СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2019, том 54, № 6, с. 1267-1280

Биопрепараты и продуценты

УДК 579.64:632.937.15 doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1267rus

ИНСЕКТИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Сообщение I: СПЕКТР ДЕЙСТВИЯ ЛАРВИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА 7-1/23А*

В.П. ЕРМОЛОВА[1], С.Д. ГРИШЕЧКИНА[1], А.М. РАХМАН[2], К.С. АНТОНЕЦ[1], М.Е. БЕЛОУСОВА[1], В.В. ЯХНО[1], А.А. НИЖНИКОВ[1]

Кровососущие комары и мошки из отряда Двукрылые (*Diptera*), которые участвуют в передаче ряда опасных инфекционных заболеваний животных и человека, относятся к объектам санитарно-эпидемиологического и ветеринарно-эпизоотологического контроля. Воздействие этих насекомых снижает продуктивность сельскохозяйственных животных (удои молока, яйценоскость кур) и даже может приводить к их гибели. Проблема биозащиты от вредных насекомых крайне актуальна и в растениеводстве, в том числе при выращивании сеяных кормовых культур. В качестве основы для биологических инсектицидов — современной экологически и социально приоритетной альтернативы химическим пестицидам — в настоящее время широко используются спорообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Против кровососущих и растительноядных комаров разработана и получена жидкая форма ларвицидного препарата на основе оригинального штамма *B. thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А (ФГБНУ ВНИИСХМ; депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения RCAM ФГБНУ ВНИИСХМ под регистрационным номером RCAM 00626, патент РФ 2539732 от 09.12.2014). В состав жидкой формы препарата входит спорокристаллический комплекс, 5 % NaCl (консервант), 2 % хвойного экстракта (отдушка), остатки питательной среды; титр — $4,25\times10^9$ КОЕ/мл, ларвицидная активность, выраженная в $ЛК_{50}$ для личинок *Aedes aegypti* IV возраста (L_4), — $0,11\times10^{-3}$ % (тест согласно рекомендации Всемирной организацией здравоохранения, WHO). Штамм BtH_{14} 7-1/23А ранее выделили из пробы, взятой в анофелогенном водоеме в Ленинградской области, изучили его физиологические и культуральные особенности и охарактеризовали согласно классификации De Barjac и Bonnefoi. В настоящей работе впервые выполнен комплексный анализ ларвицидного препарата на основе BtH_{14} 7-1/23А, включающий молекулярно-генетическую характеристику продуцента, определение ларвицидной активности в отношении ряда вредных двукрылых, а также оценку его влияния на рост и развитие нецелевых объектов (мицелий вешенки и шампиньона). Проведенное секвенирование гена, кодирующего В-субъединицу ДНК-гиразы *gyrB*, подтвердило, что штамм 7-1/23А представляет собой *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Наличие генов *cry4* и *cry11*, кодирующих белковые инсектицидные токсины, было установлено с помощью ПЦР-анализа. Мы изучили спектр действия препарата как против кровососущих комаров родов *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, так и против вредоносных растительноядных двукрылых — рисового (*Cricotopus sylvestris* Fabr.) и грибного (*Lycoriella fucorum* Frey) комариков. Анализ, выполненный в лабораторных и полевых условиях (2014-2016 годы, Ленинградская и Московская области, Краснодарский край, аедогенные, анофелогенные водоемы, сырые цокольные помещения, рисовые чеки), включал также изучение влияния препарата на рост мицелия съедобных грибов — вешенки (*Pleurotus ostreatus*) и шампиньона (*Agaricus campestris*) как биоэкоиндикаторов. При лабораторной оценке эффективности препарата против комаров родов *Culex* и *Aedes* величина $ЛК_{50}$ составила $0,11\times10^{-3}$-$0,12\times10^{-3}$ %, $ЛК_{50}$ для L_4 *Anopheles maculipennis* Meigen равнялась $0,29\times10^{-3}$ %. Полевые испытания в водоемах против малярийного комара (*Anopheles maculipennis*) и немалярийных комаров рода *Aedes* (*communis, dorsalis, punctor, caspius, flavescens*), в сырых цокольных помещениях против *Culex pipiens molestus* Linnaeus, на рисовых чеках против *Cricotopus sylvestris* Fabr. показали 90,2-100 % гибели личинок. При этом в концентрации 5 % препарат стимулировал рост мицелия грибов на 28,2-32,5 %. Сравнение действия биопрепарата и химического инсектицида — ингибитора синтеза хитина Димилина (Dimilin, «Arysta LifeScience S.A.S.», Франция) против личинок грибного комарика семейства *Lycoriidae* (*Lycoriella fucorum* Frey) в рекомендованных дозах раздельно и сниженных — при совместном применении показало, что сочетание препаратов при 4-

* При выполнении исследования использовалось оборудование ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. 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.

8-кратном снижении их доз вызывало гибель 97,2 % личинок с прибавкой урожая на 38,6 %. Таким образом препарат на основе BtH_{14} 7-1/23А перспективен для санитарной экологии и ветеринарии, кроме того, целесообразно изучить возможности его применения против насекомых — вредителей сеяных кормовых культур.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH_{14}), титр, ларвицидная активность, ростстимулирующая активность, биологический препарат, токсины Cry.

Кровососущие двукрылые насекомые наносят значительный экономический ущерб животноводству. В районах их массового распространения молочная продуктивность коров снижается на 20-30 % и более, прирост живой массы молодняка — на 20-40 %, увеличивается заболеваемость и падеж животных от истощения, особенно среди северных оленей и пушных зверей. Кроме того, эти насекомые причиняют санитарно-эпидемиологический вред как источники и переносчики возбудителей инфекционных и инвазионных болезней человека и животных (малярия, желтая лихорадка, лихорадка Денге, филяриоз, анаплазмоз крупного рогатого скота сибирская язва, туляремия, бруцеллез, чума плотоядных, онхоцеркозы и др.) (1). Длительное время борьбу с кровососущими комарами вели разнообразными способами, вплоть до нефтевания водоемов и обработки универсальными высокотоксичными химическими препаратами. Однако это привело к отрицательным последствиям — массовой гибели рыб, птиц, амфибий, многих других организмов, к превращению водоемов в непригодные для водоснабжения, водопоя, купания, а также к развитию резистентности к химическим инсектицидам в популяциях комаров (2, 3).

