

Экологические основы создания микробных препаратов

УДК 631.46:579.64:632.937.12(470.23)

doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.128rus

Bacillus thuringiensis* ИЗ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ В ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ

В.П. ЕРМОЛОВА

В настоящее время кристаллообразующие бациллы группы *thuringiensis* рассматриваются в качестве основы современного производства микробных инсектицидов. Их характеризуют высокие адаптивные возможности, что обуславливает широкое распространение этих аэробных спорообразующих бактерий в природе. Одни и те же разновидности *Bacillus thuringiensis* были выделены на разных континентах независимо от наличия и распространения насекомого-хозяина этого энтомопатогена. В разных странах ученые занимаются поиском и выделением *Bacillus thuringiensis*. В представленной статье изложены результаты выделения *B. thuringiensis* из природных субстратов в Ленинградской области. Были собраны 24 образца почвы, лесной подстилки, воды, ила, больные и погибшие насекомые и пр. Методом истощающегося мазка проводили рассев образцов из разных субстратов на рыбный агар. После просмотра свыше 3000 выросших колоний по морфологическим признакам отобрали 62 культуры. Микроскопирование мазков с использованием черного анилинового красителя показало, что 12 из 62 изученных изолятов наряду со спорами образуют кристаллические эндотоксины разной формы. Выделенные микроорганизмы отбирали по признакам энтомо- и ларвицидности и идентифицировали по схемам Н. De Vargas, А.А. Воннефои (1968), а также О. Лысенко (1985). Исследования позволили классифицировать выделенные бациллы в качестве *B. thuringiensis* и объединить их в три сероварианта — Н₁ (var. *thuringiensis*, изоляты №№ 12, 20, 40, 41), Н_{3аэв} (var. *kurstaki*, изоляты №№ 15, 29, 49) и Н₁₄ (var. *israelensis*, изоляты №№ 14, 25, 33, 38, 44). По биологической характеристике (образование ацетилметилкарбинола, лецитиназы, пигмента, β-экзотоксина, формирование пленки на мясопептонном бульоне, использование сахарозы, маннозы, целлобиозы, салицина; расщепление крахмала; протеолитическая активность) они близки к типовым штаммам. Изоляты имеют высокую продуктивность, энтомоцидность, ларвицидность и перспективны в качестве продуцентов биопрепаратов энтомо-ларвицидного действия. Титры изолятов серовариантов ВtН₁, ВtН_{3аэв} и ВtН₁₄ варьировали в пределах соответственно 2,42×10⁹-2,78×10⁹; 1,85×10⁹-2,15×10⁹ и 2,65×10⁹-3,28×10⁹ КОЕ/мл. Изоляты №№ 12, 41 сероварианта ВtН₁ по активности для личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say соответствуют эталонному штамму ВtН₁ с ЛК₅₀ 0,19 %. Энтомоцидная активность изолятов №№ 15, 29 и 49 сероварианта ВtН_{3аэв}, выраженная в ЛК₅₀ для гусениц 2-го возраста мельничной огневки *Ephestia kuehniella*, составляла соответственно 0,88; 0,82 и 0,92 % при ЛК₅₀ эталонного штамма ВtН_{3аэв} 0,86 %. Изоляты №№ 33, 44 сероварианта ВtН₁₄ по титру не уступали, а по активности несколько превосходили эталонный штамм. У изолятов №№ 33, 44 значение ЛК₅₀ для личинок 4-го возраста комаров *Aedes aegypti* составило 0,17×10⁻³ и 0,16×10⁻³ % при величине 0,18×10⁻³ % у эталонного штамма ВtН₁₄.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, выделение, идентификация.

Высокие адаптивные возможности аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus thuringiensis* в различных экстремальных условиях обуславливают их широкое распространение в природе. Есть сообщения о выделении бацилл из горных источников (1). По данным ряда авторов (2-6), спорообразующие бактерии широко распространены в почве. Описаны штаммы бацилл, которые способны расти при отрицательных температурах ниже 45-50 °С, а споры выдерживают нагревание до 102 °С (7).

Раньше считалось, что основными объектами скрининга на наличие кристаллообразующих бактерий служат больные или погибшие насекомые из естественных популяций. Однако в настоящее время установлено, что эти микроорганизмы встречаются повсюду: в почве, воде, растениях, в живых насекомых, в трупах насекомых, в лесной подстилке, местах

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.604.21.0024, RFMEFI60414X0024).

