

**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. Lysenko (1985). Исследования позволили классифицировать выделенные бациллы в качестве *B. thuringiensis* и объединить их в три сероварианта — Н<sub>1</sub> (var. *thuringiensis*, изоляты №№ 12, 20, 40, 41), Н<sub>3аэв</sub> (var. *kurstaki*, изоляты №№ 15, 29, 49) и Н<sub>14</sub> (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 ВtН<sub>1</sub>, ВtН<sub>3аэв</sub> и ВtН<sub>14</sub> варьировали в пределах соответственно 2,42×10<sup>9</sup>-2,78×10<sup>9</sup>; 1,85×10<sup>9</sup>-2,15×10<sup>9</sup> и 2,65×10<sup>9</sup>-3,28×10<sup>9</sup> КОЕ/мл. Изоляты №№ 12, 41 сероварианта ВtН<sub>1</sub> по активности для личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say соответствуют эталонному штамму ВtН<sub>1</sub> с ЛК<sub>50</sub> 0,19 %. Энтомоцидная активность изолятов №№ 15, 29 и 49 сероварианта ВtН<sub>3аэв</sub>, выраженная в ЛК<sub>50</sub> для гусениц 2-го возраста мельничной огневки *Ephestia kuehniella*, составляла соответственно 0,88; 0,82 и 0,92 % при ЛК<sub>50</sub> эталонного штамма ВtН<sub>3аэв</sub> 0,86 %. Изоляты №№ 33, 44 сероварианта ВtН<sub>14</sub> по титру не уступали, а по активности несколько превосходили эталонный штамм. У изолятов №№ 33, 44 значение ЛК<sub>50</sub> для личинок 4-го возраста комаров *Aedes aegypti* составило 0,17×10<sup>-3</sup> и 0,16×10<sup>-3</sup> % при величине 0,18×10<sup>-3</sup> % у эталонного штамма ВtН<sub>14</sub>.

**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. ЛК<sub>50</sub>, 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). ЛК<sub>50</sub> 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. ЛК<sub>50</sub> 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 ЛК<sub>50</sub>, 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;  $\sigma$  — 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 (VtH<sub>1</sub>, VtH<sub>14</sub> и VtH<sub>3a3b</sub>) (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 <sub>1</sub> (эталон)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
29	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
49	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VtH <sub>3a3b</sub> (эталон)	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

14	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
25	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
33	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
38	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
44	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
VtH <sub>14</sub> (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); VtH<sub>1</sub> VtH<sub>3a3b</sub> VtH<sub>14</sub> — сероварианты; «+» и «-» — соответственно проявление или отсутствие проявления признака. Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 %.

К сероварианту *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* VtH<sub>1</sub> 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* VtH<sub>1</sub> в разведении 1:6400.

К сероварианту *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* VtH<sub>3a3b</sub> 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* VtH<sub>14</sub> был представлен изолятами №№ 14, 25, 33, 38, 44. Из источников азота они использовали пептон, мясной бульон, рыбный бульон, дрожжи белковые кормовые, сбраживали глюкозу, мальтозу, левулезу, трегалозу, глицерин, не сбраживали 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* (VtH<sub>14</sub>). Формировали кристаллический эндотоксин неправильной формы, экзотоксин не продуцировали.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствовали о высокой технологичности изолятов VtH<sub>1</sub>. Изоляты № 12 и № 41 по биологической характеристике не уступали эталону VtH<sub>1</sub>.

Результаты оценки продуктивности и ларвицидной активности для личинок комаров изолятов VtH<sub>14</sub> (табл. 3) также указывали на высокую

технологичность и активность изолятов. Особенно следует отметить изоляты № 33 и № 44, которые по титру спор и ЛК<sub>50</sub> для личинок комаров не уступали эталону.

## 2. Биологическая характеристика изолятов *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BtH<sub>1</sub>, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области ( $X \pm x$ )

№ изолята	Титр клеток, $\times 10^9$ /мл	Количество экзотоксина (ЛК <sub>50</sub> для L <sub>2</sub> комнатной мухи <i>Musca domestica</i> ), мкл/г корма	Энтомоцидная активность (ЛК <sub>50</sub> для L <sub>2</sub> 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 <sub>1</sub> (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* BtH<sub>14</sub>, выделенных из природных субстратов в Ленинградской области ( $X \pm x$ )

№ изолята	Титр спор, $\times 10^9$ /мл	ЛК <sub>50</sub> для L <sub>4</sub> 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 <sub>14</sub> (эталон)	3,38±0,14	0,18±0,03

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

Продуктивность изолятов BtH<sub>3a3b</sub> (№№ 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 ЛК<sub>50</sub> 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 BtH<sub>1</sub>, BtH<sub>14</sub>, BtH<sub>3a3b</sub>, 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.

