

## МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКАЯ СРЕДА ММВt ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ *Bacillus thuringiensis*\*

С.Д. ГРИШЕЧКИНА<sup>1</sup> ✉, Т.К. КОВАЛЕНКО<sup>2</sup>, Т.В. КИРПИЧЕВА<sup>3</sup>,  
К.С. АНТОНЕЦ<sup>1</sup>, А.А. НИЖНИКОВ<sup>1</sup>

Одно из направлений в биологической борьбе с вредными организмами — использование бактерий рода *Bacillus*, в том числе энтомопатогенных штаммов *Bacillus thuringiensis*. Для производства препаратов на основе *B. thuringiensis* разработаны питательные среды, в состав которых входят натуральные органические компоненты. В настоящей работе впервые подобрана и модифицирована оптимальная полусинтетическая среда ММВt, позволяющая улучшить технологический процесс, который обеспечивает получение эффективных и технологичных биопрепаратов на основе различных сероваров *Bacillus thuringiensis*. Цель работы — поиск оптимальных сред для получения эффективных и технологичных в производстве и применении биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis*. Объектами исследования служили культуры *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (VtN<sub>1</sub> 800/15) и *B. thuringiensis* var. *darmsdiensis* 25 (VtN<sub>10</sub> 25). Состав сред для культивирования был следующим: среда ССУ — 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,01 мМ MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0,05 мМ FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,05 мМ ZnCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 13 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мг/л глутамина, 1 г/л гидролизата казеина, 0,4 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л глицерола; среда МВt — 7 г/л гидролизата казеина, 6,8 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,12 г/л MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,0022 г/л MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0,014 г/л ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,02 г/л Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0,18 г/л CaCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; среда LB — 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl; модифицированная полусинтетическая среда ММВt (modified MBt) — 7 г/л гидролизата казеина, 6,8 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,12 г/л MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,0022 г/л MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0,014 г/л ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,02 г/л Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0,18 г/л CaCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (25) + глюкоза (1,0 %) и цитрат Na (2 г/л). Эталонами служили дрожже-полисахаридные среды (ДПС) для VtN<sub>1</sub> и VtN<sub>10</sub>. Штаммы Vt культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, заполненных 40-50 мл среды, на качалке при 220 об/мин и температуре 29 °С в течение 48-72 ч до созревания культуры, сопровождающегося образованием спор и кристаллического эндотоксина. На основе штаммов VtN<sub>1</sub> 800/15 и VtN<sub>10</sub> 25 были получены партии жидких препаратов, эффективность которых оценивали в 2020 и 2021 годах на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сорта Янтарь на Дальнем Востоке (Приморский край, Уссурийский р-н) против *Henoseptachna vigintioctomaculata* Motsch и на картофеле сорта Емеля в Тамбовской области против *Leptinotarsa decemlineata* Say. В опытах использовали жидкие препараты, полученные на ДПС и ММВt. В контроле обработки не проводили, химическим эталоном против колорадского жука служил препарат Борей (АО «Август», Россия; норма расхода 0,1 л/га). Учеты проводили на 5-е, 10-е и 15-е сут после обработки. Нормы применения жидких препаратов против колорадского жука — 20 л/га; против картофельной коровки — 15 и 20 л/га. Биологическую эффективность препаратов рассчитывали по формуле W.S. Abbot. Антифунгальную активность препарата VtN<sub>10</sub> 25, полученного на ММВt и ДПС, определяли методом агаровых блоков *in vitro* в чашках Петри. В контроле использовали среду без добавления препаратов. Тест-культурами служили грибы *Botrytis cinerea* Pers. (штамм С-5) и *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (штамм С-20). Ингибирующую активность рассчитывали по формуле W.S. Abbot. Культивирование штаммов VtN<sub>1</sub> 800/15 и VtN<sub>10</sub> 25 на разных питательных средах показало, что на полусинтетических средах МВt и LB титры КОЕ были в 2 раза ниже, чем на ДПС, а на среде ССУ — в 10 раз ниже. Их активность, определенная по содержанию экзотоксина, также была ниже, но на среде МВt у VtN<sub>1</sub> 800/15 она незначительно уступала ДПС. Поэтому для дальнейших исследований мы выбрали среду МВt, которая в результате проведенных экспериментов по оптимизации состава была модифицирована посредством добавления глюкозы (1,0 %) и цитрата Na (2 г/л). Полученная среда (ММВt) позволила добиться существенного повышения титров, активности и скорости развития культуры по сравнению с исходной МВt. В 2020 году в Тамбовской области эффективность препарата на основе VtN<sub>1</sub> 800/15 против колорадского жука была высокой и на 5-е сут у препарата, полученного на ДПС, составляла 95,3 %, незначительно уступая химическому эталону. У препарата, полученного на ММВt, она была несколько ниже (83,3 %), но защитное действие сохранялось дольше, и на

\* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2021-1055 от «28» сентября 2021 г. о предоставлении гранта в форме субсидии из федерального бюджета на реализацию проекта: «Мобилизация генетических ресурсов микроорганизмов на базе Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) при ФГБНУ ВНИИСХМ с использованием сетевого принципа организации».

15-е сут эффективность составляла 73,7 %. В 2021 году эффективность препарата VtН1 800/15 была ниже, чем в 2020 году. У препарата, наработанного на ММВt, она немногим уступала эффективности препарата, полученного на ДПС, составив на 5-е сут после обработки соответственно 75,3 и 67,7 %. Действие препарата VtН10 25, полученного на ММВt, было слабее, чем в варианте с VtН1 800/15 (47,7 % на 5-е сут). В Приморском крае также была отмечена высокая эффективность жидких препаратов против *H. vigintioctomaculata*. В 2020 году при норме применения препарата VtН1 800/15 15 л/га эффективность в вариантах ДПС и ММВt составляла на 5-е сут соответственно 60,5 и 63,9 %. Аналогичные данные были получены в 2021 году. Ингибирующая активность препарата VtН10 25, полученного на ММВt, на 5-е сут была на 12 % выше, чем у препарата, наработанного на ДПС, и составляла для *B. sorokiniana* 72,3 и 60,8 %, для *B. cinerea* — 78,9 и 67,4 %. На 10-е сут эта тенденция сохранялась, но для препарата, наработанного на ДПС, было отмечено снижение ингибирования роста колоний *B. sorokiniana* и *B. cinerea* соответственно до 57,3 и 44,3 %. Таким образом, препараты на основе *Bacillus thuringiensis*, полученные на среде ММВt, по эффективности в отношении вредителей лишь незначительно уступали препаратам, полученным на ДПС, а в отношении фитопатогенов их эффективность была выше, чем у препаратов с ДПС. Среда ММВt перспективна для агробиотехнологии, поскольку при ее использовании за счет увеличения скорости роста культуры *B. thuringiensis* сокращается время, необходимое для формирования спор и белкового кристаллического эндотоксина. Так, на среде ММВt этот процесс заканчивается через 48 ч, а на среде ДПС через 72 ч, что позволяет уменьшить энергозатраты.

Ключевые слова: биопрепарат, *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, колорадский жук, картофельная коровка, ингибирующая активность, культуральная среда.

Одно из ключевых направлений в агробиотехнологии — создание и применение биопрепаратов для борьбы с вредителями и патогенами растений. Существенную значимость имеют исследования, связанные с поиском оптимальных условий культивирования микроорганизмов, позволяющие повысить эффективность и технологичность соответствующих препаратов.

Значительное внимание уделяется экологически безопасным средствам борьбы с вредными организмами, которые служат альтернативой химическим пестицидам. Одно из главных направлений в биологической борьбе с вредителями — использование микроорганизмов, в первую очередь энтомопатогенных бактерий рода *Bacillus*, которые считаются наиболее перспективными для создания средств борьбы с насекомыми (1). Основу для 90 % биопестицидов, используемых в коммерческих целях для борьбы с вредными насекомыми, составляют бактерии *B. thuringiensis* (2). Они активны, в том числе, против насекомых отрядов *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* и нематод (3, 4). Для биоконтроля наиболее широко используют три патовара: А (var. *thuringiensis*, var. *dendrolimus*, var. *galleria*, var. *kurstaki*) — преимущественно против чешуекрылых, В (var. *israelensis*) — продуцент ларвицидных препаратов, С (var. *tenebrionis*, var. *darmstadiensis*) — против жуков (5). Микробиологические препараты на основе этих бактерий высокотоксичны в отношении определенных групп насекомых, безопасны для человека и минимально воздействуют на окружающую среду (6-9). Благодаря им снижается химическая нагрузка на окружающую среду.

