УДК 632.937.15 doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062rus

ПОИСК ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *Bacillus thuringiensis* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ*

С.Д. ГРИШЕЧКИНА, В.П. ЕРМОЛОВА, Т.А. РОМАНОВА, А.А. НИЖНИКОВ

Интенсификация сельского хозяйства делает необходимым применение биологических средств защиты растений от вредных насекомых и фитопатогенов. Наибольший интерес представляют препараты на основе энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*, обладающие селективным действием, безопасные для человека, теплокровных животных и окружающей среды. Высокие адаптивные возможности *B. thuringiensis* обусловливают широкое распространение этого вида. В статье представлены результаты выделения *B. thuringiensis* из природных субстратов в Ленинградской области. Были собраны 30 образцов почвы, листьев картофеля, больных и погибших насекомых и др. Методом истощающегося мазка проводили рассев образцов из разных субстратов на рыбный агар. После просмотра более 3500 выросших колоний по морфологическим признакам отобрали 86 культур. Микроскопирование мазков с использованием черного анилинового красителя показало, что 12 из 86 изученных изолятов наряду со спорами образуют кристаллы эндотоксина разной формы. Микроорганизмы отбирали по признакам энтомоцидности и идентифицировали. Исследования позволили классифицировать выделенные бактерии как *B. thuringiensis* и объединить их в два сероваианта — H_1 (var. *thuringiensis*, изоляты №№ 5, 17, 28, 46, 82) и H_{10} (var. *darmstadiensis*, изоляты №№ 12, 15, 32, 35, 39, 48, 56). По биологическим характеристикам (образование ацетилметилкарбинола, лецитиназы, пигмента, β-экзотоксина, формирование пленки на мясопептонном бульоне, использование сахарозы, маннозы, целлобиозы, салицина, расщепление крахмала, протеолитическая активность) изоляты оказались близкими к типовым штаммам. Титры изолятов сероварианторов BtH_1 и BtH_{10} варьировали в пределах соответственно $1{,}3\times10^9$-$2{,}5\times10^9$ и $1{,}5\times10^9$-$2{,}4\times10^9$ КОЕ/мл. Изоляты № 17 BtH_1 и № 56 BtH_{10} по титру были близки к типовым штаммам и незначительно уступали им по содержанию экзотоксина. После селекции титр и содержание экзотоксина у изолятов № 17 BtH_1 увеличились соответственно в 1,32 и 1,50 раза, у № 56 BtH_{10} — в 1,52 и 1,70 раза. Изоляты, отнесенные к серовариантy BtH_{10}, проявляли полифункциональную активностью.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, идентификация, насекомые-фитофаги, фитопатогены, защита растений, полифункциональные биологические препараты.

В экологически безопасных системах земледелия особая роль отводится фитопротективным продуктам на основе микроорганизмов. Около 1 % мирового рынка средств защиты растений составляют биопестициды. На Россию приходится 0,25 % мирового объема биотехнологической продукции для защиты растений (1).

Особое место среди микроорганизмов, которые служат основой биопрепаратов, занимают энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) (2, 3) (доля на рынке биопестицидов — около 90-95 %). В практике Bt используют в качестве энтомоцидного (4, 5), антифунгального (6-8) и ростстимулирующего средства (9, 10). Для Bt характерна технологичность, широкий и селективный спектр действия, безопасность для нецелевых насекомых, теплокровных животных и человека (11, 12). Бактерии образуют споры, параспоральный кристаллический эндотоксин, а некоторые — и термостабильный экзотоксин. Такие свойства стали причиной использования *B. thuringiensis* как основы для экологически безопасных энтомопатогенных препаратов и альтернативы синтетическим химическим пестицидам.

Представители группы *B. thuringiensis* широко распространены в природе благодаря способности эффективно адаптироваться к различным

* 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.