проживания насекомых (8-13). Варианты энтомопатогенов имеют свои ареалы, связанные с расселением насекомых-хозяев. Бактерии *B. thuringiensis* широко распространены в Крыму, где поражают многие виды насекомых, что объясняется благоприятными условиями региона с теплым и сухим климатом. Для Азии характерно выделение *B. sotto* и *B. dendrolimus*, для США — *B. thuringiensis*, *B. entomocidus* и *B. finitimus*. В Европе для областей Франции, где растет шелковица, типичны штаммы *B. alesti* (14, 15). Однако в последние годы одни и те же разновидности *B. thuringiensis* были выделены на разных по природным условиям континентах независимо от наличия и плотности популяции насекомого-хозяина (16-19). Ежегодно группа *B. thuringiensis* пополняется разновидностями (серотипами), различающимися между собой не только таксономически, но и по спектру энтомоцидного действия (20-29). К настоящему времени учеными разных стран выделено и идентифицировано более 70 разновидностей *B. thuringiensis*. К достоинствам этих бактерий относится их безопасность для человека, теплокровных животных, полезных насекомых и окружающей среды (30, 31).

Целью настоящего исследования было выделение бактерий, принадлежащих к группе *thuringiensis*, их идентификация и отбор штаммов, перспективных в качестве продуцентов биопрепаратов энтомоцидного действия в отношении вредных насекомых.

Методика. В г. Санкт-Петербурге, его пригородах и Ленинградской области были собраны 24 образца из различных источников (почва, лесная подстилка, части растений, больные и погибшие насекомые, вода, ил).

При выделении микроорганизмов из насекомых каплю гемолимфы или суспензию тканей больных насекомых стерильно смешивали с физиологическим раствором и стерильно вносили в чашки Петри на рыбный агар (РА) методом истощающегося мазка. Таким же образом проводили рассев из других субстратов (почва, листва и т.д.). Чашки инкубировали при 28-30 °С и на 7-е сут с помощью микроскопирования мазков с использованием черного анилинового красителя (32) выявляли культуры, способные формировать кристаллический эндотоксин.

Предварительный скрининг изолятов осуществляли по признакам энтомо- и ларвицидности, идентификацию отобранных вариантов — по схемам для *B. thuringiensis* (Bt), предложенным Н. De Barjac, А.А. Bonnefoi (33) и О. Lysenko (34).

Для изучения биохимических свойств изолятов вместо жидких дифференциально-диагностических сред использовали системы индикаторных бумажных (СИБ) дисков (ФГУП НПО «Микроген» МЗРФ, Россия), содержащих определенные количества субстрата в сочетании с соответствующим индикатором и стабилизированных с применением пленкообразующего покрытия — поливинилового спирта. При определении способности использовать углеводы в 0,3 мл стерильного 0,85 % раствора NaCl (рН 7,3±0,1) суспендировали суточную агаровую культуру (объем — одна микробиологическая петля), выращенную при температуре 29±1 °С, и в пробирку погружали диск с соответствующим углеводом. Контролем служили диски, погруженные в стерильный 0,85 % раствор NaCl. Результаты учитывали через 5-18 ч. Аналогичным образом с применением СИБ-дисков оценивали индолообразование, уреазную активность, продукцию сероводорода и ацетилметилкарбинола (АМК).

Продуктивность изолятов 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. Титр клеток учи-

тывали общепринятым методом серийных разведений с высевом на РА.

Биологическую активность изолятов устанавливали, исходя из титра энтомопатогена, вызывающего летальный эффект у 50 % тестируемых насекомых при свободном поглощении инокулированного корма. Готовили несколько разведений жидкой бактериальной культуры, обеспечивающих от 10 до 96 % гибели тест-объекта. Каждый вариант испытывали в трех повторностях; в контроле корм не инокулировали.

Для оценки биосинтеза термостабильного экзотоксина жидкую культуру изолята центрифугировали 15 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость автоклавируют при 105 °С в течение 20 мин. В стеклянные банки объемом 200 мл вносили 11 мл 2,5 % водной суспензии сухого молока, 7 г пшеничных отрубей и 2 мл надосадочной жидкости (экзотоксина) соответствующего разведения (в контроле — 2 мл стерильной воды). В каждой банке находилось 20 г субстрата (корма) и 2 мл надосадочной жидкости (0,1 мл/г, или 100 мкл/г). Использовали надосадочную жидкость без разведения и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, которым соответствует 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125 мкл экзотоксина/г. На субстрат помещали по 25 личинок комнатной мухи *Musca domestica* 3-суточного возраста. Банки устанавливали в термостат при температуре 28 °С и на 5-е сут отбирали пупарии. Учитывали вылетевших мух, процент погибших (X) с поправкой на гибель в контроле вычисляли по формуле W.S. Abbot (35):

$$X = \frac{K - B}{K} \times 100 \%,$$

где K и B — число вылетевших мух соответственно в контроле и опыте. ЛК₅₀, выраженную как количество экзотоксина в микролитрах в расчете на 1 г корма, рассчитывали по формуле Кербера (36).