Бактерии *B. thuringiensis* обладают полифункциональными свойствами. Наряду с энтомоцидной активностью у них выявлена антифунгальная активность в отношении ряда фитопатогенов, вызывающих опасные заболевания культурных растений (10-12). Широкий спектр активностей *B. thuringiensis* связан с наличием в их геноме репертуара генов, кодирующих синтез разнообразных белковых токсинов, минорных факторов вирулентности белковой природы, а также обуславливающих синтез разнообразных низкомолекулярных метаболитов (13).

Препараты, активные против жуков, широко используют против наиболее распространенных и опасных вредителей сельскохозяйственных культур, таких как колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) и 28-точечная картофельная коровка (*Henoseplachna vigintioctomaculata* Motsch).

Колорадский жук обитает повсеместно. Он обладает высокой плодовитостью, легко адаптируется к разнообразным условиям и приспосабливается к новым изменениям биотических факторов. Разные стадии жука питаются весь вегетационный период. Потери урожая могут достигать 30-50 % и выше, а при отсутствии мероприятий по борьбе с ним его численность сильно увеличивается и урожай может полностью погибнуть (14).

На Дальнем Востоке, где производится около 5 % картофеля в Российской Федерации, наряду с колорадским жуком значительный вред культуре наносит 28-точечная картофельная коровка (*Henoseplachna vigintioctomaculata* Motsch, 1857) (15). Она может повреждать от 20 до 100 % поверхности листьев, что приводит к значительным потерям урожая (16).

Для производства препаратов на основе *B. thuringiensis* разработаны питательные среды, в состав которых входят кукурузная и соевая мука, крахмал, белково-витаминный концентрат (БВК) и другие натуральные органические компоненты. Некоторые компоненты могут быть дефицитными. Хорошие результаты были получены при использовании в качестве источника азота гороховой, ячменной и овсяной муки (17). Препараты, полученные на этих средах, обладают высокой активностью, но имеют ряд недостатков. Так, при производстве препаратов на этих средах часто происходит вспенивание культуры, в результате чего дорогостоящие фильтры в ферментерах забиваются и требуется их замена. Трудности также возникают при проведении обработок, поскольку рабочие растворы, содержащие органические компоненты среды, забивают форсунки. Кроме того, питательные среды натурального органического состава зависят от качества и происхождения исходного сырья. В связи с этим возник запрос на создание новых сред на основе относительно недорогих и стандартных, преимущественно синтетических, компонентов для оптимизированной среды, обеспечивающей наилучший рост и биосинтез продуктов жизнедеятельности, что в свою очередь позволило бы снизить стоимость производства биопестицидов.

Известно, что в состав питательных сред, содержащих преимущественно синтетические компоненты, входят источники углерода и азота, представляющие собой производные натуральных компонентов, которые способствуют увеличению образования спор и белкового кристаллического эндотоксина, токсичного для насекомых (18, 19). Из источников азота наиболее часто используют дрожжевой экстракт (20) и гидролизат казеина, служащий источником белка (21). В качестве источников углерода преобладают глицерол и глюкоза (22, 23).

В настоящей работе впервые подобрана и модифицирована оптимальная полусинтетическая среда ММВt (Modified MBt), позволяющая улучшить технологический процесс, который обеспечивает получение эффективных и технологичных биопрепаратов на основе различных сероваров *Bacillus thuringiensis*.

Цель работы — поиск оптимальных сред для получения эффективных и технологичных в производстве и применении биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis*.

**Методика.** Объектами исследования служили грамположительные бактерии *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH<sub>1</sub> 800/15) и *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 25 (BtH<sub>10</sub> 25).

Состав сред для культивирования был следующим: среда ССУ — 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,01 мМ MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0,05 мМ FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,05 мМ ZnCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 13 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 мг/л глутамина, 1 г/л гидролизата казеина, 0,4 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л

глицерола (24); среда MBt: 7 г/л гидролизата казеина, 6,8 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 г/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0022 г/л  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,014 г/л  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 г/л  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 0,18 г/л  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (25); среда LB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л  $\text{NaCl}$  (26); модифицированная полусинтетическая среда MMBt (modified MBt): 7 г/л гидролизата казеина, 6,8 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 г/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0022 г/л  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,014 г/л  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 г/л  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 0,18 г/л  $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (25) + глюкоза (0,5; 1,0 или 2,0 %) и цитрат Na (2 г/л). Эталонами служили дрожже-полисахаридные среды (ДПС) для BtH<sub>1</sub> (27) и BtH<sub>10</sub> (28).

