	Географическая зона	Культура	Биологическая эффективность, %
Колорадский жук (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.)	Краснодарский край, Ленинградская область	Картофель	95,9-98,8
Картофельная коровка (<i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i> Motsch.)	Приморский край	Картофель	66,7-70,0
Паутинный клещ (<i>Tetranychus urticae</i> Koch.)	Краснодарский край	Огурцы	97,6-98,4
Белокрылка (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> West.)	Краснодарский край	Соя	95,8-96,2
Капустная моль (<i>Plutella maculipennis</i> Curt.)	Краснодарский край	Огурцы	99,8-100,0
Капустная белянка (<i>Pieris brassicae</i> L.)	Ленинградская область	Капуста	80,0-90,1
Репная белянка (<i>Pieris rapae</i> L.)	Ленинградская область	Капуста	94,7-95,6
Капустная совка (<i>Barathra brassicae</i> L.)	Ленинградская область	Капуста	84,5-96,7
Желтый крыжовниковый пилильщик (<i>Pteronidea ribesii</i> Scop.)	Ленинградская область	Капуста	90,0-92,8
	Ленинградская область	Крыжовник	70,8-72,4
Примечание. Диапазон значений эффективности препарата представлен на основе усредненных данных.			

Исследования в лабораторных условиях показали, что препарат не обладал фитотоксичностью для растений, более того, проявлял ростстимулирующее действие, включая увеличение всхожести семян свеклы и капусты на 6 %, огурцов — на 10 %, кабачков — на 21 %, томатов — на 11 %, тыквы — на 21 %; высоты проростков свеклы на 4 %, огурцов — на 8 %, кабачков — на 52 %, капусты — на 36 %, тыквы — на 38 %; длины корней свеклы на 12 %, огурцов — на 19 %, кабачков — на 52 %, томатов — на 28 %, капусты — на 48 %, тыквы — на 42 % (табл. 2). Исследуемые культуры по-разному реагировали на действие BtH₁ 800/15. На кабачках, томатах, капусте, тыкве стимуляция оказалась значительно выше в сравне-

2. Фиторегуляторная активность препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 в отношении различных сельскохозяйственных культур

Культура	Всхожесть семян, %			Высота проростков, см			Длина корней, см		
	контроль	после обработки		контроль	после обработки		контроль	после обработки	
		всего	к контролю, %		всего	к контролю, %		всего	к контролю, %
Свекла	92-96	99	106	4,2-5,0	4,8-5,1	104	3,5-4,0	3,8-4,7	112
Огурцы	87-90	99	110	4,6-5,3	5,2-5,7	108	4,9-5,2	4,9-5,2	119
Кабачки	77-80	91-96	120	9,7-10,2	11,4-15,7	142	14,0-15,9	14,0-15,9	152
Томаты	88-91	99	111	4,3-4,8	5,6-7,0	152	12,9-14,0	12,9-14,0	128
Капуста	92-94	99	106	4,9-5,9	7,1-7,9	136	4,8-5,3	4,8-5,3	148
Тыква	77-80	91-98	120	7,4-8,3	10,4-11,3	138	10,7-11,8	10,7-11,8	142

нии со свеклой и огурцами. Высота проростков при обработке семян томатов, капусты, тыквы, кабачков находилась в пределах от $6,4 \pm 0,7$ до $14 \pm 0,75$ см против показателей в контроле от $4,2 \pm 0,65$ до $9,9 \pm 0,25$ см (что, как уже отмечалось, на 36-52 % выше), длина корней в случае обработанных семян капусты, тыквы и кабачков составила $7,4 \pm 0,55$; $15,9 \pm 0,75$ и $22,5 \pm 0,9$ см значения в контроле соответственно $5,0 \pm 0,25$; $11,2 \pm 0,45$ и $14,8 \pm 0,75$ см (различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$). Препарат также достоверно стимулировал рост корней тыквы, капусты, кабачков (на 42-52 %).