Энтомоцидную активность оценивали на личинках 2-го возраста колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Готовили водную суспензию культуральной жидкости (КЖ) в трех разведениях — 1:10, 1:50 и 1:250, что соответствует содержанию 10; 2 и 0,4 %. Ветку картофеля с пятью листьями обрабатывали с двух сторон бактериальной культурой в соответствующем разведении (контроль — опрыскивание водой), помещали в пенициллиновый флакон с водой и под углом 45° ставили в кристаллизатор с фильтровальной бумагой на дне. На каждую ветку сажали кисточкой по 25 личинок. Чашки оставляли при комнатной температуре (22-25 °С) на 3 сут, после чего корм заменяли свежим (без обработки). Погибших личинок учитывали на 7-е сут. Процент смертности вычисляли по формуле W.S. Abbot для каждого разведения препарата с поправкой на гибель в контроле (35). ЛК₅₀ рассчитывали по формуле Кербера (36).

При определении восприимчивости гусениц мельничной огневки *Ephestia kuehniella* к изолятам тестировали культуральную жидкость. В стеклянные банки объемом 200 мл с 5 г пшеничной муки вносили по 2 мл КЖ соответствующего разведения (1,0; 0,5 и 0,25 %), помещали по 25 гусениц 2-го возраста, выдерживали в термостате при температуре 26 °С и учитывали гибель на 10-е сут. ЛК₅₀ рассчитывали по формуле Кербера (36).

Ларвицидную активность изолятов оценивали по методике, предложенной Всемирной организацией здравоохранения (37), на личинках комаров *Aedes aegypti* 4-го возраста инсектарой популяции. Готовили суспензию КЖ методом ее разведения в 200, 400, 800 и 1600 тыс. раз, что соответствует условному содержанию КЖ $0,5 \times 10^{-3}$; $0,25 \times 10^{-3}$; $0,125 \times 10^{-3}$; $0,0625 \times 10^{-3}$ %, или 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 мкл КЖ/л. Все разведения готовили на водопроводной воде. В чашку Петри наливали по 50 мл соответствующую

шего разведения и помещали по 25 личинок комаров. Чашки ставили в термостат на 24 ч при 28-30 °С, после чего учитывали гибель личинок. Процент смертности для каждой концентрации с поправкой на гибель в контроле вычисляли по формуле:

$$X = \frac{M_o - M_k}{100 - M_k} \times 100 \%,$$

где M_o и M_k — средние арифметические числа мертвых особей соответственно в опыте и контроле. На основании полученных данных рассчитывали ЛК₅₀, выраженную в процентах гибели личинок по формуле Кербера (20): $\lg \text{ЛК}_{50} = \lg C_M - \sigma (\sum X_2 - 0,5)$, где C_M — максимальное содержание из испытанных; σ — логарифм отношения для каждого предыдущего разведения к последующему (логарифм кратности разведений); $\sum X_2$ — сумма отношений числа погибших насекомых к общему числу подвергшихся действию для соответствующего разведения.

Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа (38) при доверительном интервале 95 %.

Результаты. На РА из более чем 3000 колоний по морфологическим признакам отобрали 62, по цвету, форме и консистенции соответствующие *B. thuringiensis*. При микроскопировании было установлено, что 12 из 62 изученных изолятов образуют (наряду со спорами) кристаллы эндотоксина разной формы.

Полученные изоляты представляли собой бациллы с перитрихальным типом расположения жгутиков. Это грамположительные факультативные анаэробы. Они формировали вегетативные клетки (одиночные или в виде коротких цепочек по 2-4 клетки) размером 2,5×0,9 мкм, хорошо росли на плотных питательных средах (мясопептонный агар МПА, картофельный агар, РА). Оптимальная температура роста — 28-30 °С. На агаризованных средах через 48 ч образовывали плоские колонии серовато-белого цвета, округлой или неправильной формы, мелкозернистые или шероховатые, вязкой консистенции, цвет питательной среды при этом не менялся. В клетках субтерминально располагались споры овальной формы размером 1,1-1,3×0,8-0,9 мкм (длина×ширина) и кристаллический эндотоксин (кристалл). У изолятов №№ 12, 20, 40, 41 кристалл размером 1,1-1,3×0,9-1,2 мкм (длина×ширина) имел форму правильного ромба с тупыми концами и четкими гранями, у №№ 15, 29, 49 наблюдали кристаллы размером 0,9-1,4×0,9-1,3 мкм (длина×ширина) правильной ромбовидной вытянутой формы, у №№ 14, 25, 33, 38, 44 — неправильной формы размером 0,2-1,1×0,1-0,9 мкм (длина×ширина).