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

## 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. Lysenko (1985) schemes. The investigation made it possible to classify isolates as *B. thuringiensis* of H<sub>1</sub> (var. *thuringiensis*, isolates №№ 12, 20, 40, 41), H<sub>3a3b</sub> (var. *kurstaki*, isolates №№ 15, 29, 49) and H<sub>14</sub> (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 BtH<sub>1</sub>, BtH<sub>3a3b</sub> and BtH<sub>14</sub> serovars the titers varied as  $2.42 \times 10^9$ - $2.78 \times 10^9$ ;  $1.85 \times 10^9$ - $2.15 \times 10^9$  and  $2.65 \times 10^9$ - $3.28 \times 10^9$  CFU/ml, respectively. The activity against *Leptinotarsa decemlineata* Say larvae in isolates №№ 12, 41 of the BtH<sub>1</sub> serovar was the same as in standard strain BtH<sub>1</sub> with LD<sub>50</sub> at 0.19 %. Entomocidal activity of the isolates №№ 15, 29 and 49 of the BtH<sub>3a3b</sub> serovar expressed as LD<sub>50</sub> for *Ephesia kuehniella* of the 2<sup>nd</sup> instar was 0.88; 0.82 and 0.92 %, respectively, while in the standard strain BtH<sub>3a3b</sub> the LD<sub>50</sub> was 0.86 %. In the isolates №№ 33, 44 of the BtH<sub>14</sub> 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 LD<sub>50</sub> for the 4<sup>th</sup> instar *Aedes aegypti* larvae was  $0.17 \times 10^{-3}$  and  $0.16 \times 10^{-3}$  %, respectively, when in standard strain BtH<sub>14</sub> it was  $0.18 \times 10^{-3}$  %. 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.

## REFERENCES

1. Loginova L.G., Khraptsova G.I., Golovina M.G. *Mikrobiologiya*, 1976, 45(6): 1087-1091.
2. Evdokimova G.A., Kislykh E.E., Mozgova N.P. *Biologicheskaya aktivnost' pochv v usloviyakh agrotekhnogennogo zagryazneniya na Krainem Severe* [Soil bioactivity at agro-technogenic pollution in the Far North]. Leningrad, 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/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: 10.15389/agrobiol.2016.1.128eng)

- 10.15517/rbt.v54i1.13981).
10. Patyka V.F., Patyka T.I. *Ekologiya Bacillus thuringiensis* [Ecology of *Bacillus thuringiensis*]. Kiev, 2007.
  11. Al-Khamada A.D. *Vestnik zashchity rastenii*, 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. Kandybin N.V., Patyka T.I., Ermolova V.P., Patyka V.F. *Mikrobiokontrol' chislennosti nasekomykh i ego dominantna Bacillus thuringiensis* [Microbiocontrol of insects, and *Bacillus thuringiensis* as a predominant agent]. St. Petersburg—Pushkin, 2009.
  15. Golovko A.E., Golyshin P.N., Ryabchenko N.F. *Mikrobiologiya*, 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  $\delta$ -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  $\delta$ -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. *Biopreparaty v selskom khozyaistve. Metodologiya i praktika primeneniya mikroorganizmov v rastenievodstve i kormoproizvodstve* [Biologicals in agriculture. Approach and practice for usage of microorganisms in crop and silage production]. Moscow, 2005.
  25. Ermolova V.P., Kandybin N.V. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Biologicheskaya zashchita rastenii — osnova stabilizatsii agroekosistem»* [Proc. Int. Conf. «Biocontrol in plant protection as a base for stable ecosystems». Issue 4]. Krasnodar, 2006, vypusk 4: 255-256.
  26. Kandybin N.V. *Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya mikrobiometoda zashchity rastenii ot vreditel'ei: sostoyanie i perspektivy. Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Biologicheskaya zashchita rastenii — osnova stabilizatsii agroekosistem»* [Proc. Int. Conf. «Biocontrol in plant protection as a base for stable ecosystems». Issue 4]. Krasnodar, 2006, vypusk 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 *Ephesia kuehniella* (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae. *Arch. Microbiol.*, 2014, 196(6): 435-444 (doi: 10.1007/s00203-014-0981-3).
  30. Mel'nikova E.A. V sbornike: *Entomopatogennye bakterii i ikh rol' v zashchite rastenii* [In: Entomopathogenic bacteria and their role on plant protection]. Novosibirsk, 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. De Barjac H., 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. Labinskaya A.S. *Mikrobiologiya s tekhniki mikrobiologicheskikh issledovaniy* [Microbiology and microbiological techniques]. Moscow, 1972: 139-142.
37. *Metodicheskie ukazaniya po primeneniyu i metodam kontrolya kachestva insektitsidnogo mikrobiologicheskogo sredstva «Baktitsid»* [Guidelines for application and control of microbial insecticide Bakticid]. Moscow, 2001.
38. Dospikhov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1973.