экстремальным условиям. Эти бактерии выделяют из почвенных образцов, из больных насекомых и их трупов. Выявлено более 70 разновидностей, эффективных против фитофагов из отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* и *Hymenoptera*. После обработки растений бактерии Bt длительное время сохраняют жизнеспособность (13, 14).

Высокая биологическая эффективность Bt связана с антифидантными, тератогенными и дерепродуктивными свойствами. Патовар А активен преимущественно против чешуекрылых (*Lepidoptera*), В — против личинок кровососущих комаров и мошек, а также растительноядных комаров (*Diptera*), С — против жесткокрылых (*Coleoptera*) (15).

Бактерии рода *Bacillus* проявляют полиферментативные свойства (благодаря присутствию гидролаз они активны одновременно против вредных насекомых и фитопатогенных грибов), а также образуют антибиотики и токсины (16), среди которых наибольшее значение имеет белковый δ-эндотоксин. В кишечнике при щелочном pH δ-эндотоксин превращается в протоксин, который гидролизуется сериновыми протеазами с образованием истинного токсина (по современной номенклатуре — Cry-токсин).

Важную роль в подавлении численности насекомых играет также термостабильный β-экзотоксин нуклеотидной природы, продуцируемый бактерией во внешнюю среду и действующий через покровы насекомых, что расширяет сферу применения Bt. Экзотоксиносодержащие препараты рекомендованы против колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и паутинного клеща (*Tetranychus urticae* Koch) (5).

Благодаря наличию кристаллов эндотоксина, экзотоксина, фосфолипазы С и спор у Bt проявляется энтомотоксический, энтомопатогенный и метатоксический эффекты. Бактерии, проникая в организм насекомых, вызывают заболевания, которые сопровождаются септицемией. Паразит переходит в больших количествах в гемолимфу, попадает в эпителий кишечника, где интенсивно размножается и вызывает гибель насекомых (2).

Антифунгальная активность Bt связана с продукцией и выделением протеазы и хитиназы, которые лизируют клеточные стенки фитопатогенных грибов (17), и содержимое гиф гриба становится источником питания и энергии для *B. thuringiensis*. За антагонистический эффект также отвечают липопептидные циклические антибиотики, которым в последние годы уделяется большое внимание. Кроме того, *B. thuringiensis* могут вырабатывать антибиотики полипептидного и аминогликозидного ряда, способные подавлять рост и развитие вредных организмов (18).

Сочетание различных механизмов воздействия у бактерий рода *Bacillus* (их штаммы способны продуцировать от 50 до 200 биологически активных веществ) создает основу для эффективного снижения численности вредных организмов. Однако ассортимент биологических пестицидов значительно меньше, чем химических.

Для разработки и производства биопрепаратов необходимы активные исходные штаммы, поиск которых ведется в природных источниках по критериям технологичности, активности и спектра действия. Важная роль здесь принадлежит специализированным банкам биологических агентов (коллекциям микроорганизмов).

В настоящей работе впервые получены изоляты BtH_1 № 17 и BtH_{10} № 56, которые могут использоваться при создании полифункциональных биологических пестицидов.

Нашей целью было выделение из природных субстратов, идентификация и отбор бактерий *Bacillus thuringiensis* — перспективных продуцентов биопрепаратов против вредителей и болезней растений.

Методика. Сбор 30 образцов из различных субстратов (почвы, ботвы картофеля, личинок и имаго колорадского жука) проводили в Ленинградской области на картофельных полях.

Для выделения микроорганизмов 1 г почвы, листовую пластинку или насекомых (больные особи и трупы), фламбированных над пламенем спиртовки и растертых в ступке стерильным пестиком, помещали в пробирку с 5 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали в течение 1 мин. Одну каплю полученной взвеси вносили в чашки Петри на рыбный агар (РА) методом истощающегося мазка. Чашки инкубировали в термостате при 28 °С. Через 7 сут изучали морфологический тип колоний и при микроскопировании (микроскоп Laboval 4, «Carl Zeiss Jena», Германия, увеличение ×900) учитывали образование кристаллов δ-эндотоксина и спор. Колонии, отобранные по морфологическим признакам, характерным для Bt, пересевали штрихами на РА в чашки Петри, разделенные для удобства на 8 секторов.