Исследование физиолого-биохимических и серологических свойств позволило классифицировать выделенные бациллы как *B. thuringiensis* и объединить их в три сероварианта (VtH₁, VtH₁₄ и VtH_{3a3b}) (табл. 1).

1. Основные физиолого-биохимические свойства изолятов *Bacillus thuringiensis* (Vt), выделенных из природных субстратов в Ленинградской области

№ изолята	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
VtH ₁ (эталон)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
29	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
49	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VtH _{3a3b} (эталон)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

14	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
25	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
33	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
38	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
44	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
VtH ₁₄ (эталон)	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+

Примечание. 1, 2, 3, 4 — образование соответственно ацетилметилкарбинола, лецитиназы, пигмента, β-экзотоксина; 5 — образование пленки на мясопептонном бульоне (МПБ); 6, 7, 8, 9 — использование соответственно сахарозы, маннозы, целлобиозы, салицина; 10 — расщепление крахмала; 11 — протеолиз мясопептонного желатина (МПЖ); VtH₁ VtH_{3a3b} VtH₁₄ — сероварианты; «+» и «-» — соответственно проявление или отсутствие проявления признака. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %.

К сероварианту *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* VtH₁ были отнесены изоляты №№ 12, 20, 40, 41, которые из источников азота используют пептон, мясной и рыбный бульон, дрожжи белковые кормовые, расщепляют глюкозу, маннозу, левулезу, сахарозу, мальтозу, целлобиозу, глицерин и салицин с образованием кислоты, не используют галактозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, лактозу, раффинозу, маннит, дульцит, сорбит, инулин, инозит. Это изоляты разжижали желатин, пептонизировали молоко, гидролизировали крахмал, использовали цитраты, образовывали ацетилметилкарбинол. Образование пигмента и уреазы у них не отмечали. Индол и сероводород они не использовали, редуцировали нитраты в нитриты. Давали положительную реакцию жгутикового антигена с типовой антисывороткой *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* VtH₁ в разведении 1:6400.

К сероварианту *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* VtH_{3a3b} относились изоляты №№ 15, 29, 49. Из источников азота они использовали пептон, мясной и рыбный бульон, дрожжи белковые кормовые, расщепляли глюкозу, левулезу, мальтозу, целлобиозу, глицерин и салицин с образованием кислоты, не использовали галактозу, арабинозу, ксилозу, маннозу, сахарозу, рамнозу, лактозу, раффинозу, маннит, дульцит, сорбит, инулин, инозит, разжижали желатин, пептонизировали молоко, гидролизировали крахмал, использовали нитраты. Синтезировали ацетилметилкарбинол. Пигмент и уреазу не синтезировали. Индол и сероводород не использовали, редуцировали нитраты в нитриты. Давали положительную реакцию жгутикового антигена с типовой антисывороткой *B. thuringiensis* var. *kurstaki* в разведении 1:6400.

Серовариант *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* VtH₁₄ был представлен изолятами №№ 14, 25, 33, 38, 44. Из источников азота они использовали пептон, мясной бульон, рыбный бульон, дрожжи белковые кормовые, сбразивали глюкозу, мальтозу, левулезу, трегалозу, глицерин, не сбразивали сахарозу, ксилозу, лактозу, арабинозу, галактозу, рамнозу, раффинозу, маннозу, дульцит, сорбит, маннит, инсулин, салицин. Не усваивали клетчатку, не расщепляли эскулин, не выделяли сероводород и уреазу. Продуцировали аммиак, ацетилметилкарбинол и лецитиназу. Восстанавливали нитраты, разжижали желатин, пептонизировали молоко, обесцвечивали лакмус. По реакции с типовой антисывороткой в разведении 1:6400 относились к серотипу *B. thuringiensis* var. *israelensis* (VtH₁₄). Формировали кристаллический эндотоксин неправильной формы, экзотоксин не продуцировали.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствовали о высокой технологичности изолятов VtH₁. Изоляты № 12 и № 41 по биологической характеристике не уступали эталону VtH₁.