Было установлено, что препарат на основе штамма BtH₁ 800/15 обладает антифунгальной активностью, однако она ниже, чем у препарата на основе штамма BtH₁₀ 56 (табл. 3). В среднем в отношении грибов *Botrytis cinerea* Pers., *Pythium* spp., *Bipolaris sorokiniana* и *Verticillium dahlia* для BtH₁ 800/15 ингибирование составило соответственно $51,15 \pm 1,75$; $40,35 \pm 1,65$; $21,55 \pm 1,45$ и $18,45 \pm 0,45$ %. Для дальнейшего отбора продуцента BtH₁ 800/15 на антифунгальную активность необходимо уточнять селекционные критерии, что запланировано на следующем этапе исследований.

3. Антифунгальная активность препаратов на основе штаммов *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (BtH₁) и *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* (BtH₁₀)

Вид фитопатогенного гриба	Ингибирование роста колоний гриба через 5 сут, %	
	BtH ₁ 800/15	BtH ₁₀ 56
<i>Botrytis cinerea</i> Pers (штамм C-5)	48,3-54,0	100
<i>Pythium</i> spp. (штамм C-2)	38,7-42,0	83,2-86,5
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc) Shoemaker (штамм C-20)	20,1-23,0	74,1-75,3
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) (Sacc) (штамм C-8)	0	50,0-51,2
<i>Fusarium solani</i> App. et Wr. (штамм C-3)	0	25,2-26,0
<i>Verticillium dahlia</i> Kleb. (штамм 27)	18,0-18,9	50,7-52,0

Примечание. Ингибирующую активность препарата рассчитывали по формуле W.S. Abbot (см. раздел «Методика»).

В Приморском крае мы сравнили действие препарата на основе штамма BtH₁ 800/15 и химического инсектицида Децис Экстра, КЭ на картофеле против картофельной коровки. Испытания показали, что биологическая эффективность при совместном применении препаратов в пониженных дозах не уступала таковой для химического эталона и составляла 100 % гибели картофельной коровки на 10-е сут после обработки растений. Следовательно, совместное использование указанных препаратов вполне уместно и экономически оправдано на картофельных полях при их заселенности вредителем с преобладанием личинок старших возрастов и имаго.

В лабораторных опытах было установлено, что химический препарат Децис Экстра, КЭ не оказывал отрицательного влияния на жизнеспособность BtH₁ как в сублетальных дозах, так и в повышенных рекомендуемых концентрациях при совместном применении.

Совместное использование биопрепаратов с химическими средствами защиты растений приводит к снижению стрессового воздействия на растения и повышению экономической эффективности препаратов за счет снижения норм расхода. Синергетический эффект применения биологических препаратов на основе *B. thuringiensis* совместно с химическими инсектицидами отмечен в специальной литературе. Так, использование бактокулицида (на основе *B. thuringiensis* var. *israelensis*) в сочетании с ингибитором синтеза хитина димилином в сниженных (в 4-8 раз) дозах вызывало гибель личинок шампиньонного комарика *Lycoriella solani* Winn. до 91,2 % и прибавку урожая до 58,6 % (45). Е.А. Иванцова, оценивая действие бацикола (на основе *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis*) против вреди-

телей горчицы совместно с инсектицидом Фастак (Fastac®, «BASF SE», Германия) в малотоксических дозах, отмечала их взаимно усиливающий эффект (46). Показана высокая эффективность бактокулицида против рисового комарика *Cricotopus silvestris* Fabr. в сочетании с гербицидами Пропонит (Proponit®, «Arysta LifeScience S.A.S.», Франция), Базагран (Basagran®, «BASF SE», Германия), 2М-4Х (МСПА, «Bayer AG», Германия), Ордрам (Ordram®, «Syngenta AG», Швейцария). Отрицательного действия гербицидов на жизнеспособность бактерии *B. thuringiensis* var. *israelensis* не выявлено (47).