Штаммы Bt культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, заполненных 40-50 мл среды, на качалке при 220 об/мин и температуре 29 °С в течение 48-72 ч до полного созревания, образования спор и кристаллического эндотоксина. Число клеток и содержание экзотоксина, выраженный в ЛК<sub>50</sub> для личинок комнатной мухи *Musca domestica* Linn., определяли согласно методике С.Д. Гришечкиной с соавт. (29). Повторность опыта 3-кратная.

На основе штаммов BtH<sub>1</sub> 800/15 и BtH<sub>10</sub> 25 в ферментерах на базе филиала «Экос» ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург—Колпино) были получены партии жидких препаратов. Эффективность препаратов оценивали в 2020 и 2021 годах на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сорта Янтарь на Дальнем Востоке (Приморский край, Уссурийский р-н) против *H. vigintioctomaculata* и на картофеле сорта Емеля в Тамбовской области против *L. decemlineata*. В опытах использовали жидкие препараты, полученные на ДПС и MMBt. Опыты ставили в 4 повторностях на делянках 10 м<sup>2</sup>. В контроле обработки не проводили, химическим эталоном против колорадского жука служил препарат Борей (АО «Август, Россия; норма расхода 0,1 л/га). Учеты проводили на 5-е, 10-е и 15-е сут после обработки. Нормы применения жидких препаратов против колорадского жука — 20 л/га; против картофельной коровки — 15 и 20 л/га. Численность вредителя рассчитывали на одно растение (в опытах — 4 повторности по 10 растений).

Биологическую эффективность (БЭ) препаратов рассчитывали по формуле W.S. Abbot (30):

$$\text{БЭ} = (\text{K} - \text{O})/\text{K} \times 100 \%,$$

где K — численность вредителя до обработки, O — численность вредителя после обработки.

Антифунгальную активность препарата BtH<sub>10</sub> 25, полученного на MMBt и ДПС, определяли методом агаровых блоков *in vitro* в чашках Петри (31). Препараты, полученные на ДПС и MMBt, в концентрации 10 % вносили в расплавленную и охлажденную до 40 °С среду (картофельный агар). На поверхность застывшего агара помещали блоки размером 0,8 см, вырезанные из 7-суточной культуры грибов. В контроле использовали среду без добавления препаратов. Тест-культурами служили грибы: *Botrytis cinerea* Pers. (штамм С-5) и *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (штамм С-20). В каждом варианте было по 4 чашки, биологическая повторность опыта — 4-кратная.

Ингибирующую активность рассчитывали по формуле W.S. Abbot (30):

СИ (степень ингибирования роста колоний гриба) =  $(\text{Дк} - \text{До})/\text{Дк} \times 100 \%$ , где Дк и До — диаметр колонии гриба соответственно в контроле и опыте.

Статистическую значимость различий оценивали посредством двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Рассчитывали средние (*M*), стандартные отклонения ( $\pm\text{SD}$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm\text{SEM}$ ). Данные по эффективности

препаратов против вредителей обрабатывали методом дисперсионного анализа при доверительном интервале 95 % (32).

**Результаты.** Культивирование штаммов VtH<sub>1</sub> 800/15 и VtH<sub>10</sub> 25 на разных питательных средах показало, что на полусинтетических средах MBt и LB титры КОЕ были в 2 раза ниже, чем на ДПС, а на среде ССУ — в 10 раз ниже. Их активность, определенная по содержанию экзотоксина, также оказалась ниже, но на среде MBt у VtH<sub>1</sub> 800/15 незначительно уступала ДПС (табл. 1), поэтому для дальнейших исследований была выбрана среда MBt. По данным К.В. Nikkerson с соавт. (33), добавление в питательную среду глюкозы и цитрата натрия способствует росту микробной массы и образованию кристаллов. В связи с этим мы изучили влияние различных концентраций глюкозы (0,5; 1,0 и 2,0 %) на развитие культур *B. thuringiensis*. Установлено, что при внесении в среду глюкозы в концентрациях 0,5 и 1,0 % развитие культуры заканчивалось через 48 ч, но титры КОЕ при 0,5 % концентрации были ниже, чем при 1,0 %. При внесении 2,0 % глюкозы сдерживалось развитие культуры и процесс споруляции заканчивался через 72 ч. Определив оптимальную концентрацию глюкозы 1,0 %, мы добавили в среду цитрат натрия (2 г/л) как дополнительный источник углерода, что позволило улучшить показатели. Титры на полученной нами среде ММВt повысились у VtH<sub>1</sub> 800/15 до 1,95 КОЕ/мл (на 21,8 %), у VtH<sub>10</sub> 25 до 1,8 КОЕ/мл (на 12 %) (см. табл. 1). Показатели активности также увеличились. На среде ММВt развитие культур ускорялось. При этом процесс споруляции и образования кристаллического белкового эндотоксина заканчивался через 48 ч, тогда как на ДПС — через 72 ч.