Результаты оценки продуктивности и ларвицидной активности для личинок комаров изолятов VtH₁₄ (табл. 3) также указывали на высокую

технологичность и активность изолятов. Особенно следует отметить изоляты № 33 и № 44, которые по титру спор и ЛК₅₀ для личинок комаров не уступали эталону.

2. Биологическая характеристика изолятов *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BtH₁, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области ($X \pm x$)

№ изолята	Титр клеток, $\times 10^9$ /мл	Количество экзотоксина (ЛК ₅₀ для L ₂ комнатной мухи <i>Musca domestica</i>), мкл/г корма	Энтомоцидная активность (ЛК ₅₀ для L ₂ колорадского жука <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say), %
12	2,78±0,11	3,4±0,2	0,19±0,04
20	2,58±0,13	4,0±0,2	0,26±0,04
40	2,42±0,14	4,3±0,2	0,30±0,04
41	2,61±0,10	3,8±0,2	0,19±0,04
BtH ₁ (эталон)	2,68±0,11	3,7±0,2	0,19±0,04

Примечание. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %.

3. Биологическая характеристика изолятов *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* BtH₁₄, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области ($X \pm x$)

№ изолята	Титр спор, $\times 10^9$ /мл	ЛК ₅₀ для L ₄ комара <i>Aedes aegypti</i> , $\times 10^{-3}$ %
14	2,65±0,13	0,25±0,03
25	2,15±0,14	0,23±0,03
33	3,12±0,12	0,17±0,03
38	2,81±0,14	0,24±0,03
44	3,28±0,13	0,16±0,03
BtH ₁₄ (эталон)	3,38±0,14	0,18±0,03

Примечание. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %.

Продуктивность изолятов BtH_{3a3b} (№№ 15, 29, 49) на дрожже-полисахаридной среде варьировала от 1,85±0,15 до 2,15±0,14 млрд спор/мл. Энтомоцидная активность для изолятов №№ 15, 29 и 49 составляла соответственно 0,88±0,04; 0,82±0,04 и 0,92±0,04 % при ЛК₅₀ эталонного штамма 0,86±0,04 %.

Таким образом, наши исследования подтверждают устоявшееся мнение о том, что энтомопатогенные кристаллообразующие бациллы *Bacillus thuringiensis* (Bt) встречаются повсюду — в почве, воде, лесной подстилке, трупах насекомых, в местах обитания насекомых. Идентификация и биотестирование показали, что выделенные разновидности, относящиеся к серовариантам BtH₁, BtH₁₄, BtH_{3a3b}, по биологическим свойствам и практической значимости близки к типовым штаммам. Очевидно, что с помощью аналитической селекции, подбора питательных сред и режимов культивирования можно усилить ценные в практическом отношении свойства выделенных Bt и с успехом использовать их в качестве продуцентов биопрепаратов для контроля численности вредных насекомых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Логинова Л.Г., Храпцова Г.И., Головина М.Г. Термофильные бактерии горячих источников Камчатки. Микробиология, 1976, 45(6): 1087-1091.
2. Евдокимова Г.А., Кислых Е.Е., Мозгова Н.П. Биологическая активность почв в условиях агротехногенного загрязнения на Крайнем Севере. Л., 1984: 120.
3. Quesada-Moraga E., Garcia-Tovar E., Valverde-Garcia P., Santiago-Alvarez C. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. Microbiol. Res., 2004, 159: 59-71 (doi: 10.1016/j.micres.2004.01.011).
4. Das J., Dangar T.K. Diversity of *Bacillus thuringiensis* in the rice field soils of different ecologies in India. Indian J. Microbiol., 2007, 47: 364-368 (doi: 10.1007/s12088-007-0065-z).
5. Ramalakshmi A., Udayasuriyan V. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolated from Western Ghats of Tamil Nadu state, India. Curr. Microbiol., 2010, 61: 13-18 (doi: 10.1007/s12088-010-0065-z).

