

doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj82.01.062>

УДК 631.147:632.937:579.64

СИМБІОНТНІ МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ КОМАХ: ФУНКЦІОНУВАННЯ ТА ІНІЦІАЦІЯ ПОТЕНЦІАЛУ ЕНТОМОПАТОГЕННОЇ ДІЇ НА ПРИКЛАДІ *BACILLUS THURINGIENSIS*

М.В. Пати́ка, Т.І. Пати́ка

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, корп. 4, Київ, 03041, Україна
e-mail: nptyka@gmail.com*

*В огляді наведено сучасні літературні дані та власні експериментальні дослідження щодо мікросимбіонтів, які функціонують, циркулюють та проявляють різнорівневу експресію ентомопатогенної дії в організмах різних видів комах. На сьогодні особливу наукову та практичну цінність мають комплексні роботи щодо скринінгу, дослідження біому спорових бактерій *Bacillus thuringiensis* в різних еконішах, аналізу їх специфічних ентомотоксичних взаємодій з цільовим макроорганізмом. Екзоклітинний мікробіом здорових та хворих комах локалізується, в основному, на покривах, ротовому апараті та в кишечнику і найчастіше перерозподіляється у черевній порожнині та внутрішніх органах господаря. Мікробний екзометагеном більш складний і функціонально різноманітніший за внутрішньоклітинний, тому широко досліджується і використовується у мікробіологічному контролі фітофагів. Актуальний науковий напрямок таких досліджень розвивається з поглибленням знань щодо експресії генів *Cry B. thuringiensis* та регуляторних факторів, що діють на транскрипційному, посттранскрипційному, метаболічному і посттрансляційному рівнях. Тому система «ентомопатогенні бактерії *B. thuringiensis* – фітофаг» розглядається як ефективна модель для вивчення взаємодії та еволюційної екології бактеріальної вірулентності.*

*Ключові слова: мікробіом, бактеріальні симбіонти, ентомопатогенні бактерії *B. thuringiensis*, мікробіологічний контроль.*

Мікробіом кишечника комах є важливим і ключовим фактором, що обумовлює нормальну життєдіяльність організму. Мікросимбіонти та їх текстура (закономірність розподілу в кишечнику), в свою чергу, відіграють важливу роль в життєдіяльності, трофізмі та, відповідно, подальшому метаморфозі комах [1, 2, 3]. За обсягом закодованої метагеномної інформації мікробіоми рослин і тварин багаторазово перевершують своїх господарів, значно розширюючи їх функціональність та підвищуючи адаптивний потенціал. За час еволюційного розвитку симбіотичних взаємодій симбіонт може повністю втрачати здатність до існування поза межами хазяїна (рослина, комаха, тварина) та переходити в невід'ємну частину свого господаря (господар при цьому може втратити можливість синтезу або трансформації тих чи інших речовин і також перестати бути «автономним»

організмом). Мікросимбіонтні системи можуть перешкоджати утворенню нових видів, впливати на активність і життєздатність гібридів близькоспоріднених видів.

Отже, симбіонти виступають як індуктори активації взаємодій різних рівнів (перетворення морфо-функціональних перебудов на молекулярному, клітинному, субклітинному, організмовому, популяційному рівнях). На сьогодні вони розглядаються як один із факторів еволюції видів комах, а симбіотичні бактерії здатні викликати різнорівневі ефекти за типом цитоплазматичної несумісності, фертильності, загибелі особин-самців та інше, а також можуть передаватися спадково за материнськими лініями і водночас – змінювати особливості розмноження господаря. Симбіонтні мікробні угруповання забезпечують кохам-господарям використання важко засвоєваних поживних субстратів,

трофічні та імунні функції в цілому, а також адаптацію до різних стресових біотичних і абіотичних факторів, вплив на метаморфоз та його регулювання [1, 2, 4, 5].

Специфіка текстури мікросимбіонтів: закономірності поширення і заселення

Локалізація мікросимбіонтів спостерігається переважно в порожнині кишечника, в спеціальних відростках передньої кишки. Іноді вони знаходяться всередині кишкових клітин (жуки точильники, личинки, пов'язані з деревиною та ін.). У деяких твердокрилих (довгоносики, листоїди) симбіонти живуть і функціонують в клітинах мальпігієвих судин. У багатьох комах симбіонти знаходяться в жировому тілі або статевих залозах. Отже клітини, в яких існують симбіонти (міцетоцити), часто відокремлюються морфологічно в так званій «міцетом». Міцетом та симбіонти, які живуть в ньому, трапляються практично у всіх особин одного виду (наприклад, представники *Homoptera*), що істотно відрізняє це явище від паразитизму, так як паразити завжди присутні у частині особин хазяїна. Симбіонти передаються потомству через статеві клітини (трансоваріальний «зародковий» шлях). А в тілі комахи знаходиться переважно один вид міцетома, іноді більше. Слід зазначити, що суттєвими ознаками симбіотичних комахо-мікробних систем вважаються перманентність та специфічність партнерів, що підвищується під час формування їх взаємозв'язків [6]. В цьому відношенні у комах, що мають високу складність ендосимбіотичних взаємодій, взаємопов'язаність партнерів доходить до повної втрати функціональної автономності (наприклад, у представників рівнокрилих). Враховуючи тісний морфо-функціональний зв'язок ендосимбіотичних мікроорганізмів з клітинами господаря і той факт, що ендосимбіонти існують лише в клітинах господаря, Schwemmler [7] запропонував називати їх ендосимбіонтами, а подібні взаємодії – ендосимбіотозом (будь-які внутрішньоклітинні форми існування як симбіотичних, так і паразитичних та інших організмів).

Вперше на клітини тканин комах, які містять симбіонти (міцетоми), звернули увагу дослідники Huxley (1858), Balbiani (1866–1877) [8, 9], які виявили їх у попелиць (*Aphidae*), щитівки (*Lecanium hesperidum*). Пізніше (1888) з'явилися відомості про наявність подібних утворень в оболонках фолікулів і в яйцекладках мурашок, тарганів. Бактеріальну природу цих

тілець підтвердили Красильщик (1890), Hengen (1904) [10]. Детальні дослідження міцетомів та їх симбіозу з комахами провели Бухнер (1939), Штейнхауз (1952) [11]. На сьогодні величезне різноманіття ґрунтових мікроорганізмів і комах передбачає найрізноманітніші асоціації між ними, включаючи симбіози (кишкові в тому числі).