На этом же этапе готовили и просматривали мазки, окрашенные по В.А. Смирнову (19) с использованием черного анилинового красителя.

Предварительный скрининг изолятов осуществляли по признакам энтомоцидности, идентификацию — согласно схемам для *B. thuringiensis* по H. De Barjac и A. Bonnefoi (20) и O. Lysenko (21).

При изучении биохимических свойств микроорганизмов взамен жидких дифференциально-диагностических сред использовали системы индикаторных бумажных (СИБ) дисков (НПО «Микроген» МЗРФ, Россия) с определенным количеством субстрата в сочетании с соответствующим индикатором, стабилизированных пленкообразующим покрытием (поливиниловый спирт). При определении способности использовать углеводы в 0,3 мл стерильного 0,85 % раствора NaCl (pH 7,3±0,1) суспендировали содержимое одной микробиологической петли суточной агаровой культуры, выращенной при температуре 29±1 °С, и в нее погружали диск с соответствующим углеводом (контролем — диски, погруженные в стерильный 0,85 % раствор NaCl). Учет проводили через 5-18 ч. Аналогичным образом с применением СИБ оценивали индолообразование, уреазную активность, усвоение сероводорода, образование 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 29 °С до образования спор и кристаллического эндотоксина. Титр клеток учитывали общепринятым методом серийных разведений с высевом на РА.

Энтомоцидную активность, выраженную в $ЛК_{50}$ для личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) природной популяции, а также содержание экзотоксина как $ЛК_{50}$ для личинок комнатной мухи (*Musca domestica* Linnaeus) определяли согласно описанию (22).

Антифунгальную активность оценивали методом агаровых блоков (23). Для этого тест-культуры грибов (*Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum*) выращивали на картофельном агаре в чашках Петри сплошным газоном в течение 7 сут. В расплавленный и охлажденный до 40 °С картофельный агар вносили культуру изолятов Bt с соответствующим титром в количестве 10 % к объему среды, перемешивали и разливали в чашки Петри. На поверхность застывшего агара с Bt помещали блоки (диаметр — 1 см), вырезанные из 7-суточного газона тест-культуры гриба. Контролем служила среда без Bt. Чашки помещали в термостат при 28 °С. Через 7 сут измеряли диаметр колоний гриба. Процент ингибирования роста колоний гриба рассчитывали по формуле W.S. Abbot (24) как $(Д_к - Д_о) \cdot Д_к^{-1} \cdot 100$, где $Д_к$ и $Д_о$ —

диаметр колоний гриба соответственно в контроле и опыте, см.

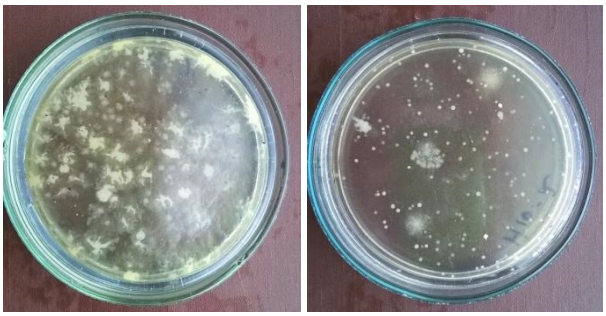
Селекцию Bt осуществляли в несколько этапов: рассев культуры на РА методом истощающегося мазка, отбор типичных для Bt колоний (серовато-белого цвета, округлые или неправильной формы с мелкошероховатой поверхностью), микроскопический анализ культуры с учетом образования δ-эндотоксина и спор в соотношении 1:1, оценка на технологичность при культивировании глубинным методом и на содержание экзотоксина по $ЛК_{50}$, мкл/г корма для личинок *Musca domestica*.