- 10.1007/s00284-009-9569-6).
6. Patel K.D., Bhanshali F., Ingle S.S. Diversity and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from alluvial soils of Mahi River basin, India. *J. Adv. Dev. Res.*, 2011, 2: 14-20.
 7. Chatterjee S.N., Bhattacharya T., Dangar T.K., Chandra G. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(13): 1587-1591.
 8. Chen F.-C., Tsai M.-C., Peng C.-H., Chak K.-F. Dissection of *cry* gene profiles of *Bacillus thuringiensis* isolates in Taiwan. *Curr. Microbiol.*, 2004, 48: 270-275 (doi: 10.1007/s00284-003-4195-1).
 9. Arrieta G., Espinoza A.M. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican Natural ecosystems. *Rev. Biol. Trop.*, 2006, 54: 13-27 (doi: 10.15517/rbt.v54i1.13981).
 10. Патыка В.Ф., Патыка Т.И. Экология *Bacillus thuringiensis*. Киев, 2007.
 11. Ал-Хамада А.Д. Выделение энтомопатогенов *Bacillus thuringiensis* (ВТ) из региона Deir Ezzor Сирии и их биотестирование. Вестник защиты растений, 2009, 4: 54-62.
 12. Lee D.W., Je Y.H., Koh Y.H. *Bacillus thuringiensis* isolates from Korean forest environments. *J. Asia Pac. Entomol.*, 2012, 15: 237-239 (doi: 10.1016/j.aspen.2011.12.005).
 13. Patel K.D., Bhanshali F.C., Chaudhary A.V., Ingle S.S. A new enrichment method for isolation of *Bacillus thuringiensis* from diverse sample types. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 170: 58-66 (doi: 10.1007/s12010-013-0145-y).
 14. Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка В.Ф. Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта *Bacillus thuringiensis*. СПб—Пушкин, 2009.
 15. Головки А.Э., Голышин П.Н., Рябченко Н.Ф. Роль *Bacillus thuringiensis* в природных биоценозах. *Микробиология*, 1993, 55(3): 104-110.
 16. Lee I.H., Je Y.H., Chang J.H., Roh J.Y., Oh H.W., Lee S.G., Shin S.C., Boo K.S. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. *Curr. Microbiol.*, 2001, 43: 284-287 (doi: 10.1007/s002840010302).
 17. Li M.S., Je Y.H., Lee I.H., Chang J.H., Roh J.Y., Kim H.S., Oh H.W., Boo K.S. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new δ -endotoxin gene. *Curr. Microbiol.*, 2002, 45: 299-302 (doi: 10.1007/s00284-002-3755-0).
 18. Margalith Y., Ben-Dov E. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. In: *Insect pest management: techniques for environmental protection* /J.E. Rechcigl, N.A. Rechcigl (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, 2000: 243-301.
 19. Armengol G., Hernandez J., Velez J.G., Orduz S. Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) control. *J. Econ. Entomol.*, 2006, 99: 1590-1595.
 20. Arango J.A., Romero M., Orduz S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*). *J. Appl. Microbiol.*, 2002, 92: 466-474 (doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01545.x).
 21. Bai C., Vick A.B., Yi S-X. Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Cochylis hospes*. *Curr. Microbiol.*, 2002, 44: 280-285 (doi: 10.1007/s00284-001-0003-y).
 22. Choi Y.S., Cho E.S., Je Y.H., Roh J.Y., Chang J.H., Li M.S., Seo S.J., Sohn H.D., Jin B.R. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 encoding δ -endotoxin Cry1Ac. *Curr. Microbiol.*, 2004, 48: 47-50 (doi: 10.1007/s00284-003-4102-9).
 23. Al-Momani F., Obeidat M., Saasoun I., Mequam M. Serotyping of *Bacillus thuringiensis* isolates, their distribution in different Jordanian habitats and pathogenicity in *Drosophila melanogaster*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 20: 749-753.
 24. Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве. М., 2005.
 25. Ермолова В.П., Кандыбин Н.В. К вопросу регионального производства биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis*. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем»*. Краснодар, 2006, вып. 4: 255-256.
 26. Кандыбин Н.В. Фундаментальные и прикладные исследования микробиометода защиты растений от вредителей: состояние и перспективы. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем»*. Краснодар, 2006, вып. 4: 32-44.
 27. Dave S.R., Dave R.H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* for Acid red 119 dye decolourisation. *Biores. Technol.*, 2009, 100: 249-253 (doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.019).
 28. Patel K.D., Ingle S.S. Molecular characterization of novel serovars of *Bacillus thuringiensis* isolates from India. *Indian J. Microbiol.*, 2012, 52(3): 332-336 (doi: 10.1007/s12088-011-0240-0).
 29. Khoury M.E., Azzouz H., Chavanieu A., Abdelmalak N., Chopineau J., Awad M.K. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new *cryIAa* gene highly toxic to *Ephestia kuehniella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae. *Arch. Microbiol.*, 2014, 196(6): 435-444 (doi: 10.1007/s00203-014-0981-3).
 30. Мельникова Е.А. О патогенности *Bacillus thuringiensis* и препаратов на их основе