Багато експериментальних даних різних років щодо симбіонтів *Wolbachia*, де господарем є інфіковані двокрили (комахи р. *Culex*), представлено в оригінальних працях ряду авторів [12–15]. Так, у сонечок *Adalia bipunctata* виявлено зараження симбіотичними мікроорганізмами *Rickettsia*, що викликають загибель особин чоловічої статі [16]. Доведено, що симбіотичні бактерії вступають у різні взаємодії з господарями, надаючи цільові, точкові, так звані «витончені» ефекти, не тільки через маніпуляцію репродукційними функціями господаря, але і захист господаря від природних ворогів [17]. Кожен з цих ефектів окремо або в комплексі дозволяє симбіонтам швидко поширюватися в межах популяції комах, оскільки вони мають позитивну роль для інфікованих особин (самок). Ці ефекти є також екологічно та еволюційно значущими і для конкретного інфікованого виду-господаря, викликаючи іноді репродуктивну ізоляцію або зміни в статевій поведінці [18, 19]. Для ряду видів комах інфікування симбіонтами призводить до зниження поліморфізму мтДНК [20].

У захисних симбіонтів здатність до зменшення активності фітофагів могла виникнути до початку активної взаємодії з самими рослинами (у ході коеволуції мікроорганізмів з фітопатогенами або фітофагами, тобто рослини культивують вже сформованих «ворогів своїх ворогів»). Наприклад, *Pseudomonas* і *Serratia* мають здатність до мікофагії, лізуючи гіфи мікроміцетів позаклітинними хітиназами. Багато штамів аскоміцетів роду *Cordyceps* є безсимптомними ендо- та епіфітами рослин і проходять повний розвиток в тілі комахи-жертви [21].

Мікросимбіонти комах можуть бути генетично спеціалізованими до симбіозу, однак зберігають здатність до автономного існування (переважно для факультативних форм). В організмі господаря локалізуються, як правило, позаклітинно – в кишечнику, гемолімфі або слинних залозах. Для облигатних мікросимбіонтів (не здатних до автономного існування в зв'язку з втратою значної частини геному) характерна

локалізація в клітинах господаря. Для більшості внутрішньоклітинних симбіонтів (ендоцитобіонтів) комах характерна вертикальна передача генетичної інформації при їх розмноженні, яка обумовлена втратою мікроорганізмами багатьох генів «домашнього господарства», включаючи гени реплікації, транскрипції і трансляції. Для деяких облигатних симбіонтів притаманна ампліфікація генів, що виконують корисні для господарів функції, наприклад, синтез незамінних амінокислот. У цих симбіонтів виявлена підвищена швидкість накопичення мутацій, включаючи несинонімічні нуклеотидні заміни, що відображає ослаблення в їх популяціях стабілізуючого відбору та посилення генетичного дрейфу, які сприяють редукції геному. Перенесення деяких мікробних генів в ядерні хромосоми комах дозволяє їм виконувати нові метаболічні функції, наприклад, використовувати дефіцитні або неспецифічні поживні субстрати. Внутрішньоклітинні симбіонти комах можуть бути використані як моделі для реконструкції ранніх етапів еволюції клітинних органел, пов'язаних з редукцією різних життєво важливих генів симбіонтів і втратою ними генетичної індивідуальності (наприклад, здатності до самостійної підтримки та експресії залишкового геному) [22].

Ефективна модельна система «ентомопатогенні бактерії *B. thuringiensis* – фітофаг»

Генетичний аналіз мікросимбіонтів комах розширює можливості їх практичного використання, що може бути пов'язано з мікробіологічним контролем фітофагів, переносників інфекційних захворювань і стимуляцією розвитку корисних видів (медоносів, запилювачів, антагоністів сільськогосподарських комах-шкідників та ін.). Генетичне вдосконалення природних штамів *B. thuringiensis* (*Bt*-рекомбінації) є перспективним шляхом підвищення біологічної активності та економічної ефективності ентомопродуктів для нових біотехнологічних розробок. Це дозволяє розробити біопестициди нового покоління з підвищеною резистентністю щодо цільових об'єктів, розширює спектр використання конкретних бактеріальних культур, поліпшує стійкість рослин та дозволяє оптимізувати процеси ферментації. Різні види спорових бактерій роду *Bacillus* мають важливі біотехнологічні застосування. Одні з них здійснюються шляхом продукування вторинних метаболітів, які є об'єктом дослідження хімії природних

продуктів. Скринінг мікробних метаболітів показує значну структурну різноманітність природних сполук з широкими біологічними властивостями, такими, як протимікробна, протівірусна, імуносупресивна і протипухлинна, які дозволяють бактеріям вижити в природному середовищі. Ці результати розширюють цільовий діапазон мікроорганізмів *Bacillus* spp. [3, 23, 24].

З точки зору експериментального вивчення механізмів еволюції, набуттям нових генних систем, які використовуються для розвитку симбіозу, модифікацій структури геному як на рівні індивідуальних штамів, так і видів та родів бактерій (пангеномів), пріоритет надається бактеріальним моделям. Домінантне положення серед комплексу ентомопатогенних мікроорганізмів, які відомі в світі та використовуються в біотехнологіях, займають бактерії *B. thuringiensis*. Інтродукція мікробних агентів *B. thuringiensis* у агроєкосистеми є ефективним методом корекції мікробіоти ґрунту, ризосфери, трофічної структури метаболізму багатокомпонентних біологічних систем, зокрема, «ґрунт–рослина–фітофаг», а також покращення росту та розвитку рослин та підвищення їх врожайності. Вивченню і вирішенню цих проблем були присвячені дослідження закордонних та вітчизняних вчених [1, 4, 25–28].