Полученные данные обрабатывали с помощью стандартного метода дисперсионного анализа (25). Рассчитывали средние (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при доверительном интервале 95 % ($p < 0,05$).

Результаты. Из разных субстратов были получены 30 образцов и исследованы на микрофлору. Рассевы проводили на рыбном агаре (РА). Из проанализированных более чем 3500 колоний по морфологическим признакам, цвету, форме и консистенции были отобраны 86 изолятов рода *Bacillus*. После рассева культур через 7 сут при 26-28 °С происходит лизис спорангиев и высвобождение спор и кристаллов эндотоксина. При рассеве образовывались серые или кремовые плоские матовые колонии с неправильными контурами, по консистенции мягкие, мелкозернистые. По морфолого-культуральным признакам (табл. 1) мы отобрали 12 изолятов, относящихся к BtH_1 и BtH_{10}.

1. Морфолого-культуральные признаки изолятов *Bacillus thuringiensis* ssp., выделенных из природных субстратов в Ленинградской области

Признак	BtH_1	BtH_{10}
Окрашивание по Граму	Грамположительные	Грамположительные
Форма и размер вегетативных клеток	Ровные или слегка извилистые палочки размером 2,5-3,0×0,8-0,9 мкм	Палочковидные клетки размером 1,2-1,5×2,5-4,5 мкм
Подвижность	Перитрихиальное жгутикование	Перитрихиальное жгутикование
Соединение клеток	Короткие цепочки	Единичные или короткие цепочки
Образование спор	Субтерминальное	Субтерминальное
Форма и размер спор	Овальные 0,8-0.9×1,1-1,3 мкм	Овальные 0,8-1,4 мкм
Форма и размер кристаллического белкового эндотоксина	Правильная ромбовидная с четкими гранями, 1,2-4,5×0,5-2,3 мкм	Тетрагональная, бипирамидальная или овоидная, 0,2-0,6×0,3-0,8 мкм
Диаметр	0,8-1,5 см	0,4-0,8 см
Поверхность	Мелкошероховатые	Шероховатые
Профиль	Плоские	Плоские
Оптические свойства	Матовые	Непрозрачные, матовые
Окраска колоний	Серо-белые	Серовато-белые
Окраска субстрата	Не изменяется	Не изменяется
Край	Неровный	Неровный
Структура	Мелкозернистая	Мелкозернистая
Консистенция	Мягкая	Мягкая



Рост колоний выделенных изолятов *B. thuringiensis* H_1 (слева) **и *B. thuringiensis* H_{10}** (справа) **на рыбном агаре.**

Вид колоний на рыбном агаре у изолятов несколько различался (рис.). Микроскопия показала, что они наряду со спорами образуют кристаллы эндотоксина разной формы.

При изучении основных физиолого-биохимических признаков было установлено (табл. 2), что из 12 отобранных изолятов 5 относятся к *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (BtH_1) и 7 — к *Bacillus thuringiensis* var.

darmstadiensis (BtH_{10}). Из источников азота они использовали пептон, мясной и рыбный бульон, дрожжи белковые кормовые, расщепляли глюкозу, маннозу, левулезу, мальтозу, целлобиозу, не использовали галактозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, лактозу, раффинозу, маннит, дульцит, сорбит, инулин, инозит. Эти изоляты разжижали желатин, пептонизировали молоко, гидролизовали крахмал, использовали цитраты, образовывали ацетилметилкарбинол. Образование пигмента и уреазы у них не отмечали. Индол и сероводород они не использовали, редуцировали нитраты в нитриты. Изоляты BtH_1, в отличие от изолятов BtH_{10}, образовывали лецитиназу, расщепляли сахарозу, салицин, глицерин. В остальном по биохимическим признакам они были схожими (см. табл. 2).