- для теплокровных организмов. В сб.: Энтомопатогенные бактерии и их роль в защите растений. Новосибирск, 1987: 118-131.
31. Raddadi N., Cherif A., Ouzari H., Marzorati M., Brusetti L., Boudabous A., Daffonchio D. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Ann. Microbiol.*, 2007, 57(4): 481-494 (doi: 10.1007/BF03175344).
 32. Smirnoff U.A. The formation of crystals in *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* Berliner before sporulation of temperature inculcation. *J. Insect Pathol.*, 1965, 2: 242-250.
 33. Де Баржас Н., Bonnefoi A.A. Classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key of their differentiation. *Invert. Pathol.*, 1968, 11: 335-337.
 34. Lysenko O. Nonsporeforming bacteria pathogenic to insect: incidence and mechanisms. *Am. Rev. Microbiol.*, 1985, 39: 217-224.
 35. Abbot W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 1925, 18: 265-267.
 36. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М., 1972: 139-142.
 37. Методические указания по применению и методам контроля качества инсектицидного микробиологического средства «Бактицид». М., 2001.
 38. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М., 1973.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: Ermolovavalya1940@mail.ru

Поступила в редакцию
19 августа 2014 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 1, pp. 128-136

Bacillus thuringiensis STRAINS FROM NATURAL SOURCES IN THE LENINGRAD REGION: ISOLATION AND IDENTIFICATION

V.P. Ermolova

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail Ermolovavalya1940@mail.ru

Acknowledgements:

Supported by the Ministry of Education and Sciences of the Russian Federation (Agreement № 14.604.21.0024, RFMEFI60414X0024)

Received August 19, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.128eng

Abstract

Recently crystal-forming bacilli of *thuringiensis* group are considered the main microbial producers of insecticides. For these bacilli the high adaptability is characteristic leading to wide distribution of these anaerobic spore-forming bacteria in nature. The same *Bacillus thuringiensis* subspecies and variants were isolated on different continents regardless the presence and prevalence or absence of the host insects of this entomopathogen. In different countries and regions the researchers are searching for new *B. thuringiensis* isolates. In the paper the data are represented on *B. thuringiensis* isolation from natural substrates in the territory of Leningrad province. A total of 24 samples of soil, litter, water, silt, sick and died insects have been collected. The samples were cultivated on fish agar. Among more than 3,000 colonies, 62 ones with specific morphology were found. By microscopy with black aniline dye a total of 12 isolates of 62 isolates tested were found out to form both spores and differently shaped crystals of the endotoxin. The microorganisms were selected with regard to entomocidal and larvicidal activity and identified using H. De Barjac, A.A. Bonnefoi (1968) and O. Lyzenko (1985) schemes. The investigation made it possible to classify isolates as *B. thuringiensis* of H₁ (var. *thuringiensis*, isolates №№ 12, 20, 40, 41), H_{3a3b} (var. *kurstaki*, isolates №№ 15, 29, 49) and H₁₄ (var. *israelensis*, isolates №№ 14, 25, 33, 38, 44) serovars. With regard to biological properties (production of acetyl methyl carbonate, lecithinase, pigment, β-exotoxin; pellicle in broth culture; sucrose, mannose, cellobiose, salicin fermentation; starch degradation; proteolytic activity) these isolates are close to standard strains. Isolates are characterized by high productivity, entomocidal and larvicidal activity and can be used as producers of biologicals against insects and larvae. In the isolates of BtH₁, BtH_{3a3b} and BtH₁₄ serovars the titers varied as 2.42×10⁹-2.78×10⁹; 1.85×10⁹-2.15×10⁹ and 2.65×10⁹-3.28×10⁹ CFU/ml, respectively. The activity against *Leptinotarsa decemlineata* Say larvae in isolates №№ 12, 41 of the BtH₁ serovar was the same as in standard strain BtH₁ with LD₅₀ at 0.19 %. Entomocidal activity of the isolates №№ 15, 29 and 49 of the BtH_{3a3b} serovar expressed as LD₅₀ for *Ephestia kuehniella* of the 2nd instar was 0.88; 0.82 and 0.92 %, respectively, while in the standard strain BtH_{3a3b} the LD₅₀ was 0.86 %. In the isolates №№ 33, 44 of the BtH₁₄ serovar the titer was the same as in the standard strain, and the activity was even higher compared to the standard. In the isolates