**1. Характеристика препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (VtH<sub>1</sub> 800/15) и *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 25 (VtH<sub>10</sub> 25), полученных на разных питательных средах ( $M \pm SD$ )**

Штамм	Среда									
	ДПС		MBt		ММВt		ССУ		LB	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
VtH <sub>1</sub> 800/15	3,35±0,10	2,4±0,2	1,60±0,10	3,0±0,1	1,95±0,20	2,8±0,2	0,38±0,10	6,9±0,1	1,30±0,10	6,3±0,2
VtH <sub>10</sub> 25	3,0±0,2	2,5±0,2	1,5±0,1	4,2±0,1	1,8±0,1	3,4±0,2	0,3±0,1	7,9±0,2	1,1±0,1	6,7±0,2

Примечание. 1 — титр (КОЕ/мл), 2 — активность по ЛК<sub>50</sub> для личинок 2-го возраста *Musca domestica*. Описание состава сред и размеры выборок см. в разделе «Методика».

Ранее при культивировании *B. thuringiensis* на дрожже-полисахаридных средах мы подобрали дозы посевного материала. Было установлено, что дозы от 0,2 до 1,0 % существенно не влияли на продуктивность штамма (17). При культивировании на ММВt дозы посевного материала в том же диапазоне (0,2; 0,5; 0,8; 1,0 %) оказались недостаточными, титры КОЕ были низкими. Испытания увеличенных доз посевного материала (4,0; 6,0; 10,0 %) показали, что на этой среде наилучшие результаты достигались при внесении 10 % посевного материала от объема питательной среды, что согласуется с данными В.В. Бирюкова (34).

Оценка эффективности жидких препаратов, проведенная на картофеле сорта Емеля в Тамбовской области против колорадского жука, показала ее существенную зависимость от численности вредителя, которая, в свою очередь, зависела от погодных условий и составляла в среднем 9 экз/куст в 2020 году и 33 экз/куст в 2021 году.

В 2020 году эффективность препарата VtH<sub>1</sub> 800/15, полученного на ДПС, была высокой и на 5-е сут составляла 95,3 %, практически не уступая химическому эталону — 100 %. Эффективность препарата VtH<sub>1</sub> 800/15, наработанного на ММВt, была несколько ниже — 83,3 %, но защитное дей-

ствии сохранялось дольше. На 15-е сут его эффективность составляла 73,7 %, тогда как при обработке препаратом, полученным на ДПС, и химическим препаратом Борей — соответственно 58,8 и 56,2 %. В 2021 году эффективность препаратов была ниже по сравнению с 2020 годом и на 5-е сут после обработки BtH1800/15 незначительно различалась в вариантах со средой ММВt и ДПС (соответственно 67,7 и 75,3 %). При использовании препарата BtH10 25, полученного на ММВt, эффективность уступала BtH1800/15 и на 5-е сут составляла 47,9 %. Во всех вариантах эффективность снижалась на 15-е сут (табл. 2).

**2. Биологическая эффективность жидких препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH1 800/15) и *B. thuringiensis* var. *darmstadtensis* 25 (BtH10 25), полученных на разных питательных средах, против колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say) на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сорта Емеля ( $N = 4, n = 10$ ; Тамбовская обл., 2020-2021 годы)**