Перспективной альтернативой традиционным химическим препаратам для регуляции численности вредных двукрылых служат биологические препараты на основе бактерии *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH_{14}) (4). После открытия инсектицидного действия Bti в отношении кровососущих комаров и мошек в 1976 году проведены многочисленные исследования, подтверждающие безопасность этих бактерий для позвоночных и нецелевых беспозвоночных, делящих одно местообитание с личинками комаров (4, 5). Селективность действия BtH_{14} обеспечивается наличием у восприимчивых личинок комаров определенного внутрикишечного pH, специализированных ферментов и специфичных рецепторов связывания токсинов BtH_{14}. Таким образом, токсины, ответственные за патогенный эффект у личинок комаров, не оказывают влияния на нецелевые организмы и, следовательно, в рекомендованных дозах пригодны для повсеместного применения (4, 6).

Бактерии группы *thuringiensis* образуют споры, продуцируют кристаллические эндотоксины (7), термостабильный экзотоксин (8), другие белки и соединения с инсектицидными и антифунгальными свойствами (9-11), а некоторые проявляют ростостимулирующий эффект (12, 13). Бактерии *B. thuringiensis* обнаружены в Европе, Северной Америке, на Ближнем Востоке, Индии, Японии (14-16). По объемам производства ведущее место отводится препаратам на основе Bt (17-19), доля которых на рынке биопестицидов превышает 60 %. К их преимуществу можно отнести технологичность, широкий спектр действия (20-22), безопасность для человека и окружающей среды (23, 24), нецелевых насекомых (25-27). На сегодня это направление исследований в научном мире остается одним из актуальных и приоритетных (28, 29). К настоящему времени учеными разных стран выделено и идентифицировано свыше 70 вариантов Bt, эффективных против фитофагов из отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* и *Hy-*

menoptera (30, 31), с высокой технологичностью, вирулентностью и широким спектром действия.

Новизну выполненной нами работы определяют результаты молекулярно-генетической идентификация филогенетического положения штамма *B. thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23A (BtH_{14} 7-1/23A) посредством секвенирования гена *gyrB*, выявление генов *cry4* и *cry11*, кодирующих белковые инсектицидные токсины, при помощи полимеразной цепной реакции, а также данные по оценке влияния BtH_{14} 7-1/23A на рост и развитие нецелевых объектов (мицелий вешенки и шампиньона), проведенной в целях расширения функциональности препарата на основе этого штамма.

Нашей задачей было изучение спектра действия инсектицидного препарата на основе штамма BtH_{14} 7-1/23A.

Методика. Штамм *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23 A (BtH_{14} 7-1/23A) выделили из пробы, взятой в анофелогенном водоеме в Ленинградской области и охарактеризовали его свойства согласно идентификации H. De Barjak и A. Bonnefoi (32) (патент РФ 2539732 от 09.12.2014).

Для выделения геномной ДНК штамм BtH_{14} 7-1/23A выращивали на агаризованной среде Лурия-Бертани (ЛБ, 2 % бактериологического агара) при 30 °С в течение 16-18 ч. Затем бактериальные клетки суспендировали в буфере Tris-EDTA (1 M Tris-HCl, pH 7,5 + 0,5 M EDTA, pH 8,0) и нагревали 10 мин при 102 °С. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (15000 g в течение 3 мин). Надосадочную жидкость переносили в чистые эппендорфы и использовали для дальнейших исследований (33). Концентрацию выделенной ДНК измеряли на флуориметре Qubit™ 4 Fluorometer («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

Программу для полимеразной цепной реакции (ПЦР) подбирали, исходя из температуры отжига праймеров и величины амплифицируемого фрагмента. Начальная денатурация длилась 5 мин при 95 °С, затем следовали 30 циклов — денатурация 30 с при 95 °С, отжиг 30 с при выбранной температуре, элонгация при 72 °С в течение времени, соответствующего указанному для праймеров (целевых фрагментов); заключительную элонгацию проводили в течение 10 мин при 72 °С и заканчивали программу стадией хранения при 12 °С (амплификатор T100, «Bio-Rad», США). Реакционная смесь для ПЦР (20 мкл) содержала геномную ДНК бактерий (100 нг), 10 мкл смеси FermentasDreamTaq green PCR master mix («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США) и праймеры в конечной концентрации по 1 пмоль/мкл. Размер продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с окрашиванием 0,002 % бромистым этидием посредством сравнения с маркером λ ДНК/HindIII («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). В качестве отрицательного контроля в ПЦР использовали штамм *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 (BtH_{10} 56).

Амплифицированный фрагмент гена g*yrB* секвенировали по Сэнгеру (34) на приборе CEQ 8000 («Beckman Coulter», США). Для анализа нуклеотидных последовательностей применяли программу The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Для изучения методом световой микроскопии (Zeiss Axio Imager A2, «Carl Zeiss», Германия) культуру BtH_{14} 7-1/23A выращивали на рыбном агаре (РА, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия) при 28-30 °С до образования спор и кристаллического эндотоксина и окрашивали анилиновым черным («Lucar»,

Россия) (35). Продуктивность штамма определяли на модифицированной регламентной дрожже-полисахаридной среде (соотношение компонентов и добавок составляет коммерческую тайну) при выращивании глубинным способом в колбах Эрленмейера на качалке с аэрацией (220 об/мин) в течение 68 ч при 30 °С. Титр клеток учитывали общепринятым методом серийных разведений с высевом на РА. На основе этого штамма получили биологический препарат жидкой формы, в состав которого входил спорокристаллический комплекс, 5 % NaCl (консервант), 2 % хвойного экстракта (отдушка), остатки питательной среды (филиал «Экос» ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург—Колпино).

Ларвицидную активность препарата оценивали на личинках комаров *Aedes aegypti* IV возраста инсектарной популяции, а также на личинках комаров рода *Aedes*, *Culex pipiens pipiens* forma *molestus*, *Anopheles maculipennis* II и IV возрастов из природных популяций. Личинок рода *Aedes* отлавливали в мае в аедогенных водоемах, личинок *Anopheles maculipennis* — в июле в анофелогенных водоемах, *Culex pipiens pipiens* f. *molestus* — в цокольных затопленных помещениях в течение года. В день сбора личинок разделяли по возрастам и проводили тест согласно рекомендации Всемирной организацией здравоохранения (в редакции 2002 года). В качестве эталона использовали препарат на основе штамма *B. thuringiensis* var. *israelensis* 33 с титром $3{,}12\times10^9$ КОЕ/мл и $ЛК_{50}$ для *A. aegypti* $0{,}17\times10^{-3}$ % (36).