№№ 33, 44 the LD₅₀ for the 4th instar *Aedes aegypti* larvae was 0.17×10⁻³ and 0.16×10⁻³ %, respectively, when in standard strain BtH₁₄ it was 0.18×10⁻³ %. Thus, a total of 12 of the isolates which have been identified as *B. thuringiensis* are close to the type isolates on their biological characteristics and promising as producers of biologics with insecticidal action.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, isolation, identification.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ПРЕДСТАВЛЯЕМЫХ РУКОПИСЕЙ

1. В журнале «Сельскохозяйственная биология» публикуются обзорные, проблемные, оригинальные экспериментальные и методические работы по генетике и селекции сельскохозяйственных растений и животных, защите их от вредителей и болезней, молекулярной биологии, физиологии, биохимии, биофизике, радиобиологии, иммунитету, представляющие интерес для сельского хозяйства. Не публикуются статьи серийные и статьи, излагающие отдельные этапы исследований, которые не позволяют прийти к определенным выводам.
2. Статьи представляются тщательно отредактированными, набранными в программе Word for Windows через два интервала (шрифт 14 Times New Roman) при формате листа А4.
3. Рукопись должна быть подписана авторами и иметь заверенное печатью направление (на публикацию в журнале и в сети Интернет) от учреждения, в котором выполнена работа, подтверждающее, что материалы публикуются впервые. Форма направления размещена на сайте журнала.
4. В комплект, представляемый вместе с рукописью, также входит авторская справка. Форма авторской справки размещена на сайте журнала.
5. Рукопись вместе с комплектом документов представляется в редакцию в электронном виде (направление и авторская справка — в виде графической копии в формате pdf) на электронный адрес редакции с копией на электронный адрес главного редактора см. сайт журнала). При необходимости направить какие-либо документы в редакцию почтовым отправлением просьба не использовать ценные письма и доставку курьерскими службами. Редакция не уведомляет авторов о поступлении материала на рассмотрение.
6. При оформлении статей, содержащих экспериментальные данные, необходимо придерживаться следующей схемы: обзор литературы, цель исследования, методика, результаты и выводы. Объем обзорных и проблемных статей, включая список литературы, не должен превышать 18–22 стр., экспериментальных — 10–12 стр., кратких сообщений — 5 стр. Статья должна содержать реферат, отражающий структуру и основные положения статьи (250–270 слов, с авторским переводом) и ключевые слова (на русском и английском языках).
7. Рисунки снабжаются всеми необходимыми цифровыми или буквенными обозначениями с их пояснениями в подписи к рисунку. Максимальное число таблиц — 3, рисунков — 3; в кратких сообщениях — или 1 таблица, или 1 рисунок.
8. Во избежание ошибок в формулах необходимо четко использовать прописные (заглавные) и строчные буквы, а также верхние и нижние индексы. Сокращаемые слова (названия препаратов, химических соединений, методов, учреждений, латинские названия видов и др.) при первом упоминании приводятся полностью (иностранные — также с русским переводом). Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ (ГОСТ 8.417-81), названия химических соединений, таксономические названия — в соответствии с международной номенклатурой (подробно см. на сайте журнала).
9. Список литературы должен содержать лишь те источники, на которые имеется ссылка в статье. Составляется список в порядке очередности упоминания этих источников в тексте. Для цитируемых книг и сборников приводятся: фамилия и инициалы всех авторов, название, место издания (город, для иностранных источников — город и страна) и год издания; для материалов научных собраний следует указать название, время и место проведения научного мероприятия, название конференции, симпозиума и т.д., при наличии редакторов сборника или книги — указать их фамилии и инициалы; при наличии тома, выпуска указываются их номера, приводятся номера цитируемых страниц «от-до»; для журнальных статей указываются фамилия и инициалы всех авторов, название статьи, полное название журнала, год издания, том, номер (выпуск), страницы «от-до».
10. Необходимо указать фамилию, имя и отчество всех авторов рукописи полностью, фамилии и инициалы в транслитерации, принятые авторами в зарубежных публикациях, место работы, адрес и телефоны (служебный, домашний, мобильный), а также адрес электронной почты (e-mail), официальное название учреждения на английском языке.
11. При несоблюдении правил представления рукописей материалы к рассмотрению не принимаются. При отправке на доработку датой поступления считается дата получения редакцией окончательного принятого к публикации варианта статьи.
12. Аспиранты публикации не оплачивают. Копии отрицательных рецензий направляются авторам, положительных — предоставляются по запросу.
13. Экземпляр журнала с опубликованной статьей авторам не высылается. Журнал распространяется только по подписке. Гонорар не выплачивается. Рукописи не возвращаются.

Подробную информацию см. на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>