Різноманітність спороутворюючих бактерій *B. thuringiensis*, продукуючих параспоровий кристалічний токсин, з кожним роком поповнюється новими серологічними типами. Вони відрізняються технологічністю, набором біологічно активних метаболітів, поліфункціональністю щодо цільових об'єктів (антифідантною, ентомотоксичною дією та ін.), що обумовлює високу біологічну, техніко-економічну ефективність біопрепаратів на їх основі. На сьогодні особливу наукову та практичну цінність акумулюють комплексні роботи щодо скринінгу, дослідження генетичного профілю, різноманіття ендоспорових бактерій в різних еконішах, аналізу їх морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних ознак та ентомопатогенних властивостей продуцентів [24, 29–31].

Вивчення біологічного потенціалу природних метаболітів ентомопатогенних спорових бактерій *B. thuringiensis*, їх метагеному дозволяє створювати серії високоефективних біопрепаратів для контролю чисельності фітофагів, розробляти біотехнологію їх виробництва та застосування в агробіоценозах.

Спороутворюючі бактерії *B. thuringiensis* продукують комплекс біологічно активних метаболітів, ентомотоксинів (δ -ендо-, β -екзотоксини та інші), тому різноманіття серологічних варіантів всередині виду значно варіює за технологічністю, продуктивністю у ферментаційних процесах, а також поліфункціональними властивостями щодо цільових об'єктів (наприклад, спектр антифідантних, ентомотоксичних ефектів, антифунгальна дія тощо). Таким чином, це обумовлює високу біологічну, техніко-економічну ефективність мікробних препаратів на основі нових технологічних штамів *B. thuringiensis*.

Здатність продукувати термостабільний β -екзотоксин властива не всім різновидам *B. thuringiensis*, а відзначена у серотипів: *thuringiensis*, *alesti*, *dendrolimus*, *sotto*, *galleriae*, *morrisoni*, *ostrinae*, *tolworthi*, *darmstadiensis*. Екзотоксин характеризується широким спектром дії на комах і здатний викликати мутаційні ефекти на особин. На відміну від δ -ендотоксину, дія екзотоксину спрямована на личинки комах старших вікових груп, що пояснюється його впливом, перш за все, на клітини, що розвиваються в період метаморфозу [1, 5, 32]. У зв'язку з тим, що термостабільний екзотоксин має тератогенну дію на комах, важливого значення набувають дослідження, спрямовані на виявлення мутагенного, гонадотоксичного, тератогенного та інших можливих ефектів впливу. Успіх у поліпшенні ентомотоксичної (ентомоцидної) активності шляхом генетичної еволюції *Cry* токсинів буде залежати від знання кроків лімітуючої *Cry* токсичності у різних комах-шкідників, відображення специфічності зв'язування регіонів у *Cry* токсинів, а також вдосконалення стратегій мутагенезу і процедури відбору. У сучасних умовах фундаментальні та прикладні дослідження біоагентів патологічного варіанту *thuringiensis*, ефективних проти широкого спектру комах (*Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), комплексне вивчення особливостей взаємовідносин «патоген – хазяїн» та створення біологічних препаратів поліфункціональної дії на основі *Bt* для аграрних біотехнологій є надзвичайно актуальними напрямками.

Основною передумовою проведення комплексних досліджень бактеріальних симбіонтів комах та правильного підходу щодо вивчення природи взаємодії мікроорганізмів і комах є виявлення етіологічного фактору їх ентомопатогенної дії та точної ідентифікації збудника інфекційного процесу з урахуванням умов, які

можуть активно впливати на розвиток і напруженість взаємодій мікро- і макроорганізму, «патоген – хазяїн». Для скринінгових досліджень і обстеження різноманітних біотопів з високою щільністю комах-шкідників нами проведено збір, ізоляцію здорових, хворих особин (гусени, личинки, лялечки, імаго) та мікробіологічні пасажі на поживні агаризовані середовища різного складу (наприклад, м'ясо-пептонний, глюкозо-пептонний, картопляний агар, середовище капустияне, горохове, Luria-Bertani, Чапека та ін.) з метою отримання аксенічних культур мікроорганізмів. За класичними методами проводять інкубування мікробних ізолятів в термостаті за температури 28–30°C протягом 7–10 діб з послідовним вивченням морфологічного фенотипу колоній і мікроскопіюванням з використанням імерсії на світловому мікроскопі та з фотофіксацією (збільшення 100x) або сучасну систему флуоресцентної візуалізації клітин.

Оскільки основним середовищем існування мікосимбіонтів в організмі комах є кишечник, а його мікробіота відіграє суттєву роль в процесах травлення, саме фрагменти кишечника становлять науковий інтерес для подальших мікробіологічних досліджень. Бактеріальні симбіонти комах можуть позитивно впливати на метаболізм свого господаря, зокрема – покращувати засвоєння поживних речовин при недостатньому харчуванні, дефіциті кормової бази тощо. Крім того, вони можуть активізувати захисні функції щодо патогенної мікробіоти та здійснювати детоксикацію пестицидів або шкідливих вторинних метаболітів рослин. Кишковий мікробіом комах, наприклад лускокрилих (*Lepidoptera*), значно різниться між видами і всередині видів, що призводить до протиріччя щодо функціональної значущості кишкових мікроорганізмів у комах цього порядку. Тут важливі поточні знання про склад кишкових мікробних угруповань у лускокрилих і з'ясування причин мінливості в кишковому мікробіомі комах, в тому числі шляхів перенесення і можливі функціональні характеристики мікроорганізмів, в тому числі ентомопатогенних. Наші знання щодо бактеріальних асоціацій або угруповань лускокрилих все ще недостатні, в основному дослідники зосереджуються на описовому характері та личинкової стадії розвитку без потенційного впливу на ознаки господаря.