При получении личинок инсектарной популяции *Aedes aegypti* (популяция культивируется во ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии около 40 лет) имаго содержали при 28 °С и влажности 70-75 % с учетом периодичности дня и ночи. Яйца, отложенные имаго на влажные диски из фильтровальной бумаги, помещали в стеклянные кристаллизаторы и заливали отстойной водопроводной водой комнатной температуры. В качестве корма для личинок вносили 0,5-1,0 мл 5 % стерильного белково-витаминного концентрата (БВК, «Киришский биохимический завод», Россия) и оставляли в термостате при 28 °С. Личинок (начало IV возраста) отбирали по мере развития и помещали в опытную бактериальную суспензию. Суспензию готовили на водопроводной воде (разведения 1:200000, 1:400000, 1:800000 и 1:1600000, что соответствовало условному содержанию бактерий $0{,}5\times10^{-3}$; $0{,}25\times10^{-3}$; $0{,}125\times10^{-3}$ и $0{,}0625\times10^{-3}$ %, или 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 мкл/л). В чашку Петри наливали по 50 мл соответствующего разведения и помещали по 25 личинок комаров (повторность 4-кратная). Чашки оставляли в термостате при 28-30 °С и через 24 ч учитывали гибель личинок. Смертность для каждой концентрации с поправкой на гибель личинок в контроле вычисляли по формуле:

$$X = (M_о - M_к) : (100 - M_к) \times 100\ \%,$$

где $M_о$ и $M_к$ — средние арифметические числа мертвых особей соответственно в опыте и контроле. На основании полученных данных рассчитывали $ЛК_{50}$, выраженную в процентах гибели личинок по формуле:

$$\lg ЛК_{50} = \lg C_м - \sigma(\sum X_2 - 0{,}5),$$

где $C_м$ — максимальная концентрация из испытанных; σ — логарифм кратности разведений (отношение каждого предыдущего разведения к последующему); $\sum X_2$ — сумма отношений числа погибших насекомых к общему числу подвергшихся воздействию для соответствующего разведения (37).

Полевые испытания эффективности препарата против кровососущих комаров родов *Aedes* и *Anopheles* проводили в водоемах на территории

парков-заповедников г. Санкт-Петербурга (Пушкинский и Павловский парки) в местах массового выплода, против *Culex pipiens* Linnaeus f. *molestus* Forskel — в сырых цокольных помещениях в Ленинградской области, против рисового комарика *Cricotopus sylvestris* Fabr. — на рисовых полях (рисовые чеки) в Краснодарском крае. Норма расхода препарата против *Culex pipiens molestus*, родов *Aedes*, *Anopheles maculipennis* Meigen и *Cricotopus sylvestris* — соответственно 0,25; 0,35; 0,50 и 0,30 мл/м^2. Для полевых тестов выбирали заселенные личинками комаров водоемы, замеряли их площадь, учитывали число личинок (в пересчете на 1 м^2 водной поверхности) до обработки, проводили обработку ручным опрыскивателем с учетом дозы расхода препарата. Контролем служил необработанный заселенный личинками водоем. Эффективность препарата (Э) учитывали на 3-и сут после обработки по формуле:

$$Э = (K_1 - K_2) \cdot K_1^{-1} \times 100\ \%,$$

где K_1 и K_2 — количество личинок соответственно до и после обработки.

Для изучения влияния препарата на рост вешенки (*Pleurotus ostreatus*) и шампиньона (*Agaricus campestris*) мицелий грибов на зерне пшеницы замачивали в бактериальной суспензии с концентрацией 5, 10, 20 % (контроль — в питательной дрожже-полисахаридной среде) на 2 ч. После замачивания по одной зерновке помещали в центр чашки Петри с питательной средой (2 % сусло-агар) и переносили в термостат (25 °С, влажность 85 %; биологическая повторность 4-кратная). На 7-е сут измеряли диаметр колоний мицелия гриба. В шампиньоннице испытывали препарат и химический инсектицид — ингибитор синтеза хитина Димилин® СП (Dimilin®, 250 г/кг дифлубензурона, «Arysta LifeScience S.A.S.», Австрия) против шампиньонного комарика (*Lycoriidae fucorum* Frey) в дозах соответственно 200 мл и 3 г/м^2 при раздельном применении (38) и 50 мл и 0,375 г/м^2 — при совместном. На участке площадью 5 м^2 учитывали личинки до обработки (среднее число личинок на одну пробу субстрата массой 5 г; из расчета 5 проб на 1 м^2). Первую обработку проводили опрыскиванием через 3 сут после нанесения покровной смеси с учетом технологии культивирования шампиньона (0,5 л рабочей суспензии на 1 м^2), вторую — через 2 нед после первой. Эффективность препарата (Э) оценивали по формуле:

$$Э = [1 - (a \times b)/(c \times d)] \times 100\ \%,$$

где a — среднее арифметическое число живых особей в опыте после обработки, b — среднее арифметическое число живых особей в контроле до обработки в опыте, c — среднее арифметическое число живых особей в опыте до обработки, d — среднее арифметическое число живых особей в контроле после обработки в опыте.

Полученные данные обрабатывали с использованием стандартного метода дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 % (39). Рассчитывали средние (*M*) и стандартные ошибки средних (±SEM). Статистическую значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента при доверительном интервале 95 % ($p < 0,05$).

Результаты. На основании классического подхода, предложенного H. De Barjac и A. Bonnefoi, мы охарактеризовали штамм $BtH_{14}7$-1/23A (32) как *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Для подтверждения систематического положения исследуемого штамма был получен ПЦР-продукт гена *gyrB* и выполнено его секвенирование с использованием соответствующих прайме-

ров (табл. 1).

1. Праймеры, использованные при изучении геномных характеристик штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23A

Название праймера	Ген	Олигонуклеотидная последовательность (5′→3′)	Размер ПЦР-продукта, п.н	Температура отжига, °C	Время элонгации, с	Ссылка
GyrB	*gyrB*	CTTGAAGGACTAGARGCAGT (f) CCTTCACGAACATCYTCAC(r)	1500	55	90	(40)
Cry11	*cry11*	TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC(f) CATTTGTACTTGAAGTTGTAATCCC (r)	305	45	50	(41)
Cry4	*cry4*	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC(f) ACCTGGAACATCTGACAACCAATC (r)	439	62	60	(42) (43)

Как ранее отмечалось, анализ нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S РНК, применяемый для разделения большинства видов бактерий, не позволяет различить подвиды *B. thuringiensis* ввиду консервативности этого гена (43). В то же время анализ последовательности гена *gyrB* при помощи программы BLAST показал полную идентичность последовательности гена *gyrB* штамма 7-1/23A и последовательности одноименного гена у референсного штамма *B. thuringiensis* var. *israelensis* AM65-52 из базы GenBank NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/, accession number CP013275.1) и выявил существенные различия с последовательностью соответствующего фрагмента гена *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (accession number CP004123.1), выбранного в качестве отрицательного контроля (рис. 1). Таким образом, было установлено, что изучаемый штамм действительно представляет собой *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