Вариант	Норма расхода, л/га	Средняя численность личинок, экз/растение				Эффективность, % ( $M \pm SD$ )		
		до обработки	после обработки			5-е сут	10-е сут	15-е сут
			5-е сут	10-е сут	15-е сут			
2 0 2 0 год								
BtH1 800/15 (ДПС)	20	8,05	0,38	2,00	3,38	95,3±1,6	74,4±3,1	58,8±4,4
BtH1 800/15 (ММВt)	20	14,80	2,38	4,98	3,85	83,3±5,0	65,4±8,7	73,7±8,7
Химический эталон Борей	0,1	4,70	0,25	0,88	2,05	100	81,4±4,4	56,2±2,9
Контроль НСР05	Без обработки	7,10	3,08	2,52	1,30	7,7	16,0	14,9
2 0 2 1 год								
BtH1800/15 (ДПС)	20	36,30	8,96	14,2	8,97	75,3±6,3	60,7±7,7	47,7±3,6
BtH1 800/15 (ММВt)	20	35,20	11,4	16,2	20,3	67,7±2,1	53,7±5,5	42,5±5,0
BtH10 25 (ММВt)	20	30,45	16,8	18,0	18,5	47,9±3,1	40,8±3,9	39,4±4,9
Химический эталон Борей	0,1	35,10	3,75	6,0	11,3	89,3±5,6	82,8±6,1	69,4±4,9
Контроль НСР05	Без обработки	25,90	29,4	19,5	10,1	12,0	8,9	13,6

Примечание. Использование препаратов на среде ММВt не приводило к засорению форсунок, в отличие от препаратов, полученных на ДПС.

**3. Биологическая эффективность жидких препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH1 800/15) и *B. thuringiensis* var. *darmstadtensis* 25 (BtH10 25), полученных на разных питательных средах, против 28-пятнистой картофельной коровки (*Henoseplachna vigintioctomaculata* Motsch, 1857) на картофеле (*Solanum tuberosum* L.) сорта Янтарь ( $N = 4, n = 10$ ; Приморский край, Уссурийский р-н, 2020-2021 годы)**

Вариант	Норма расхода, л/га	Средняя численность личинок, экз/растение				Эффективность, % ( $M \pm SD$ )		
		до обработки	после обработки			5-е сут	10-е сут	15-е сут
			5-е сут	10-е сут	15-е сут			
2 0 2 0 год								
BtH1 800/15 (ДПС)	15	2,7	1,2	0,6	0,2	60,5±7,0	79,5±5,0	86,4±4,9
BtH1 800/15 (ММВt)	20	3,2	0,9	0,6	0,2	70,5±5,4	84,3±7,1	90,3±3,8
BtH1 800/15 (ММВt)	15	3,0	1,2	0,5	0,4	63,9±6,7	78,5±4,1	76,2±5,6
Контроль НСР05	Без обработки	3,9	4,3	2,8	2,1	9,4	15,5	13,2
2 0 2 1 год								
BtH1 800/15 (ДПС)	15	4,3	1,8	1,0	1,0	76,8±6,4	79,2±4,1	81,0±5,2
BtH1 800/15 (ММВt)	15	5,7	2,3	1,2	1,2	78,5±5,7	80,4±3,6	82,7±6,9
BtH10 25 (ДПС)	15	6,5	3,5	1,5	0,7	72,1±4,9	76,8±5,9	89,6±6,7
BtH1025 (ММВt)	15	9,3	3,0	1,5	1,4	83,0±4,0	86,2±6,0	86,0±5,7
Контроль НСР05	Без обработки	3,9	7,9	5,2	4,9	7,6	9,7	13,0

Высокая эффективность жидких препаратов, наработанных на разных средах, была показана и при обработке посадок картофеля против 28-пятнистой картофельной коровки в Приморском крае. В 2020 году при

норме применения препарата VtH<sub>1</sub> 800/15 15 л/га эффективность в вариантах со средой ДПС и ММВt на 5-е сут составляла соответственно 60,5 и 63,9 %. В варианте с наработкой препарата на ММВt увеличение нормы применения до 20 л/га повышало эффективность до 70,5 %. Аналогичные данные были получены в 2021 году (табл. 3).

В 2021 году наряду с препаратом VtH<sub>1</sub>800/15 изучали эффективность VtH<sub>10</sub>25. На 5-е сут после обработки в варианте с наработкой препарата на среде ММВt показатель был несколько выше, чем в варианте с ДПС, и составлял соответственно 83,0 % по сравнению с 72,1 %. На 15-е сут активность препаратов увеличивалась.