Склад і стійкість кишкових бактеріальних угруповань в живих організмах сильно варіює – понад 1000 філотипів у людини до декількох со-

тень у термітів і кількох десятків у лускокрилих (до майже повної відсутності бактерій в кишечнику попелиць) [33]. Із комах різного видового складу у період 2017–2019 рр. нами ізольовано понад 37 аксенічних культур, з яких більше 20 спорових форм (переважно *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. mycooides*) [34–38], які зберігаються в робочій колекції непатогенних культур агробіотехнологічного призначення кафедри екобі-

отехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України (НУБіП) (табл. 1). Перераховані культури ізолятів виявилися одиничними, хоча були виділені зі стації збору комах, які мали явні ознаки масової епізоотії. В залежності від середовища існування, образу життєдіяльності та харчування склад нормальної мікробіоти кишечника у комах вельми різноманітний.

Таблиця 1

Мікросимбіонти, ізольовані з загиблих та хворих комах зони Лісостепу [36, 38, 39]

Аксенічні спорові культури*	Видовий склад комах і кількість культур-ізолятів						
	яблунова моль <i>Hyponomeuta malinellus</i> Zell.	листокрутка брунькова <i>Tmetocera ocellana</i> L.	совки <i>Noctuidae</i>	білан капустяний <i>Pieris brassicae</i> L.	жуки <i>Coleoptera</i>	п'ядуни <i>Geometridae</i>	американський білий метелик <i>Hyalphantria cunea</i>
<i>B. thuringiensis</i> I 87/1, 87/3, 87/15, 39, 28-03, 11-01, Bt-18, Bt-04	2	1	2	-	2	-	1
<i>B. pumilus</i> B/11 ... B/14	1	-	1	-	1	1	-
<i>B. licheniformis</i> L3, L4, L12	-	1	-	1	-	1	-
<i>B. megatherium</i> 7-14 ... 7-18	-	-	2	1	1	-	1
<i>B. subtilis</i> B/16, B/07, B/22	1	1	1	-	-	-	-
<i>B. mycooides</i> 009, 014	-	-	1	-	1	-	-

Примітка: * – колекція непатогенних культур агробіотехнологічного призначення кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України.

Тісний зв'язок мікробіоти комах та зовнішнього середовища є базою використання цього показника для індикації епідеміологічного стану, моніторингу забруднення середовища патогенною мікробіотою. Видовий склад мікробіоти здорових особин комах (нормальна мікробіота) піддається різким коливанням не тільки за зовнішніми факторами, середовищем, але й за фізіологічними особливостями розвитку комах (вибіркова біохімічна активність мікросимбіонтів). Якісні та кількісні показники складу мікробіоти комах надзвичайно різноманітні (особливо для стадій старшого віку) і змінюються упродовж росту, розвитку і метаморфозу комах (патогенні, умовно-патогенні види). Що стосується досліджень епіфітної мікробіоти кормових рослин комах (наприклад, біланів, кільчастих шовкопрядів), то ще наприкінці 70-х років ХХ століття Ю. Возняковська [40] показа-

ла, що з 84 видів бактерій, які присутні на рослинах яблуні, абрикосу – 28 видів з них виявлено в кишківнику *Aporia crataegi*, *Malacosoma neustria*. У період ліньки гусені і метаморфозу кількість бактерій, особливо неспорових форм, різко зменшується, що пов'язано зі збільшенням в організмі комах перед лінькою і метаморфозом антибактеріальних речовин типу лізоциму. Мікробіота комах може слугувати якісним джерелом виділення практично цінних форм продуцентів фізіологічно активних сполук, ферментів (целюлаз, пектиназ та ін.) з кишечнику комах, що існують на деревинних породах. Кишкові мікросимбіонти комах відіграють важливу роль у ферментативній деградації целюлози. Активно досліджуються симбіонти кишечнику термітів та їх ймовірні функції. Доведено існування у складі мікробіоти термітів активних азотфіксаторів, що дозволяє хазяїну житися

хімічно чистою целюлозою [41]. Таким чином, симбіотичні взаємодії термітів та їх еукаріотичної і прокаріотичної кишкової мікробіоти є предметом сучасних досліджень, оскільки симбіонти грають важливу роль у харчуванні комах. Використання молекулярних методів дає цінну інформацію про різноманітність видів, поліморфізм нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК та роль мікроорганізмів в кишечнику комах (так звана «інвентаризація» видової приналежності симбіонтів, аналіз генома та експресії генів в кишечнику комах тощо). Так, на підставі аналізу нуклеотидної послідовності 16S рРНК нами побудована дендрограма філогенетичних зв'язків між різними представниками бактерій роду *Bacillus*. На дендрограмі досліджуваний ендоспоровий штам

B. thuringiensis I (87/3), ізольований з личинки колорадського жука (L_4), увійшов в одну групу зі штамом *B. thuringiensis* ATCC 10792 (рис 1).

Мікробний екзометагеном більш складний і функціонально різноманітніший за внутрішньоклітинний, тому широко досліджується і використовується у мікробіологічному контролі шкочочинних комах. Подібність секвенований фрагментів 16S рРНК штаму *B. thuringiensis* I (87/3) з фрагментами *B. thuringiensis* ATCC 10792 склала 99,0%. За допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК природного штаму *Bt* підтверджено його приналежність до виду *B. thuringiensis*. Сиквенс 16S рРНК штаму зареєстровано та внесено до бази GenBank (MH719010).