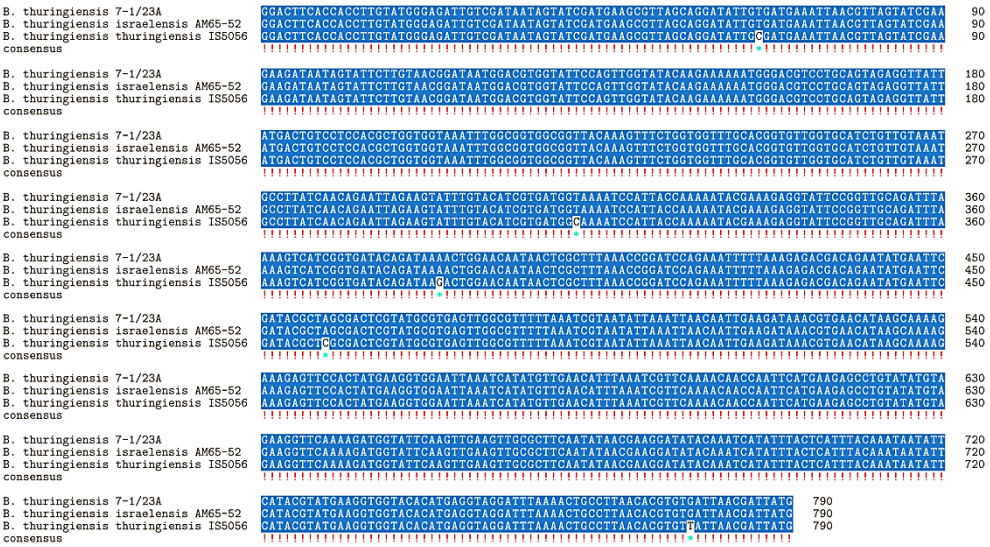

Рис. 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23A и референсных штаммов AM65-52 *B. thuringiensis* var. *israelensis* и IS5056 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*. Синим отмечены позиции, полностью совпадающие у всех трех штаммов, белым — однонуклеотидные замены.

Для геномной ДНК штамма *B. thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23A был получен положительный результат амплификации с праймерами Cry 4 и Cry 11. Амплификация ДНК штамма 56, относящегося к *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* (отрицательный контроль), как и ожидалось, не дала положительного результата с этими праймерами (рис. 2).

Эти результаты подтверждают наличие генов *cry4* и *cry11*, кодиру-

ющих белковые инсектицидные токсины, у штамма 7-1/23А. По данным литературным, оба токсина относятся к основным токсинам Bt, специфичным в отношении двукрылых насекомых. При этом токсин Cry4 высокотоксичен для личинок комаров *Anopheles* и *Aedes* (в меньшей степени активен против личинок *Culex*), а Cry11 проявляет высокую эффективность в отношении *Aedes* и *Culex* и низкую — против *Anopheles* (44). Таким образом, состав токсинов, выявленный нами у штамма 7-1/23А, обеспечивает его действие в отношении трех ключевых родов комаров — переносчиков опасных трансмиссивных заболеваний (*Anopheles*, *Aedes* и *Culex*).

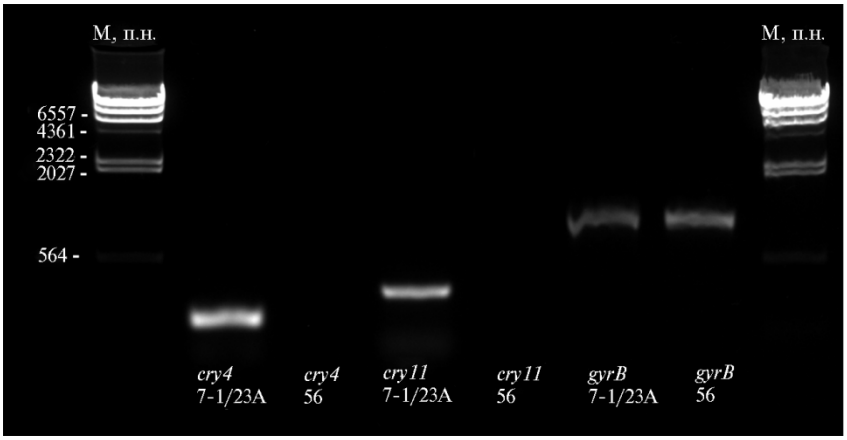

Рис. 2. Гель-электрофорез ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации с праймерами к генам *cry4*, *cry11* и *gyrB*, для штаммов *Bacillus thuringiensis* 7-1/23А и 56. М — маркер молекулярных масс λ ДНК/HindIII («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Указаны названия генов (в соответствии с использованными праймерами), номера штаммов и масса контрольных фрагментов ДНК.

2. Культурально-морфологические признаки штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А

Признак	Описание
Окрашивание по Граму	Грамположительные
Форма и размер вегетативных клеток	Ровные или слегка извилистые палочки размером 2,9-3,8×0,9-1,1 мкм
Подвижность	Перитрихиальное жгутикование
Соединение клеток	Цепочки (короткие, длинные)
Образование спор	Субтерминальное
Форма и размер спор	Эллиптические, диаметр 0,9-1.1 мкм
Форма и размер кристаллического белкового эндотоксина	Неправильная, от 0,4-0,5 до 1,2-1,4 мкм
Характеристика колоний:	
диаметр	0,8-1,2 см
поверхность	мелко шероховатая
профиль	плоские
оптические свойства	матовые
окраска	серовато-белые
окраска субстрата	не изменяется
край	волнистый
структура	мелкозернистая
консистенция	вязкая

Анализ культурально-морфологических признаков штамма 7-1/23А (табл. 2) показал, что по комплексу признаков этот штамм сходен с референсным штаммом АМ65-52 *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Через 48 ч культивирования на РА при 30 °С штамм *B. thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А формировал крупные колония неправильной формы, а на 5-е сут наблюдалось образование спор и кристаллического эндотоксина (рис. 3). Продуктивность штамма BtH_{14}: 7-1/23А на дрожже-полисахаридной ре-

гламентной среде составила $4{,}25\times10^9$ КОЕ/мл.