2. Основные физиолого-биохимические свойства изолятов BtH_1 и BtH_{10}, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области

№ изолята	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
82	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
BtH_1 (эталон)	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
15	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
32	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
35	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
39	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
48	+	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+
56	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+
BtH_{10} (эталон)	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+

Примечание. «+» и «–» — проявление или отсутствие признака; 1, 2, 3, 4, 5 — образование соответственно ацетилметилкарбинола, лецитиназы, пигмента, экзотоксина, пленки на мясопептонном бульоне (МПБ), 6, 7, 8, 9 — использование соответственно сахарозы, маннозы, глицерина, салицина, 10 — расщепление крахмала, 11 — протеолиз мясопептонного желатина.

У отобранных изолятов сравнили технологичность, экзотоксинообразование и антифунгальную активность (табл. 3).

3. Биологическая характеристика изолятов BtH_1 и BtH_{10}, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области ($M \pm SEM$)

№ изолята	Титр спор в культуральной жидкости, $\times 10^9$/мл	Содержание экзотоксина, $ЛК_{50}$, мкл/г корма для *Musca domestica*	Ингибирование роста колоний, %	
			Botrytis cinerea	*Fusarium oxysporum*
5	2,0±0,3	6,7±0,2	13,9±1,2	11,2±0,9
17	2,5±0,2	5,0±0,2	18,2±1,9	13,4±1,1
28	1,7±0,2	7.6±0,3	15,3±1,8	12,4±1,2
46	1,3±0,4	8,4±0,2	11,8±0,9	9,7±1,5
82	1,7±0,3	8,1±0,1	12,7±1,1	8,2±0,8
BtH_1 (эталон)	2,5±0,2	4,1±0,2	18,8±1,4	12,1±1,2
12	1.4±0,1	6,9±0,2	50,5±1,9	37,4±1,4
15	2,3±0,3	6,1±0,1	61,9±1,8	57,4±1,7
32	1,7±0,2	7,5±0,3	52,1±2,0	40,9±1,6
35	1,9±0,1	7,8±0,2	48,4±1,6	38,1±1,3
39	1,5±0,1	8,1±0,2	58,4±1,8	42,3±0,9
48	1,9±0,2	6,3±0,1	60,3±2,1	52,1±1,6
56	2,4±0,2	4,9±0,2	72,3±1,7	65,3±1,2
BtH_{10} (эталон)	2,6±0,1	3,9±0,2	73.3±1,9	66,1±2,0

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

Выделенные штаммы Bt в дополнение к инсектицидной активности обладали антифунгальным действием, но у штаммов BtH_1 она была значительно ниже, чем у BtH_{10}. По нашим данным (15, 17), механизм антифунгального действия Bt связан с несколькими факторами. Бактерии продуцируют и выделяют во внешнюю среду литические ферменты, в частности протеазу и хитиназу, которые лизируют клеточные стенки фитопатогенных

грибов. При лизисе содержимое гиф гриба становится источником питания и энергии для бацилл (26).

Выполненный анализ производственно значимых показателей позволил отобрать штаммы BtH_1 № 17 и BtH_{10} № 56, продемонстрировавшие наилучшие результаты. Так, по технологичности и содержанию экзотоксина штамм BtH_1 № 17 превосходил остальные соответственно в 1,25-1,90 и в 1,34-1,68 раза, штамм BtH_{10} № 56 — в 1,23-1,70 и в 1,28-1,65 раза. С целью улучшения этих признаков у изолятов BtH_1 № 17 и BtH_{10} № 56 мы провели их селекцию. Через 7 сут роста после высева методом истощающего мазка из 50 колоний каждого изолята методом микроскопии отобрали по 25 вариантов с образованием кристаллического эндотоксина и спор в соотношении 1:1. Далее при глубинном культивировании отобрали по 10 вариантов с титром не менее 3×10^9 КОЕ/мл и оценили у них содержание экзотоксина и энтомоцидную активность (22). У изолята BtH_1 № 17 титр спор ($\times10^9$/мл культуральной жидкости) в результате составил 3,3±0,2 против исходного 2,5±0,2 (на 32,0 % технологичнее), содержание экзотоксина ($ЛК_{50}$, мкл/г корма для *Musca domestica*) — 3,8±0,2 против 5,0±0,2 (на 24,0 % больше); у BtH_{10} № 56 эти показатели равнялись соответственно 3,8±0,2 против 2,4±0,2 (на 58,3 % технологичнее) и 2,9±0,2 против 4,9±0,2 (на 40,8 % больше) (различия статистически значимы при $p < 0,05$).