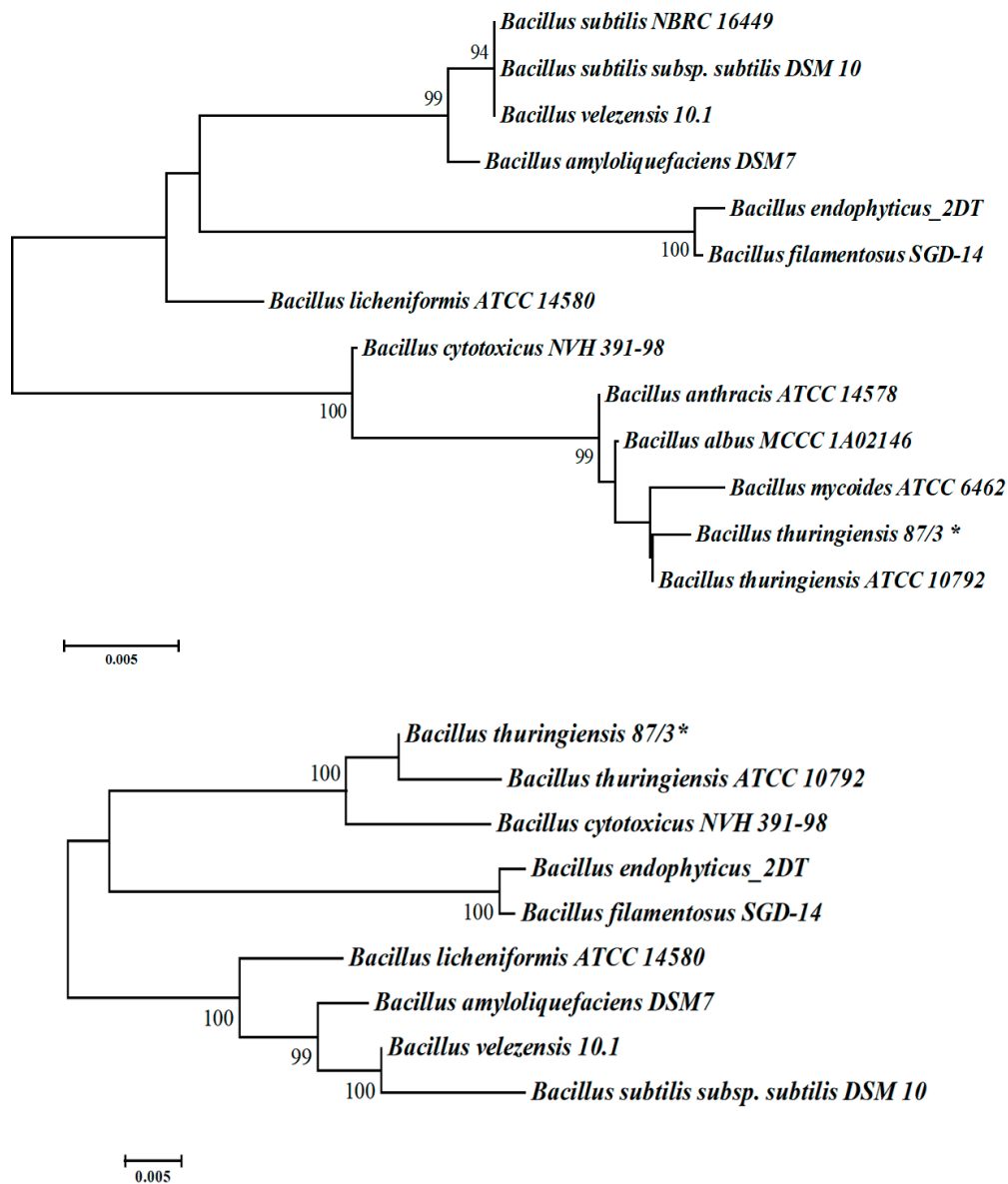


Рис. 1. Дендрограми філогенетичних зв'язків штаму *B. thuringiensis* I (87/3) [42]

Стратегія взаємовідношень ентомопатогенів *B. thuringiensis* з організмом комахи характеризується як агресивна, оскільки збереження популяції хазяїна не є обов'язковою умовою існування ентомопатогенних бактерій. Патогенність аксенічних спорових культур *B. thuringiensis* перевіряли у модельних дослідах на тест-комах інсектарної і природної лінії, пріоритет надавався біотестам, з яких ізольовано конкретний штам, враховуючи вибірковість різних патогенів. Ентомоцидна активність є основним показником якості мікробного препарату на основі спорових бактерій *B. thuringiensis* та визначається за сумарною загибеллю тестових комах за період досліду 7 – 15 днів. Численними експериментами доведено, що найчутливішими до дії бактеріального споро-кристалічного комплексу *B. thuringiensis* є передімагінальні стадії розвитку (личинки молодшого віку) фітофагів. Виявлено пряму залежність загибелі особин від інфекційного навантаження [1, 5, 43]. Загибель личинок молодшого віку L_{1-2} колорадського жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. на десяту добу обліку у варіантах з культуральною рідиною штаму *B. thuringiensis* I 87/3 на рівні еталонного штаму природного типу (біоагенту Бітоксипацлін) №800 склала 96,0–100,0% в умовах інсектарної дієти (корм – листя картоплі після експозиції у мікробних суспензіях 0,5% концентрації). При цьому на оброблених рослинах личинки вже в перші три доби втрачали активність (табл. 2). Багаторічні впровадження рідких препаративних форм на основі штамів-продуцентів ентомотоксинів *B. thuringiensis* у польових умовах показали, що обробка рослин картоплі в період масової появи личинок колорадського жука забезпечує істотне зниження чисельності фітофага, числа пошкоджених кущів і площі листової поверхні. В перші дні після обробки процес зниження чисельності личинок шкідника відбувався повільно, але при цьому рослини не пошкоджувались, що обумовлено антифідантним ефектом. Результати досліджень свідчать про те, що аксенічна культура штаму *B. thuringiensis* I 87/3 має високий потенціал технологічності (титр метаболітного споро-кристалічного комплексу складає більше 4,0 млрд./мл культуральної рідини) та високу ентомоцидну ефективність в природних умовах по відношенню до личинок колорадського жука – до 95,0%. Характер інтоксикації організму комахи екзотоксином *B. thuringiensis* свідчить про те, що при споживанні обробленої

кормової рослини цілісність епітелію середньої кишки особини не порушується, а токсин залишається в організмі тривалий час. Та частина токсину, яка включалася в фізіологічні процеси, не виводиться з організму, впливаючи, в першу чергу, на метаморфоз і наступні фази розвитку комах.

Екзотоксин також пригнічує активність харчування комах, але з меншою інтенсивністю. Що стосується метатоксичного ефекту, то він, безумовно, забезпечує більш високу ефективність мікробних препаратів на основі *B. thuringiensis* (H_1) в природних умовах (табл. 3).