Таким образом, препарат, полученный на основе штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15, обладает энтомоцидной активностью, рост-стимулирующим и антифунгальным свойствами. Он перспективен для использования против опасных массовых вредителей на широком круге сельскохозяйственных растений (картофеле, крестоцветных культурах и ягодниках). Представляется экономически и экологически оправданным совместное применение препарата с химическим инсектицидом при заселенности картофельных полей личинками старших возрастов и имаго *Leptinotarsa decemlineata* Say. и *Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: svetagrishechkina@mail.ru ✉, ermolovavalya1940@mail.ru,
k.antonets@arriam.ru, m.belousova@arriam.ru, vyahno@yandex.ru,
ant.nizhnicov@gmail.com;

²ФГБНУ Дальневосточный НИИ защиты растений,
692682 Россия, Приморский край, с. Камень-Рыболов, ул. Мира, 42-а,
e-mail: biometod@rambler.ru

Поступила в редакцию
23 сентября 2018 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 3, pp. 494–504

POLYFUNCTIONAL PROPERTIES OF THE *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* INDUSTRIAL STRAIN 800/15

S.D. Grishechkina¹, V.P. Ermolova¹, T.K. Kovalenko², K.S. Antonets¹, M.E. Belousova¹,
V.V. Yakhno¹, A.A. Nizhnikov¹

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia,
e-mail svetagrishechkina@mail.ru (✉ corresponding author), ermolovavalya1940@mail.ru, k.antonets@arriam.ru,
m.belousova@arriam.ru, vyahno@yandex.ru, ant.nizhnicov@gmail.com;

²Far-Eastern Research Institute of Plant Protection, 42-a, ul. Mira, s. Kamen-Rybolov, Primorskii Krai, 692682
Russia, e-mail biometod@rambler.ru

ORCID:

Grishechkina S.D. orcid.org/0000-0002-4877-705X

Belousova M.V. orcid.org/0000-0002-2886-026X

Ermolova V.P. orcid.org/0000-0002-9473-8334

Yakhno V.V. orcid.org/0000-0001-7953-3405

Kovalenko T.K. orcid.org/0000-0003-1432-4500

Nizhnikov A.A. orcid.org/0000-0002-8338-3494

Antonets K.S. orcid.org/0000-0002-8575-2601

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the project of applied research and experimental development (PNIER) batch 2017-14-579-0030 on the topic «Creation of microbiological preparations for expanding the adaptive capacity of agricultural crops for nutrition, resistance to stress and pathogens» (code of the application 2017-14-579-0030-013), Agreement No. 14.607.21.0178, a unique identifier RFMEFI60717X0178

Received September 23, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2019.3.494eng

Abstract

Crop losses caused by pests can reach 40–50 % and even more. Application of biological methods for regulation of the harmful species is promising and providing ecological safety. Biological preparations based on the living cultures of microorganisms and their metabolites meet these requirements. Currently, the crystal-forming bacterium *Bacillus thuringiensis* is considered to be the most important species for production of biological insecticides, since this bacterium exhibits high specificity in relation to the target pathogens, safety for humans and the environment. At ARRIAM, the biological preparation based on the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (BtH₁) 800/15 strain