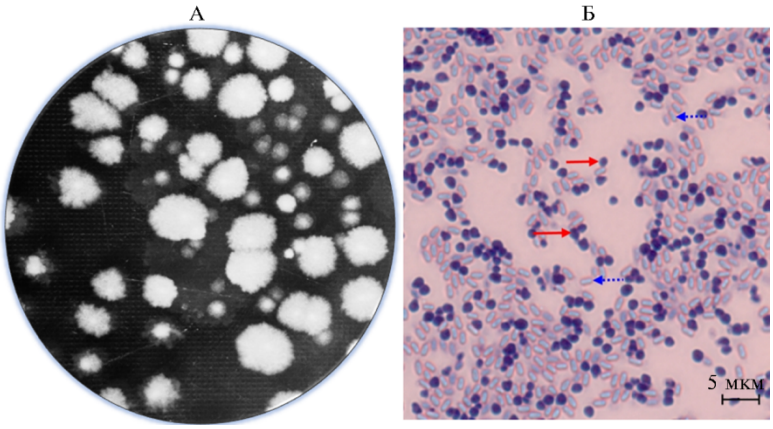

Рис. 3. Рост колоний через 48 ч (А) **и образование спор и кристаллического эндотоксина на 5-е сут роста** (Б) **штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А на рыбном агаре.** Окрашивание анилиновым черным («Lucar», Россия); микроскоп Zeiss Axio Imager A2 («Carl Zeiss», Германия, увеличение ×2000); синими стрелками отмечены споры, красными — кристаллы.

В лабораторных опытах была установлена высокая активность биопрепарата на основе штамма BtH_{14} 7-1/23А в отношении личинок комаров естественных популяций разных видов рода *Aedes*, *Anopheles maculipennis* и *Culex pipiens molestus* (табл. 3). Эти данные лабораторных биотестов согласуются с результатами выявления токсинного состава штамма при помощи ПЦР-анализа. Наиболее восприимчивыми оказались личинки представителей рода *Aedes* и *Culex pipiens molestus.* Активность препарата, выраженная в $ЛК_{50}$, для L_4 комаров рода *Aedes* и *Culex pipiens molestus* составляла соответственно $(0{,}12\pm0{,}015)\times10^{-3}$ и $(0{,}11\pm0{,}015)\times10^{-3}$ %, для *Anopheles maculipennis* — $(0{,}29\pm0{,}01)\times10^{-3}$, тем самым уступая первым двум в 2,4-2,6 раза (различия статистически значимы при $p < 0{,}05$). Ту же закономерность показал препарат на основе штамма BtH_{14} 33 (взят за эталон), но его активность была в 1,27-1,40 раза ниже, чем у препарата на основе BtH_{14} 7-1/23А.

3. Ларвицидная активность жидких препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* для кровососущих комаров природной популяции ($M\pm$SEM, лабораторный опыт, $n = 4$)

Вид комаров	$ЛК_{50}$ для личинок комаров, $\times10^{-3}$ %			
	II возраст		IV возраст	
	BtH_{14} 7-1/23А	BtH_{14} 33 (эталон)	BtH_{14} 7-1/23А	BtH_{14} 33 (эталон)
Род *Aedes*	0,078±0,010	0,096±0,015	0,120±0,015	0,180±0,015
Culex pipiens Linnaeus				
f. *molestus* Forskel	0,062±0,015	0,084±0,020	0,110±0,015	0,140±0,015
Anopheles maculipennis Meigen	0,180±0,020	0,250±0,020	0,290±0,010	0,400±0,020

Примечание. Природная популяция рода *Aedes* включала виды *A. communis*, *A. dorsalis*, *A. punctor*, *A. flavescens*, *A. caspius*. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %. $ЛК_{50}$ для L_4 *Anopheles maculipennis* в 2,4-2,6 раза уступала $ЛК_{50}$ для L_4 комаров рода *Aedes* и *Culex pipiens molestus* (различия статистически значимы при $p < 0{,}05$).

Чувствительность комаров к BtH_{14} демонстрирует высокую видоспецифичность, которая, по всей видимости, связана с особенностями состава комплекса токсинов у различных штаммов этой бактерии. Так, исследуемый нами препарат на основе штамма BtH_{14} 7-1/23А был высокоэффективен против кровососущих комаров родов *Aedes*, *Anopheles* и *Culex* (90,2-100 % гибели). Чувствительность названных родов насекомых, по

данным литературы, определяется наличием у штаммов основных инсектицидных токсинов Cry4, Cry11 и Cyt и Cry10 (44). Выполненный нами ПЦР-анализ (см. рис. 1) выявил у BtH_{14} 7-1/23А наличие генов *cry4* и *cry11*, которые отвечают за продукцию одноименных токсинов, определяющих спектр энтомоцидного действия и эффективность в отношении личиночных стадий двукрылых насекомых.

По данным Н.В. Кандыбина с соавт. (2), у бактокулицида (препарат на основе *B. thuringiensis* var. *israelensis*) $ЛК_{50}$ для L_4 в отношении *Aedes cantans* и *A. vexans* — 0,035 мг/л, *Anopheles messeae* — 1,05 мг/л (более чем 3-крантное превышение). Бактокулицид в дозе 0,02 г/м^2 водной поверхности вызывал 59 и 80 % гибели у личинок соответственно *Anopheles culicifaciens* и *A. stephensi* через 48 ч и 99 % гибели личинок *Culex quinquefasciatus* уже через 24 ч (2). В жидкой форме бактокулицид в дозах 0,25; 0,40 и 0,50-0,75 мл/м^2 вызывал 90-96 % гибели личинок соответственно у *Culex pipiens molestus*, *Aedes communis* и *Anopheles maculipennis* (45). Под действием препарата на основе BtH_{14} в концентрации 1 мг/л погибли 72 % личинок III возраста *Anopheles maculipennis* крымской популяции. Отметим, что по активности этот препарат в 1,7 раза уступал препарату на основе штамма BtH_{14} 7-1/23А, у которого $ЛК_{50}$ для L_4 *Anopheles maculipennis* $0{,}29\times10^{-3}$ % (46).

4. Эффективность жидкого препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А против кровососущих комаров и рисового комарика (2013-2015 годы, полевые опыты, $n = 3$)

Род, вид	Место испытаний	Биологическая эффективность, %
Aedes	Аедогенные водоемы (г. Санкт-Петербург)	92,8-100
Anopheles maculipennis Meigen	Анофелогенные водоемы (г. Санкт-Петербург)	94,8-98,4
Culex pipiens Linnaeus f. *molestus* Forskel	Сырые цокольные помещения (Ленинградская обл.)	90,2-100
Cricotopus sylvestris Fabr.	Рисовые чеки (Краснодарский край)	94,9-97,8

Примечание. Для каждого вида комаров в местах проведения испытаний в качестве отрицательного контроля использовали участки, не обработанные препаратом.

Полевые испытания биопрепарата показали (табл. 4), что его эффективность в водоемах против комаров родов *Aedes* и *Anopheles*, *Culex pipiens molestus* и рисового комарика *Cricotopus sylvestris* составила 90,2-100 %.