Ентомоцидна активність культуральної рідини штаму *B. thuringiensis* I за показником LK_{50} для личинок L_2 колорадського жука склала 0,20%, для гусениць капустиної совки – не більше 0,18% відповідно. Особини, які отримали при харчуванні летальну дозу ентомопатогену *B. thuringiensis*, припиняють споживати корм і згодом, через 2–3–5 днів гинуть. Особини, які отримали сублетальні дози, не можуть нормально розвиватися і схильні до різних морфологічних і фізіологічних відхилень (уповільнення росту, розвитку і метаморфозу, тератогенез, дерепродукційний ефект та ін.). Метатоксичний ефект *B. thuringiensis* позначається не тільки на обробленому поколінні, але і на наступних генераціях.

Таким чином, незважаючи на своєрідність ентомопатогенної, ентомотоксичної дії, низький рівень контагіозності спорових бактерій р. *Bacillus* (*B. thuringiensis*), вони здатні в певних умовах викликати в популяціях чутливих комах епізоотичний процес. При цьому виникнення і розвиток цього процесу мають специфічні закономірності, властиві тільки цим бактеріям, а саме: формування і функціонування мікрвогніщ епізоотій (мікроепізоотій), існуючих в розрізненому просторі та не пов'язаних між собою. Розрізненість вогнищ обумовлена розрізненістю існування та життєдіяльністю чутливих фаз популяцій комах, де можлива циркуляція збудника від хворих особин до здорових. Такими мікрвогніщами можуть бути крони дерев, кущі та їх зарості, густі трав'янисті рослини і т.д., де можливий тісний контакт між особинами популяцій, що забезпечує циркуляцію збудника інфекції. Слід зауважити, що мікробіом *B. thuringiensis* багатьох серологічних типів, маючи антифідантну дію, активно впливає на гусениць, личинок комах. Після контакту з ентомопатогеном особини залишають інфіковане середовище,

Таблиця 2

Ентомоцидна та антифідантна активність культуральної рідини штамів *B. thuringiensis I* (модельні досліді, біотест – личинки *Leptinotarsa decemlineata* Say., L₁₋₂, інфікування *per os*, НУБІП України, 2016–2018 рр.) [44]

Варіант досліді	Титр спор, млрд./мл культуральної рідини	Загибель особин по днях обліку, %, інсектарні умови				St ^{0,95} ДН	Ступінь пошкодження листкової поверхні, %, бал	Маса личинок відносно контролю, %	Кількість пошкоджених рослин, %	Загибель особин, % через 7 діб, природні умови*	St ^{0,95} ДН
		3	5	7	10						
Без застосування <i>Bacillus thuringiensis</i> (контроль)	–	0	0	2,0	3,0	0,7	80,0 (4 бала)	100,0	55,0±0,53	-	-
<i>Bacillus thuringiensis I</i> (87/3)	4,83±0,16	33,0	67,7	91,0	100,0	18,4	19,0 (2 бала)	51,3±0,15	20,0±0,51	94,8±0,85	1,06
<i>Bacillus thuringiensis H₁</i> (800)	3,67±0,09	28,8	56,5	84,3	96,0	19,1	23,0 (2 бала)	55,7±0,8	25,0±1,30	93,7±0,72	1,79

Примітка: * – при 30,0% заселеності куців картоплі фітофагом, співвідношення яєць і личинок за віковими групами наступне: яйця – 13%, личинки L₁ – 11,4%, L₂ – 61,4% і III-го – 14,2%.

VH₁ (800) – еталонний, виробничий штамп-продуцент біопрепарату Бітоксинацилін (ФДБУ ВНДСГМ, Санкт-Петербург, Пушкін).

Таблиця 3

Метатоксична дія *B. thuringiensis (H)* на фітофагів (біотести – *Leptinotarsa decemlineata* Say.; *Mamestra brassica* L.) [1]

Індикаційні показники	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.	<i>Mamestra brassica</i> L.
Зниження ваги лялечок у порівнянні з контрольними, %	0	48,6–55,0
Загибель лялечок, % від загальної кількості	36,7–52,0	29,6–34,0
Поява потворних імаго, % від загальної кількості утворених лялечок	15,3–19,3	25,1
Зниження плодючості (по відношенню до контрольних), %	44,8–95,9	29,0–57,0
Загибель личинок дочірнього покоління, %	18,0–32,2	0

тим самим сприяючи поширенню мікровогнищ епізоотій. Розвиток інфекційних процесів, їх інтенсивність знаходяться в прямій залежності від вірулентності і контагіозності мікроорганізму (враховуючи селективність симбіонта, патогена), а також від видових та індивідуальних особливостей макроорганізму. Інфекційний (ентомопатологічний) процес посилюється за рахунок зниження імунної відповіді комахи-господаря і його контролю над реплікацією бактерій середньої кишки, що проникають в порожнину тіла через викликані токсином епітеліальні ураження. Якщо мікробіом середньої кишки залишається незмінним, то з'являється можливість точно ідентифікувати перехід бактеріальних видів від резидентних симбіонтів до патогенів і створити основу для розробки нових технологій біоконтролю комах, заснованих на таких стратегічних напрямках, як посилення впливу природних агентів-конкурентів, антагоністів за рахунок зниження імунокомпетентності організму, експресії та використання активних

продуцентів Cry інсектицидних білків, а також їх потенційно стабільних транскриптів і ніш [45]. На сьогодні вже виявлено близько 846 Cry і Cyt генів *B. thuringiensis*, які набувають експресії під час стаціонарної фази, а їх продукти, як правило, накопичуються у фрагментах материнських клітин з утворенням кристалічних включень, що може становити від 20 до 30% сухої маси споруючих клітин. Експресія генів Cry *B. thuringiensis* зазвичай збігається зі споруючістю та регулюється різними факторами, що діють на транскрипційному, посттранскрипційному, метаболічному і посттрансляційному рівнях [46]. Продукування Cry токсинів бактеріями *B. thuringiensis* ефективно використовується як модельна система для вивчення взаємодії та еволюційної екології бактеріальної вірулентності. Більш глибокі знання механізмів експресії Cry генів і локалізації кристалів *B. thuringiensis* нададуть важливі нові ідеї щодо базових та дискусійних питань фундаментальної важливості.

СИМБИОНТНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА НАСЕКОМЫХ: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И ИНИЦИАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛА ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПРИМЕРЕ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Н.В. Патыка, Т.И. Патыка

*Национальный университет биоресурсов и
природопользования Украины,
ул. Героев Оборона, 13, корп. 4, Киев, 03041,
Украина*

Резюме

В обзоре приведены современные литературные данные и собственные экспериментальные исследования микросимбионтов, которые функционируют, циркулируют и проявляют разноуровневую экспрессию энтомопатогенного действия в организмах различных видов насекомых. На сегодня особую научную и практическую ценность представляют комплексные работы по скринингу, исследованию биомаспорных бактерий *Bacillus thuringiensis* в раз-

личных эконисах, анализу их специфических энтомотоксических взаимодействий с целевым макроорганизмом. Экзоклеточный микробиом здоровых и больных насекомых локализуется, в основном, на покровах, ротовом аппарате и в кишечнике и зачастую перераспределяется в брюшной полости и внутренних органах хозяина. Микробный экзометагеном более сложный и функционально разнообразнее внутриклеточного, поэтому широко исследуется и используется в микробиологическом контроле фитофагов. Актуальное научное направление таких исследований развивается по углублению знаний экспрессии генов Cry *B. thuringiensis* и регуляторных факторов, действующих на транскрипционном, посттранскрипционном, метаболическом и посттрансляционном уровнях. Поэтому система «энтомопатогенные бактерии *B. thuringiensis* – фитофаг» рассматривается как эффективная модель для изучения взаимодействия и эволюционной экологии бактериальной вирулентности.

Ключевые слова: микробиом, бактериальные симбионты, энтомопатогенные бактерии *B. thuringiensis*, микробиологический контроль.

**SYMBIOTIC MICROBIAL
COMMUNITIES OF INSECTS:
FUNCTIONING AND
ENTOMOPATHOGENIC ACTION
POTENTIAL INITIATION
ON THE EXAMPLE
OF *BACILLUS THURINGIENSIS***

N.V. Patyka, T.I. Patyka

*National University of Life and Environmental
Sciences of Ukraine, 13, Heroyiv Oborony St.,
Kyiv, 03041, Ukraine*

Summary

The review provides current literature and authors' experimental studies of microsymbionts that function, circulate, and have varying degrees of entomopathogenic action in the organisms of different insect species. Complex scientific work on screening, study of *Bacillus thuringiensis* spore bacteria biome in different ecosystems, analysis of their specific entomotoxic interactions with target macroorganism are of particular scientific and practical value today. Extracellular microbiome of healthy and diseased insects is localized mainly on covers, oral apparatus and intestine, and is most often redistributed in the abdominal cavity and internal organs of the host. Exometagenome of bacteria is more complex and functionally diverse than metagenome of intracellular microorganisms, so it is widely studied and used in microbiological control of phytophages. Current scientific direction of such researches is deepening knowledge about Cry *B. thuringiensis* genes expression and regulatory factors acting at the transcriptional, post-transcriptional, metabolic and post-translational levels. Therefore, the "entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis* – phytophage" system is considered as an effective model for studying the interaction and evolutionary ecology of bacterial virulence.

Keywords: microbiome, bacterial symbionts, entomopathogenic bacteria *B. thuringiensis*, microbiological control.

1. Kandybin NV, Patyka TI, Ermolova VP, Patyka VF. [Microbiocontrol of the number of insects and its dominant *Bacillus thuringiensis*]. St. Petersburg-Pushkin: Innovation Center for Plant Protection; 2009. 254 p. Russian.
2. Ferrari J, Vavre F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1569):1389–1400.
3. Gadzalo YaM, Patyka NV, Zaryshnyak AS, Patyka TI. [Agroecological engineering in rhizosphere biocontrol plants and formation of soil health]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(4):88–109. Ukrainian.
4. Crickmore N. The diversity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.* Kluwer Acad Publ. The Netherlands. 2000:65–79.
5. Patyka TI, Lesovoy NM, Patyka NV, Kolodjashnyi AYU. [Biocenotical approaches using entomopathogenic bacteria of *Bacillus thuringiensis* the season growing potatoes and storage]. *Mikrobiol Z.* 2016; 78(3):69–77. Ukrainian.
6. Dubos R, Kessler A. Integrative and disintegrative factors in symbiotic associations. In: *Symbiotic Associations.* Proc sympos soc gen Microbiol Cambridge, Univ Press: 1963; 13: 1–11.
7. Schwemmler W. Endocytobiology: a modern field between symbiosis and cell research. In: *Endocytobiology I. Endosymbiosis and Cell Biology.* W. Schwemmler, H.E.A.Schenk, editors. 1980B; 1:943–967.
8. Kozo-Polyansky B. Symbiogenesis. A new principle of evolution. In: *transl Fet V, eds Fet V, Margulis L.* Harvard University Press, Cambridge MA (from the Russian edition, 1924); 2010:198.
9. Margulis L. Symbiogenesis and symbiontism. In: *Margulis L, Fester R, editors. Symbiosis As a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis.* MIT Press; Cambridge, MA: 1991:1–13.
10. Dogel VA. [General parasitology]. Leningrad: Leningrad State University; 1962. 464 p. Russian.