Энтомоцидная активность изолятов BtH_1 № 17 и BtH_{10} № 56, выраженная в $ЛК_{50}$ для личинок колорадского жука 2-го возраста, была высокой — соответственно 0,26 и 0,24 % (при определении использовали культуральную жидкость Bt в концентрациях 5; 1; 0,25 %; контроль — вода).

В заключение следует отметить, что изучение потенциала использования и механизмов действия штаммов Bt, поиск и описание свойств вновь выделяемых изолятов как возможных агентов в биоконтроле вредителей и болезней растений остаются крайне актуальными (27-29). Полученные нами результаты указывают на перспективность штаммов BtH_1 № 17 и BtH_{10} № 56 в качестве продуцентов биопрепаратов, причем BtH_{10} № 56 обладает одновременно энтомоцидной и антифунгальной активностью, то есть полифункциональностью (на этот штамм подана заявка на изобретение). Эти данные согласуются с результатами выполненных ранее исследований полифукциональной активности бактерий *B. thuringiensis*, у которых, наряду с биоинсктицидными свойствами, нами обнаружены антифунгальный и ростстимулирующий эффекты (26).

Таким образом, наши исследования в очередной раз подтверждают, что энтомопатогенные кристаллообразующие бациллы *Bacillus thuringiensis* встречаются в почве, листьях, больных насекомых и их трупах, в местах обитания насекомых. Идентификация и биотестирование показали, что выделенные нами изоляты, относящиеся к серовариантам *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* и *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis*, по биологическим свойствам и практической значимости близки к типовым штаммам. Очевидно, что с помощью аналитической селекции, подбора питательных сред и режимов культивирования можно усилить практически ценные свойства этих изолятов и с успехом использовать их в качестве продуцентов биопрепаратов с энтомоцидными и антифунгальными свойствами для контроля численности вредных насекомых и фитопатогенов. Особый интерес представляют изоляты с множественной активностью, отнесенные к серовариантy BtH_{10}. Микробные препараты полифункционального действия могут составить конкуренцию химическим пестицидам не только с точки зрения экологической безопасности, но и по экономическим показателям, учитывая защитный эффект против вредителей и болезней.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: svetagrishechkina@mail.ru ✉, Ermolovavalya1940@mail.ru,
tat55176969@yandex.ru, ant.nizhnicov@gmail.com

Поступила в редакцию 10 ноября 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2018, V. 53, № 5, pp. 1062-1069

SEARCH FOR NATURAL ISOLATES OF *Bacillus thuringiensis* FOR DEVELOPMENT OF ECOLOGICALLY FRIENDLY BIOLOGICALS

S.D. Grishechkina, V.P. Ermolova, T.A. Romanova, A.A. Nizhnikov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail: svetagrishechkina@mail.ru (✉ corresponding author), Ermolovavalya1940@mail.ru, tat55176969@yandex.ru, ant.nizhnicov@gmail.com
ORCID:
Grishechkina S.D. orcid.org/0000-0002-4877-705X
Ermolova V.P. orcid.org/0000-0002-9473-8334
Romanova T.A. orcid.org/0000-0003-1773-2956
Nizhnikov A.A. orcid.org/0000-0002-8338-3494
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the project of applied research and experimental development (PNER) 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 (project) RFMEFI60717X0178
Received November 10, 2017 doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062eng