Особого внимания заслуживает полифункциональность инсектицидных биопрепаратов на основе штаммов *B. thuringiensis*. Сообщалось, что культуры штаммов *B. thuringiensis* стимулируют развитие надземной части растений салата на 24,5 %, корней — на 7,2 % и увеличение массы растений на 84,8 % (47). Подобный эффект присущ и некоторым другим микроорганизмам: благоприятно влияют на развитие растений эндофитные бактерии рода *Pseudomonas* (48), описано усиление роста и вегетативного размножения земляники под влиянием штаммов *B. subtilis* (49). Бактерии *B. thuringiensis* также способны действовать на различные группы грибов. Ранее мы выявили фунгистатическую активности BtH_{10}, BtH_1 и BtH_{14} на модели гриба *Botrytis cinerea* (50) и показали, что для разных серотипов она неодинакова (у BtH_{14} ингибирование *B. cinerea* ниже, чем у BtH_{10} и BtH_1).

В настоящей работе, анализируя перспективы расширения сферы применения биопрепарата на основе штамма 7-1/23А, мы в лабораторных опытах изучили его влияние на рост мицелия у съедобных грибов — вешенки и шампиньона (табл. 5). Показано, что препарат на основе BtH_{14} 7-

1/23А в концентрации 5 % не только не подавлял, но, наоборот, усиливал их развитие — соответственно на 28,2 и 32,5 % ($p < 0,05$).

5. Влияние жидкого препарата на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А на развитие мицелия вешенки и шампиньона ($M \pm$SEM, лабораторный опыт, $n = 4$)

Концентрация препарата, %	Рост колоний гриба на 7-е сут			
	диаметр, см	к контролю, %	диаметр, см	к контролю, %
5,0	5,30±0,25	132,5	4,50±0,25	128,2
10,0	5,00±0,50	125,0	4,20±0,20	119,7
20,0	4,70±0,25	117,5	–	–
Контроль (дрожже-полисахаридная среда)	4,00±0,35		3,51±0,35	

Примечание. Прочерки означают отсутствие данных. Результаты обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %. Все различия с контролем статистически значимы при $p < 0,05$.

Важное значение имеет то обстоятельство, что применение биоинсектицидов в сочетании с химическими пестицидами позволяет снижать экологическую нагрузку каждого из препаратов. Мы сравнили эффективность препарата на основе штамма BtH_{14} 7-1/23А и химического ингибитора синтеза хитина (Димилин® СП) против шампиньонного комарика *Lycoriella fucorum* при использовании раздельно и совместно. Биологическая эффективность при совместном применении препаратов в уменьшенных в 4-8 раз дозах была не ниже, чем у химического препарата (97,2 % гибели личинок *Lycoriella fucorum*) при прибавке урожая 38,6 %. Наблюдаемый высокий защитный эффект обусловлен синергетическим действием препаратов (51-53). То, что сочетание биологических и химических средств защиты уменьшает нормы их расхода и, как следствие, снижает затраты, делает их совместное применение в бинарной форме оправданным не только экологически, но и экономически. Способность предлагаемого препарата на основе штамма BtH_{14} 7-1/23А не только подавлять развитие личинок двукрылых — вредителей сельскохозяйственных культур, но и благоприятно влиять на рост и развитие растений в сочетании со снижением пестицидной нагрузки при их выращивании может быть востребована на сеяных кормовых угодьях.

Представленные нами результаты в совокупности позволяют рассматривать штамм BtH_{14} 7-1/23А в качестве перспективного продуцента ларвицидного биопрепарата с полифункциональными свойствами. Необходимо отметить, что в мировой практике применение препаратов на основе *B. thuringiensis* var. *israelensis* для защиты от разнообразных кровососущих двукрылых постоянно возрастает именно благодаря высокой эффективности, специфичности и безопасности для многих хозяйственно ценных организмов (54-56). То же подтверждают данные, полученные в настоящем исследовании.

Таким образом, препарат, полученный нами на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23А, обладает высокой ларвицидной активностью (90,2-100 %) против кровососущих комаров — переносчиков опасных трансмиссивных инфекций человека и животных и перспективен для санитарной экологии и ветеринарии. Он также может использоваться в защите посевов риса от рисового комарика *Cricotopus sylvestris* Fabr. и промышленных культур грибов от *Lycoriella fucorum* Frey (эффективность более 90 %). При этом штамм благоприятно влияет на рост мицелия вешенки и шампиньона. Следовательно, целесообразно изучить возможности применения биопрепарата на основе этого штамма против насекомых —

вредителей кормовых культур. Совместное применение разработанного биопрепарата с химическим пестицидом экономически оправдано за счет снижения норм расхода препаратов и прибавки урожая.

[1]ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: ermolovavalya1940@mail.ru, svetagrishechkina@mail.ru,
k.antonets@arriam.ru, m.belousova@arriam.ru, vyahno@yandex.ru,
a.nizhnikov@arriam.ru ✉;
[2]АО Станция профилактической дезинфекции,
191119 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черняховского, 47,
лит. Б, пом. 4-Н,
e-mail: a.m.rachman@yandex.ru

Поступила в редакцию 2 августа 2019 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2019, V. 54, № 6, pp. 1267-1280

INSECTICIDAL PROPERTIES of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. I. THE ACTIVITY SPECTRUM OF A LARVICIDAL PREPARATION BASED ON INDUSTRIAL STRAIN 7-1/23A

V.P. Ermolova[1], S.D. Grishechkina[1], A.M. Rakhman[2], K.S. Antonets[1], M.E. Belousova[1], V.V. Yakhno[1], A.A. Nizhnikov[1]

[1]All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail svetagrishechkina@mail.ru, ermolovavalya1940@mail.ru, k.antonets@arriam.ru, m.belousova@arriam.ru, vyahno@yandex.ru, ant.nizhnicov@gmail.com (✉ corresponding author);
[2]AD Station of preventive disinfection, 47 B, 4-N, ul. Chernyakhovskogo, St. Petersburg, 191119 Russia, e-mail a.m.rachman@yandex.ru
ORCID:
Ermolova V.P. orcid.org/0000-0002-9473-8334
Grishechkina S.D. orcid.org/0000-0002-4877-705X
Rahman A.M. orcid.org/0000-0002-6228-7276
Antonets K.S. orcid.org/0000-0002-8575-2601
Belousova M.V. orcid.org/0000-0002-2886-026X
Yakhno V.V. orcid.org/0000-0001-7953-3405
Nizhnikov A.A. orcid.org/0000-0002-8338-3494

The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
The work was carried out on the equipment of the ARRIAM Center for Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology.
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 August 2, 2019 doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1267eng