was developed. The strain was isolated from larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) in the Leningrad region, studied for culture-morphological, biochemical and serological properties and identified according to the classification of De Barjac and Bonnefoi. Sequencing of the genes encoding 16S RNA and B-subunit of the DNA-gyrase (GyrB) confirmed that the isolated strain 800/15 belongs to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. The BtH₁ 800/15 strain was deposited in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM) under the registration number 611 (Patent of the Russian Federation RU 2514211 C1 of 27.04.2014). This paper is the first to report that the BtH₁ 800/15-based biologicals increases the germination of seeds, the height of seedlings and the root length of various crops, and also revealed the inhibitory activity against phytopathogenic fungi. The goal of this study was to investigate whether the biological preparation based on the BtH₁ 800/15 strain has multifunctional properties including entomocidal activity against mass insect pests of crops, growth-stimulating effect on economically significant plant species and antifungal activity against phytopathogenic fungi. The preparation based on the BtH₁ 800/15 strain is a liquid that is easily diluted with water to the required concentration and contains the components of the cultural medium, spores and entomocidal exo- and endotoxins. The initial values of the biological activity of the preparation were as follows: titer was 3.5×10^9 CFU/ml, exotoxin content for the *Musca domestica* Linn. larvae in LC₅₀ was 3.1 µl/g of feed, entomocidal activity for the larvae of the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say. in LC₅₀ was 0,28 %. The paper presents the data of field trials of the effectiveness of the preparation carried out on different agricultural crops in the period of 2014–2017 in the Leningrad Region, Krasnodar and Primorsky Krai against phytophagous insects, the Colorado beetle (*L. decemlineata* Say.), the 28-spotted potato ladybird (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.), the diamondback moth (*Plutella xylostella* L.), the cabbage white and the small white (*Pieris brassica* L., *P. rapae* L.), cabbage moth (*Barathra brassicae* L.), gooseberry sawfly (*Pteronidea ribesii* Scop.), red spider mite (*Tetranychus urtica* Koch.) and whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* West.). Field tests demonstrated the effectiveness of this biological preparation against harmful phytophagous insects (66.7–100 %). The laboratory tests revealed that the preparation did not exhibit phytotoxicity, moreover, it showed a growth-stimulating effect on the seed germination (up to 32 %), as well as the height of seedlings and root length (up to 52 %). The efficacy of the preparation against phytopathogenic fungi did not exceed 54 % and was inferior to the preparation based on the BtH₁₀ strain 56. The combined use of the biological preparation based on the BtH₁ 800/15 strain with the chemical insecticide Decis Extra, CE (emulsion concentrate) on potato against *H. vigintioctomaculata* Motsch. was very efficient (100 %) even if the application rates were reduced 2 and 3 times, respectively. This combination of biological and chemical insecticides is economically valuable and can be successfully used in potato fields when they are pest-infected, with the predominance of larvae of older ages and imago, which allows a significant reduction of the pesticide load. Overall, data obtained show that the biological preparation based on the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* strain 800/15 has multifunctional properties, including entomocidal, antifungal and growth-stimulating activities, and is also promising for joint use with chemical insecticides.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, phytophagous insects, phytopathogens, polyfunctional properties, entomocidal, antifungal and growth-stimulating activity.

REFERENCES

1. Olson S. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*, 2015, 26(5): 203–206 (doi: 10.1564/v26_oct_04).
2. Siegel J.P. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*- Based Insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 77(1): 13–21 (doi: 10.1006/jipa.2000.5000).
3. Raymond B., Federici B.A. In deference of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most success the microbial insecticide available to humanity — a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(7): fix084 (doi: 10.1093/femsec/fix084).
4. Kandybin N.V., Patyka T.I., Ermolova V.P., Patyka I.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis*. St. Petersburg—Pushkin, 2009 (in Russ.).
5. Polanczyk R.A., Pires da Silva R.F., Fiuza L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiperla* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 2000, 31(3): 165–167 (doi: 10.1590/S1517-83822000000300003).
6. Eswarapriya B., Gopalsamy B., Kameswari B., Meera R., Devi P. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* IBt-15 strain against *Plutella xylostella*. *International Journal of PharmTech Research*, 2010, 2(3): 2048–2053.
7. Seo D.J., Nguyen D.M.S., Song Y.S., Jung W.J. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plants by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 22(3): 407–415 (doi: 10.4014/jmb.1107.07027).
8. Martinez-Absalón S., Rojas-Solis D., Hernández-Leyn R., Prieto-Barajas C., Orozco-Mosqueda M., Peña-Cabiales J.J., Sakuda S., Valencia-Cantero E., Santoyo G. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 2014, 24(12): 1000–1008 (doi: 10.1007/s10526-014-9999-9).