Abstract

Intensification of agriculture determined the use of biopesticides for plant protection against harmful insects and phytopathogens. Currently, the biological preparations derived from the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* are of considerable interest since they have high specificity of action, safety for humans, warm-blooded animals, beneficial insects and the environment. High adaptive capacity of *B. thuringiensis* underlies its widespread distribution in nature. This paper represents the results of the screening for novel *B. thuringiensis* isolates from the natural substrates in the Leningrad region. There were 30 samples of substrates collected including soil, potato leaves, sick and dead insects. These samples were colony-purified on the fish agar medium. Based on morphology, 86 candidate colonies were selected from 3 500 colonies analyzed. Aniline Black staining coupled with optical microscopy demonstrated that 12 out of 86 isolates formed crystalline endotoxins of different shapes along with the spores. The isolated microorganisms were selected by their entomocidal activity and identified. As a result of this analysis, isolated bacteria were identified as *B. thuringiensis* and divided onto the two serovars: H_1 (var. *thuringiensis,* isolates 5, 17, 28, 46, 82) and H_{10} (var. *darmstadiensis*, isolates 12, 15, 32, 35, 39, 48, 56). According to their biological characteristics (the formation of acetylmethylcarbinol, lecithinase, pigment, beta-exotoxin, film formation on meat-peptone broth, the utilization of sucrose, mannose, cellobiose, salicin, starch digestion as well as proteolytic activity), the analyzed isolates were similar to the reference strains. The titers of the isolates of the BtH_1 and BtH_{10} serovars varied within limits of 1.3×10^9-2.5×10^9 and 1.5×10^9-2.4×10^9 CFU/ml, respectively. Isolates 17 BtH_1 and 56 BtH_{10} were close to the reference strains by the titer and slightly decreased in the exotoxin content. After selection, the titer and the exotoxin content of the 17 BtH_1 and 56 BtH_{10} isolates increased 1.32- and 1.50-fold, as well as 1.52- and 1.70-fold, respectively. In addition, the isolates referred to the BtH_{10} serovars exhibited polyfunctional activity.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, identification, phytophagous insects, phytopathogens, plant protection, polyfunctional biologicals.

REFERENCES

1. Monastyrskii O.A. *Zashchita i karantin rastenii*, 2008, 12: 41-44 (in Russ.).
2. Kandybin N.V., Patyka T.I., Ermolova V.P., Patyka V.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis* [Insect number microbiocontrol and its dominant, the *Bacillus thuringiensis* bacteria]. St. Petersburg—Pushkin, 2009 (in Russ.).
3. Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.*, 2015, 132: 1-41 (doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009).
4. Mnif I., Ghribi D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Prot.*, 2015, 77: 52-64 (doi: 10.1016/j.cropro.2015.07.017).
5. 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* [Biological products based