Abstract

Blood-sucking mosquitoes and blackflies belonging to the order *Diptera* cause sanitary-epidemiological and veterinary-epizootological damages in humans and animals and serve as the carriers of various dangerous transmissible diseases. The productivity and milk yield of livestock as well as egg production in poultry birds are significantly affected by harmful *Diptera* species. The problem of bioprotection from harmful insects is extremely relevant in crop production, including the cultivation of seeded fodder crops. Currently, the spore-forming bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) represents the most common agent for biological control of the number of insect species and is considered as the basis for the production of insecticides. Biological preparations are of particular importance due to their significant advantages over chemical pesticides and are considered in modern agricultural systems as environmentally and socially beneficial alternatives to agrochemicals. A liquid form of larvicidal preparation against blood-sucking and herbivorous mosquitoes based on the original strain *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 7-1/23A was developed at the ARRIAM. Under registration number RCAM 00626 (RF patent 2539732 dated 12/09/2014), the strain was deposited in the ARRIAM Collection of beneficial agricultural microorganisms (RCAM). The composition of the liquid form of the biopreparation includes a spore-crystalline complex, 5 % sodium chloride, 2 % coniferous extract (as a preservative and perfume, respectively), and the remains of a nutrient medium. The titer was 4.25×10^9 CFU/ml. Larvicidal activity expressed in LC_{50} for *Aedes aegypti* IV instar larvae was 0.11×10^{-3} % (biotest proposed by the World Health Organization). The strain was previously isolated from an anophelogenic reservoir in the Leningrad region, studied for physiological and cultural features, and characterized according to H. De Barjac's and A. Bonnefoi's classifica-

tion. In this work, for the first time, a comprehensive analysis of a larvicidal preparation based on BtH_{14} 7-1/23A was performed, including the molecular characterization of the strain, determination of its larvicidal activity against a number of harmful dipterans, and an assessment of its effects on the growth and development of non-target objects (oyster mushroom mycelium and champignon). Sequencing of the gene encoding B subunit of the DNA gyrase (GyrB) confirmed that the isolated strain belongs to *B. thuringiensis* var. *israelensis*. The presence of the *cry4* and *cry11* genes encoding protein insecticidal toxins was detected by PCR analysis. We also studied the spectrum of action of the larvicidal biopreparation against the blood-sucking mosquitoes of the genera *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, and harmful herbivorous dipterans: rice (*Cricotopus sylvestris* Fabr.) and mushroom (*Lycoriella fucorum* Frey) flies. The analysis was carried out in laboratory and field conditions (2014-2016, Leningrad and Moscow regions, Krasnodar Territory, aedogenic, anofelogenic ponds, raw basement rooms, rice checks) and also included an assessment of the effect of the preparation on the growth of mycelium of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and champignon (*Agaricus campestris*) as bio-eco indicators. LC_{50} values in laboratory tests were 0.11×10^{-3} and 0.12×10^{-3} % for *Culex* and *Aedes*, respectively, and 0.29×10^{-3} % for *Anopheles maculipennis* Meigen. Field tests in water reservoirs against malarial (*Anopheles maculipennis*) and non-malarial mosquitoes of the genus *Aedes* — *communis*, *dorsalis*, *punctor*, *caspius*, and *flavescens*; in moist basement rooms (*Culex pipiens* Linnaeus f. *molestus* Forskel), rice fields (*Cricotopus sylvestris* Fabr.) showed 90.2-100 % mortality of larvae. The effect of the biological preparation on the growth of mycelium of oyster mushrooms and champignon was studied in three concentrations (5, 10, and 20 %). The most efficient was 5 % concentration which stimulated the growth of fungal mycelium by 28.2-32.5 %. The analysis of the separate and combined applications of the 7-1/23A-based biopreparation and the chemical insecticide, chitin synthesis inhibitor Dimilin («Arysta LifeScience S.A.S.», France) against the larvae of the mushroom fly of the family *Lycoriidae* (*L. fucorum* Frey) demonstrated that combined use of these insecticides in 4-8 times reduced dozes caused death of 97.2 % larvae and led to an increase in the yield by 38.6 %. Thus, a preparation based on the BtH_{14} 7-1/23A is promising for sanitary ecology and veterinary. In addition, it is advisable to study the possibilities of its use against insect pests of seeded forage crops.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH_{14}), titer, larvicidal activity, growth-promoting activity, biological preparation.

REFERENCES

1. Akbaev M.Sh., Vodyanov A.N., Kosminkov N.E., Yatusevich A.I., Pashkin P.I., Vasilevich F.I. *Parazitologiya i invazionnye bolezni zhivotnykh* [Parasitology and invasive animal diseases]. Moscow, 2000 (in Russ.).
2. Kandybin N.V., Patyka T.I, Ermolova V.P., Patyka I.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominanta Bacillus thuringiensis* [Insect microbiocontrol and its dominant *Bacillus thuringiensis*]. St. Petersburg—Pushkin, 2009 (in Russ.).
3. Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L., Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(7): 653-665 (doi: 10.1016/j.ibmb).
4. Lacey L.A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2007, 23(sp2): 133-163 (doi: 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO).
5. Boisvert M., Boisvert J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*, 2000, 10(5): 517-561 (doi: 10.1080/095831500750016361)
6. Bravo A., Gill S.S., Soberyn M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 2007, 49(4), 423-435 (doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022).
7. 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 delta-endotoxin Cry1Ac. *Current Microbiology*, 2004, 48(1): 47-50 (doi: 10.1007/s00284-003-4102-9).
8. Kim Y.T., Huang H.T. The β-exotoxins of *Bacillus thuringiensis*. I. Isolation and characterization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1970, 15(1): 100-108 (doi: 10.1016/0022-2011(70)90103-5).
9. 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. *Annals of Microbiology*, 2007, 57(4): 481-494 (doi: 10.1007/BF03175344).
10. 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.
11. Malovichko Y.V., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-