- 1349-1362 (doi: 10.1080/09583157.2014.940846).
9. Heydari A., Pessaraki M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 2010, 1(4): 273-290 (doi: 10.3923/jbs.2010.273.290).
10. Mohammed S.H., El Saedy M.A., Enan M.R., Nasser E.I., Ghareeb A., Salah A.M. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Cell Mol. Biol.*, 2008, 7(1): 57-66.
11. Pane C., Vilecco D., Campanile F., Zaccardelli M. Novel strains of *Bacillus* isolated from compost and compost-amended soils as biological control agents against soil-borne phytopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22(12): 1373-1388 (doi: 10.1080/09583157.2012.729143).
12. Akram W., Mahboob A., Jave A.A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2013, 3(4): 275-280 (doi: 10.1556/EuJMI.3.2013.4.7).
13. Tao A., Pang F., Huang S., Yu G., Li B., Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flag smut. *Bio-control Science and Technology*, 2014, 24(8): 901-924 (doi: 10.1080/09583157.2014.904502).
14. Smirnov O.V. *Patotipy Bacillus thuringiensis i ekologicheskie osnovy ikh ispol'zovaniya v zashchite rastenii. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Pathotypes of *Bacillus thuringiensis* and the ecological basis of their use in plant protection. DSc Thesis]. Petersburg—Pushkin, 2000 (in Russ.).
15. Shrestha A., Sultana R., Chae J.-C., Kim K., Lee K.-J. *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2015, 142(3): 577-589 (doi: 10.1007/s10658-015-0636-5).
16. Loseva O., Ibrahim M., Candas M., Koller C.N., Bauer L.S., Bulla Jr L.A. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Solorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(5): 567-577 (doi: 10.1016/S0965-1748(01)00137-0).
17. Zhong C.H., Ellar D.J., Bishop A., Johnson C., Lin S.S., Hart E.R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(2): 131-139 (doi: 10.1006/jipa.2000.4962).
18. Aronson A.I., Shai Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195(1): 1-8 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10489.x).
19. Knaak N., Rohr A., Fiuza L. In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice-field. *Brazil. J. Microbiol.*, 2007, 38(3): 526-530 (doi: 10.1590/S1517-83822007000300027).
20. Shternshis M.V., Belyaev A.A., Tsvetkova V.P. Shpatova T.V., Lelyak A.A., Bakhvalov S.A. *Biopreparaty na osnove bakterii roda Bacillus dlya upravleniya zdorov'em rastenii* [*Bacillus*-based biological products for plant health management]. Novosibirsk, 2016 (in Russ.).
21. Wagner W., Möhrle F., Schnetter W. Characterization of the proteolytic enzymes in the mid-gut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32(7): 803-814 (doi: 10.1016/S0965-1748(01)00167-9).
22. Smirnov O.V., Grisechekina S.D. Polyfunctional activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2011, 3: 123-126 (in Russ.).
23. Reyes-Ramírez A., Escudero-Abarca B.I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., Barboza-Corona J.E. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the bio-control of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *Journal of Food Science*, 2004, 69(5): M131-M134 (doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10721.x).
24. Xiao L., Xie C.-C., Cai J., Lin Z.-J., Chen Y.-H. Identification and characterization of chitinase producing *Bacillus* slowing significant antifungal activity. *Curr. Microbiol.*, 2009, 58(5): 528-533 (doi: 10.1007/s00284-009-9363-5).
25. Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.-T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(5): 942-949 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x).
26. Yáñez-Mendizábal V., Zerriouh H., Viñas I., Torres R., Usall J., de Vicente A., Pérez-García A., Teixidó N. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2011, 132(4): 609-619 (doi: 10.1007/s10658-011-9905-0).
27. Elkahoui S., Djébalin N., Karkouch I., Hadj Ibrahim A., Kalai L., Bachkouel S., Tabbene O., Limam F. Mass spectrometry identification of antifungal lipopeptides from *Bacillus* sp. BCLRB2 against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2014, 50(2): 161-165 (doi: 10.1134/S0003683814020082).
28. Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants — With special reference to induced systemic resistance (ISP). *Microbiological Research*, 2009, 164(5): 493-513 (doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007).
29. Kumar P., Dubey R.C., Maheshwari D.K. *Bacillus* strain isolated from rhizosphere showed

- plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 2012, 167(8): 493-499 (doi: 10.1016/j.micres.2012.05.002).
30. Chebotar' V.K., Naumkina T.S., Borisov A.Yu. *Kompleksnoe mikrobnoe udobrenie «Bisolibimiks»* /Pod redaktsiei A.Yu. Borisova [Complex microbial fertilizer Bisolibimix. A.Yu. Borisov (ed.)]. St. Petersburg, 2015 (in Russ.).
 31. Partida-Martínez L.P., Heil M. The microbe-free plant root: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2(100): 1-16 (doi: 10.3389/fpls.2011.00100).
 32. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Minina G.N., Safronova V.I., Bologova E.V. *Metodika. Kolleksiya shtammov bakterii-simbiontov vrednykh nasekomykh i gryzunov, prigodnykh dlya bio-kontrolya chislennosti vreditel' sel'skokhozyaistvennykh rastenii* [Collection of bacterial symbionts in harmful insects and rodents, suitable for biocontrol of agricultural plant pests]. St. Petersburg, 2014 (in Russ.).
 33. Tikhonovich I.A., Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Romanova T.A. *Shtamm bakterii Bacillus thuringiensis var. thuringiensis №800/15 v kachestve sredstva dlya polucheniya entomotsidnogo biopreparata*. Patent RU 2514211 S1. Zayavl. 10.10.2012. Opubl. 27.04.2014. Byul. № 12 [The strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* №800/15 for entomocidal biopreparation. Patent RU 2514211 S1. Claims 10.10.2012. Publ. 27.04.2014. Bul. № 12] (in Russ.).
 34. De Barjac H., Bonnefoi A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, 1962, 7(1): 5-31 (doi: 10.1007/BF02375988).
 35. De Barjac H., Bonnefoi A. A classification strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1968, 11(3): 335-347 (doi: 10.1016/0022-2011(68)90182-1).
 36. De Barjac H., Bonnefoi A. Misse au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*, 1973, 18(1): 5-17 (doi: 10.1007/BF02373009).
 37. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid technics in bacterial systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, NY, 1991: 115-175.
 38. Punina N.V., Zotov V.S., Parkhomenko A.L., Parkhomenko T.U., Topunov A.F. Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and *gyrB* genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*, 2013, 5(1): 90-100.
 39. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74(12): 5463-5467 (doi: 10.1073/pnas.74.12.5463).
 40. Kol'chevskii A.G., Rybina L.M., Kolomiets V.Ya. *Vydelenie i otbor vysokovirulentnykh kul'tur Bacillus thuringiensis var. galleriae. Metodicheskie rekomendatsii* /Pod redaktsiei V.A. Pavlyushina [Isolation and selection of highly virulent cultures of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*. Guidelines. V.A. Pavlyushin (ed.)]. Leningrad, 1987 (in Russ.).
 41. *Metody eksperimental'noi mikologii* /Pod redaktsiei V.I. Bilai [Methods of experimental mycology. V.I. Bilai (ed.)]. Kiev, 1982 (in Russ.).
 42. Abbot W.S. A method for computing the effectiveness of insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 1925, 18(2): 265-267 (doi: 10.1093/jee/18.2.265a).
 43. Benken A.A., Khatskevich L.K., Grishechkina S.D. *Uskorennyi metod otsenki bolezneustoichivosti sortoobraztsov yachmenya i paraziticheskikh svoystv vzbuditelya fuzarioznoi kornevoi gnili. Informatsionnyi listok* [A rapid assessment of disease resistance in barley varieties and parasitic activity of the Fusarium root rot causative agent]. St. Petersburg, 1983 (in Russ.).
 44. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1985 (in Russ.).
 45. Mokrousova E.P., Glazunova I.N., Kandybin N.V., Ermolova V.P. *Sovmestnoe primeneniye inhibitorov sinteza khitina s mikrobiologicheskimi preparatami protiv vreditel' shampin'onov. Problemy entomologii v Rossii* [Combined use of chitin synthesis inhibitors with microbiological preparations against champignon pests. Problems of entomology in Russia. Vol. 2]. St. Petersburg, 1998, tom 2: 40-41 (in Russ.).
 46. Ivantsova E.A. *Optimizatsiya fitosanitarnogo sostoyaniya agrobiotsenozov Nizhnego Povolzh'ya. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Optimization of the phytosanitary state of agrobiocenoses in the condition Lower Volga region. DSc Thesis]. Saratov, 2009 (in Russ.).
 47. Stus' A.A., Ermolova V.P., Kandybin N.V. *Byull. VNIISKHM*, 1989, 52: 25-27 (in Russ.).