11. Steinhaus E. [Insect Pathology]. M.: Publishing house of foreign literature; 1952. 840 p. Russian.
12. Hertig M, Wolbach S. Studies on Rickettsia-like microorganisms in Insects. The Journal of Medical Research; 1924; 44(3):329–374.
13. Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature. 1971; 232(5313):657–658.
14. Guillemaud T, Pasteur N, Rousset F. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. Proc R Soc Lond B. 1997; 264:245–251.
15. Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O. Diversification of *Wolbachia* Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. Molecular Biology and Evolution; 2011; 28(10): 2761–2772.
16. Hurst GDD, Walker LE, Majerus MEN. Bacterial infections of hemocytes associated with the maternally inherited male-killing trait in british populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata*. Journal of Invertebrate Pathology. 1996; 68(3):286–292.
17. Werren JH, Baldo L, Clark ME. Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology. 2008; 6(10):741–751.
18. Saridaki A, Bourtzis K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. Current opinion in microbiology. 2010; 13(1):67–72.
19. Dumas E, Atyame CM, Milesi P, Fonseca DM, Shaikevich EV, Unal S, et al. Population structure of *Wolbachia* and cytoplasmic introgression in a complex of mosquito species. BMC Evol Biol. 2013; 13(1):181.
20. Jiggins FM, Hurst GD. The evolution of parasite recognition genes in the innate immune system: purifying selection on *Drosophila melanogaster* peptidoglycan recognition proteins. J Mol Evol. 2003; 57(5):598–605.
21. White JF, Sullivan RF, Moy M, et al. Evolution of the epiphyllous stage of a *Neotyphodium* endophytes and other Clavicipitacean biotrophs. In: Symbiosis: mechanisms and model systems. Seckbach J., editor. Dordrecht, Boston, L, 2002:413–424.
22. Provorov NA, Onishchuk OP. [Insect symbionts microorganisms: genetic organization, adaptive value, evolution]. Microbiology. 2018; 87(2):99–113. Russian.
23. Gadzalo YM, Patyka MV, Zarishnyak AS. [Agrobiology of the rhizosphere of plants]. Kiev: Agrarian Science; 2015. 368 p. Russian.
24. Patyka TI, Patyka NV, Patyka VF. [Phylogenetic interrelations between serological variants of *Bacillus thuringiensis*]. Biopolym Cell. 2009; 25(3):240–244. Russian.
25. Bravo A, Gill S, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon. 2007; 49:423–435.
26. Pigott C, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol Rev. 2007; 71:255–281.
27. Zhang J, Hodgman TC, Krieger L, Schnetter W, Schairer HU. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. J Bacteriol. 1997; 179:4336–4341.
28. Smirnov VV, Sorokulova IB, Pinchuk IV. [Bacteria of *Bacillus* species – prospective source for biologically active substances]. Mikrobiol Z. 2001; 1(63):72–79. Russian.
29. Ibrahim MA, Griko N, Junke M, Bulla LA. *Bacillus thuringiensis*. A genomic and proteomics perspective. Bioengineered bugs: 2010; 1:31–50.
30. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen. Trends Microbiol. 2010; 18:189–194.
31. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-fuentes JL. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. Adv Insect Physiol. 2014; 47:39–87.
32. Hernandez CS, Martinez C, Porcar M, Caballero P, Ferre J. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. J Invertebr Pathol. 2003; 82:57–62.

33. Paniagua Voirol LR, Frago E, Kaltenpoth M, Hilker M, Fatouros NE. Bacterial symbionts in *Lepidoptera*: their diversity, transmission and impact on the host. *Front Microbiol.* 2018; 9:556.
34. Boyko MV, Patyka NV, Patyka TI. Estimation of productivity *Bacillus thuringiensis* on different media. *Microbiology and biotechnology.* 2017; 1(37):16–22.
35. Boyko M, Patyka N, Vintskovs'ka Yu. Estimation of the genus *Bacillus* bacterial strains antagonist properties against pathogenic micromycetes. *Annals of Advanced Agricultural Sciences.* 2017; 1(2):65–69.
36. Patyka TI, Kriuchkova LA, Patyka MV. [Biological control of phytopathogenic organisms in agroecosystems using bacteria of the genus *Bacillus*]. *Horticulture.* 2018; 73:142–148. Ukrainian.
37. Kriuchkova LO, Shmyhel TS, Chahun K, Patyka TI. Biological control of root, leaf and ear diseases of small cereal crops with new *Bacillus* strains. *Protecția Plantelor în Agricultură Convențională și Ecologică în numele Proiectului Consolidarea capacităților regionale pentru aplicarea tehnologiilor ecologice în sistemele integrate de gestionare a dăunătorilor.* Chișinău, Republica Moldova; 2018:254–257.
38. Patyka T, Patyka N. [Regulation of technological activity of *Bacillus thuringiensis* strains 87-15 in conditions of deep cultivation]. *Biological systems: theory and innovation.* Publishing center of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. 2019; 3:27–36. Ukrainian.
39. Krasnyukov MO, Patyka MV, Patyka TI. [Molecular and biological determination of the fungicidal activity of *Bacillus* spp isolates]. *Proceedings of the International Scientific Practice. Sustainable Development Goals of the Third Millennium: Challenges for Universities of Life Sciences;* 2018 May 23–25; Kyiv, Ukraine. 2018. p.122. Ukrainian.
40. Voznyakovskaya YuM. [Microflora of plants and harvest]. Leningrad: colossus publ.; 1969. 240 p. Russian.
41. Noda S, Ohkuma M, Usami R, Horikoshi K, Kudo T. Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes kosshunensis*. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65:4935–4942.
42. Boyko MV, Patyka TI, Patyka MV. [Molecular and biological features of the entomopathogenic strain *Bacillus thuringiensis* 87/3]. *Agriculture and forestry.* 2018; 11: 90–98. Ukrainian.
43. Patyka TI, Boyko MV, Patyka NV [Biotechnological multifunctionality of metabolic spore-crystal complex and peculiarities of *Bacillus thuringiensis* cultivation]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(2):78–85. Ukrainian.
44. Boyko MV. [Functional biotechnological agents *Bacillus thuringiensis* for colorado beetle population control] abstract. diss. ... PhD (agricultural sciences by specialty 03.00.20 biotechnology). National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019:23. Ukrainian.
45. Peng Q, Yu Q, Song F. Expression of Cry genes in *Bacillus thuringiensis* biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019; 103(4):1617–1626.
46. Deng Ch, Peng Q, Song F, Lereclus D. Regulation of Cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins.* 2014; 6:2194–2209.

Отримано 11.09.2019