on bacteria of the genus *Bacillus* for plant health management]. Novosibirsk, 2016 (in Russ.).
6. Belyaev F.F., Pospelova N.P., Lelyak F.F., Shternshis M., Shpatova T. The use of *Bacillus spp.* Strains for biocontrol of *Ramularia* leaf spot on strawberry and improving plant health in Western Siberia. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2016, 7(1): 1594-1606.
7. Donmez V.F., Uysal B.D., Erkol E.F., Sezai C.R. Biological control of root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn on potato and bean using antagonist bacteria. *Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus = Ogrodnictwo,* 2015, 14(5): 29-40.
8. Haidar R., Deschamps A., Roudet J., Calvo-Garrido C., Bruez E., Rey P., Fermaud M. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major phathogen of grapevine. *Biol. Control.*, 2016, 92: 55-65 (doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.09.003).
9. Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants — with special reference to induced systemic resistance. *Microbiol. Res.*, 2009, 164(5): 493-513 (doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007).
10. Kumar P., Dubey R.C., Mahshwari D.K. *Bacillus* strain isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phythopathogens. *Microbiol. Res.*, 2012, 167(8): 493-499 (doi: 10.1016/j.micres.2012.05.002).
11. 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(1): 58-66 (doi: 10.1007/s12010-013-0145-y).
12. Raymond B., Federici B.A. In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity — a response to EFSA. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2017b 93(7): fix084 (doi: 10.1093/femsec/fix084).
13. Al-Khamada A.D. *Vestnik zashchity rastenii, 2009, 4: 54-62* (in Russ.).
14. Ermolova V.P. *Bacillus thuringiensis* strains from natural sources in the Leningrad region: isolation and identification. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2016, 51(1): 128-131 (doi: 10.15389/agrobioligy.2016.1.128eng).
15. Grishechkina S.D. Mechanism and activity spectrum of microbiological preparation Batsikol with phytoprotective action. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2015, 50(5): 685-693 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.685eng).
16. Aronson A., Shai Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, 195(1): 1-8 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10489.x).
17. Saber W.I.A. Ghoneem K.V., Al-Askar A.A., Rashad Y.M., Ali A.A., Rashad E.M. Chitinase production by *Vacillus subtilis ATCC 11774 and its effect on biocontrol of Rhizoctonia disease of potato. Acta Biologica Hungarica, 2015, 66(4): 436-448 (doi: 10.1556/018.66.2015.4.8*).
18. Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-Leyn J., Hammami I., Ali Triki M., Manresa A., Ghribi D. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB_1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani. Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2016, 23(7): 6690-6699 (doi: 10.1007/s11356-015-5826-3).
19. Kol'chevskii A.G., Rybina L.M., Kolomiets V.Ya. *Vydelenie i otbor vysokovirulentnykh kul'tur Bacillus thuringiensis var. galleriae* /Pod redaktsiei V.A. Pavlyushina [Isolation and selection of highly virulent cultures of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae.* V.A. Pavlyushin (ed.)]. Leningrad, 1987 (in Russ.).
20. De Barjac H., Bonnefoi A. A slassification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.*, 1968, 11: 335-347 (doi: 10.1016/0022-2011(68)90182-1).
21. Lysenko O. Non-sporeforming bacteria pathogenic to insect: incidence and mechanisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1985, 39: 673-695 (doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.003325).
22. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Minina G.N., Safronova V.I., Bologova E.V. *Metodika. Kollektsiya shtammov bakterii — simbiontov vrednykh nasekomykh i gryzunov, prigodnykh dlya biokontrolya chislennosti vreditelei sel'skokhozyaistvennykh rastenii* [The technique. Collection of bacteria strains — symbionts of harmful insects and rodents, suitable for biocontrol of the number of pests of agricultural plants]. St. Petersburg, 2014 (in Russ.).
23. Metody eksperimental'noi mikologii /Pod redaktsiei V.I. Bilai [Methods of experimental mycology. V.I. Bilai (ed.)]. Kiev, 1982 (in Russ.).
24. 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).
25. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1985 (in Russ.).
26. Smirnov O.V., Grishechkina S.D. Polyfunctional activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 3: 123-126 (in Russ.).
27. Seo D.J., Nguyen D.M., Song Y.S., Jung W.J. Induction of defense response against *Rhizoctonia solani* in cucumber plant by endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 22(3): 407-415 (doi: 10.4014/jmb.1107.07027).
28. Martinez-Absalyn S., Rojas-Solís D., Hernandez-Leyn R., Prieto-Barajas C., Orozco-Mosqueda M., Peca-Cabriales 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 Sci. Technol.*, 2014, 24(12): 1349-1362 (doi: 10.1080/09583157.2014.940846).
29. Jouzani GS., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101(7): 2691-2711 (doi: 10.1007/s00253-017-8175-y).