pathogen interactions. *Toxins*, 2019, 11(6): e11060347 (doi: 10.3390/toxins11060347).
12. 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).
13. 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).
14. 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.
15. Das J., Dangar T.K. Diversity of *Bacillus thuringiensis* in the rice field soils of different ecologies in India. *Indian J. Microbiol.*, 2007, 47(4): 364-368 (doi: 10.1007/s12088-007-0065-z).
16. Ramalakshmi A., Udayasuriyan V. Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolated from Western Ghats of Tamil Nadu state, India. *Current Microbiology*, 2010, 61(1): 13-18 (doi: 10.1007/s00284-009-9569-6).
17. Pane C., Villecco D., Campanile F., Zaccardelli M. Novel strains of *Bacillus* isolated from compost and compost-amended soils as biological control agents against soil-borne phytopathogenic fungi. *Biol. Sci. Technol.,* 2012, 22(12): 1373-1388 (doi: 10.1080/09583157.2012.729143).
18. Akram W., Mahboob A., Javed A.A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against Fusarium wilt. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2013, 3(4): 275-280 (doi: 10.1556/EuJMI.3.2013.4.7).
19. Tao A., Pang F., Huang S., Yu G., Li B., Wang T. Characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wheat plants as biocontrol agents against wheat flagsmut. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 2014, 24(8): 901-924 (doi: 10.1080/09583157.2014.904502).
20. Lacey L.A., Grywaczet D., Shapiro-Ilan D., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 132: 1-41 (doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009).
21. Eswarapriya B., Gopalsamy B., Kameswari B., Meera R., Devi P. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* IBt-15 strain against *Plutella xylostella*. *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 2010, 2(3): 2048-2053.
22. 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).
23. Rakhmanin Yu.A., Novikov S.M., Rumyantsev G.I., Ivanov S.I. *Gigiena i sanitariya*, 2006, 5: 10-13 (in Russ.).
24. 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. *Annals of Microbiology,* 2007, 57(4): 481-494 (doi: 10.1007/BF03175344).
25. Narayanasamy P. *Biological management of diseases of crops. Progress in biological control* (Book 15). Springer, Dordrecht, 2013: 295-429 (doi: 10.1007/978-94-007-6380-7).
26. Patel K.D., Bhanshali F.C., Ingle S.S. Diversity and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from alluvial soils of Mahi river basin, India. *J. Adv. Dev. Res.*, 2011, 2(1): 14-20.
27. Ermolova V.P. *Bacillus thuringiensis* strains from natural sources in the Leningrad region: isolation and identification. *Agricultural Biology* [*Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*], 2016, 51(1): 128-131 (doi: 10.15389/agrobioligy.2016.1.128eng).
28. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberyn M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423-431 (doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006).
29. Jouzani G.S., 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).
30. Al-KHamada A.D. Vydelenie entomopatogenov *Vacillus thuringiensis* (*Bt*) iz regiona Deir Ezzor Sirii i ikh biotestirovanie. *Vestnik zashchity rastenii,* 2009, 4: 54-62.
31. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Romanova T.A., Nizhnikov A.A. Search for natural isolates of *Bacillus thuringiensis* for development of ecologically friendly biologicals. *Agricultural Biology* [*Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*], 2018, 53(5): 1062-1069 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.5.1062eng).
32. de Barjac H., Bonnefoi A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1968, 11: 335-347.
33. Hansen B.M., Hendriksen N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 185-189 (doi: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001).
34. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977, 74(12): 5463-5467 (doi: 10.1073/pnas.74.12.5463).
35. 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.

36. *Kollektsiya shtammov bakterii-simbiontov vrednykh nasekomykh i gryzunov, prigodnykh dlya biokontrolya chislennosti vreditelei sel'skokhozyaistvennykh rastenii* [Collection of bacterial symbionts of harmful insects and rodents suitable for biocontrol of the number of pests of agricultural plants]. St. Petersburg, 2014 (in Russ.).
37. *Metodicheskie ukazaniya po primeneniyu i metodam kontrolya kachestva insektitsidnogo mikrobiologicheskogo sredstva «Baktitsid»* [Guidelines for the use and quality control methods of the insecticidal microbiological agent «Bacticid»]. Moscow, 2001 (in Russ.).
38. Mokrousova E.P., Glazunova I.N., Kandybin N.V., Ermolova V.P. V sbornike: *Problemy entomologii v Rossii* [In: Entomological problems in Russia]. St. Petersburg, 1998, tom 2: 40-41 (in Russ.).
39. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1973 (in Russ.).
40. Punina N.V., Zotov V.S., Parkhomenko A.L. Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and gyrB genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*, 2013, 5(1): 90-100.
41. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Quintero R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 64(12): 4965-4972.
42. Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Margalith Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis. Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12): 4883-4890.
43. Guidi V., Patocchi N., Lüthy P., Tonolla M. Distribution *of Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss Wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3663-3668 (doi: 10.1128/AEM.00132-11).
44. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 2014, 6(4): 1222-1243 (doi: 10.3390/toxins6041222).
45. Rakhman A.I., Ermolova V.P. V knige: *Infektsionnye bolezni* [In: Infectious diseases]. St. Petersburg, 2015: 203-207 (in Russ.).
46. Kandybin N.V., Stus' A.A., Kuznetsova L.N. *Byulleten' VNIISKHM*, 1981, 33: 54-57 (in Russ.).
47. Kryzhko A.V., Kuznetsova L.N. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2017, 4: 51-53 (in Russ.).
48. Chebotar' V.K., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Maslennikova S.N., ZaplatkinA.N., Mal'fanova N.V. Biodiversity of endophytic bacteria as a promising biotechnological resource. *Agricultural Biology* [*Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*], 2015, 50(5): 648-654 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.648eng).
49. Shternshis M.V., Belyaev A.A., Tsvetkova V.P., Shpatova T.V., Lelyak A.A., Bakhvalov S.A. *Biopreparaty na osnove bakterii roda Bacillus dlya upravleniya zdorov'em rastenii* [Bacillus-based biological products for plant health management]. Novosibirsk, 2016 (in Russ.).
50. Smirnov O.V., Grishechkina S.D. Polyfunctional activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [*Agricultural Biology*], 2011, 3: 123-126 (in Russ.).
51. Salama H.S., Foda M.S., Zaki F.N., Moawad S. Potency of combinations of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticides on *Spodoptera littoralis* (*Lepidoptera*: *Noctuidae*). *Journal of Economic Entomology*, 1984, 77(4): 885-890 (doi: 10.1093/jee/77.4.885).
52. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Kovalenko T.K., Antonets K.S., Belousova M.E., Yakhno V.V., Nizhnikov A.A. Polyfunctional properties of the *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* industrial strain 800/15. *Agricultural Biology* [*Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*], 2019, 54(3): 494-504 (doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.494eng).
53. Zhang L., Qiu S., Guan X. Effect of chemical additives on *Bacillus thuringiensis* (*Bacillales: Bacillaceae*) against *Plutella xylostella* (*Lepidoptera*: *Pyralidae*). *Journal of Economic Entomology*, 2013, 106(3): 1075-1080 (doi: 10.1603/ec1228).
54. Tetreau G., Alessi M., Veyrenc S., Périgon S., David J.-Ph., Reynaud S., Després L. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8362-8367 (doi: 10.1128/AEM.02088-12).
55. Derua Y.A., Kweka E.J., Kisinza W.N. Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility. *Parasites Vectors*, 2019, 12: 426 (doi: 10.1186/s13071-019-3683-5).
56. Lacey L.A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association,* 2007, 23(2 Suppl): 133-163 (doi: 10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2).