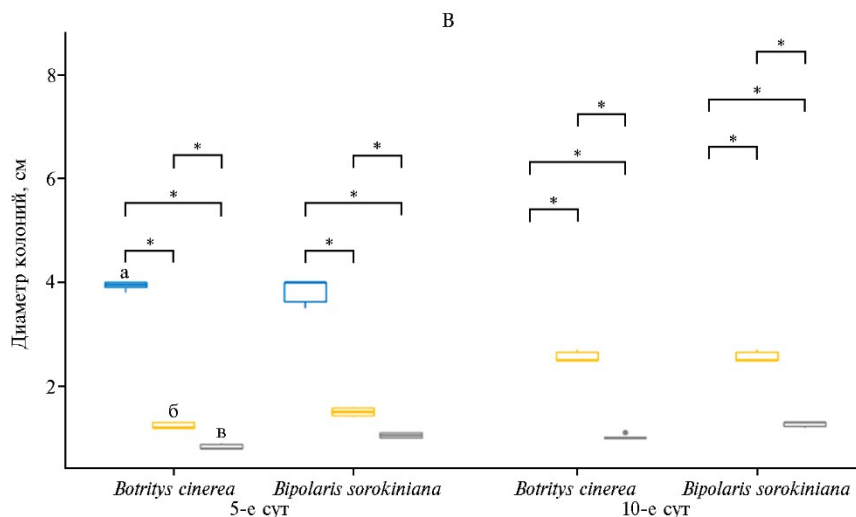
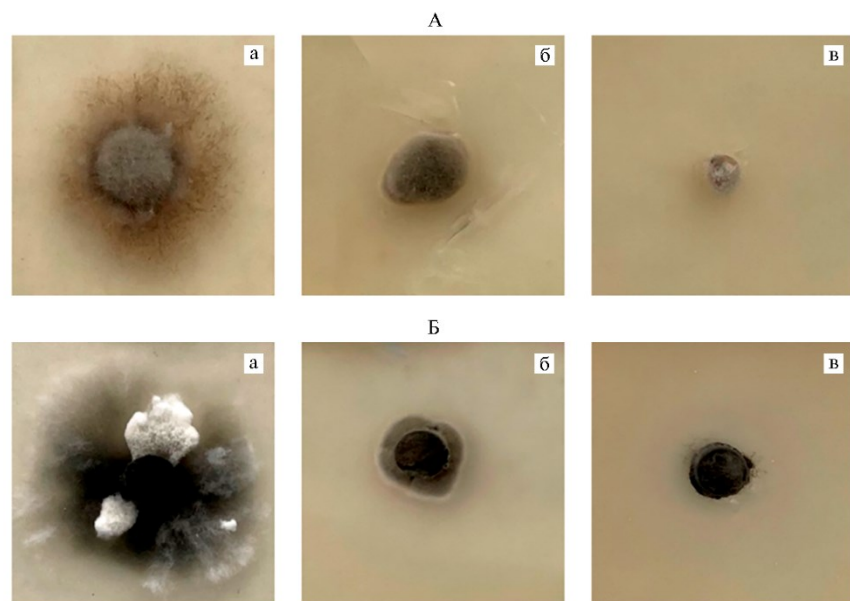
Таким образом, полевые испытания, проведенные на картофеле против колорадского жука и 28-пятнистой картофельной коровки, показали эффективность использования ММВt для производства биопрепаратов.

В опытах *in vitro* на 5-е сут ингибирующая активность жидкого препарата на основе VtH<sub>10</sub> 25, полученного на ММВt, была на 12 % выше, чем у препарата, наработанного на ДПС, и составляла для *B. sorokiniana* соответственно 72,3 и 60,8 %, для *B. cinerea* — 78,9 и 67,4 % (рис.). На 10-е сут такая тенденция сохранялась, и в варианте с ДПС было отмечено снижение ингибирования роста колоний *B. sorokiniana* до 57,3 %, *B. cinerea* — до 44,3 %. При использовании ММВt ингибирующая активность не снижалась. В контроле на 5-е сут были выявлены приблизительно одинаковые темпы роста грибов *B. sorokiniana* и *B. cinerea*, но различия отмечали на 10-е сут.

Необходимо отметить, что статистически значимые ( $p < 0,0001$ ) различия по диаметру колоний *B. sorokiniana* и *B. cinerea* на 5-е и 10-е сут были показаны не только при анализе антифунгального эффекта жидких препаратов, наработанных на ДПС и ММВt, по сравнению с контролем, но и при сравнении эффектов обработки в двух этих вариантах между собой (см. рис., В).

Среда ММВt имела существенные преимущества перед широко используемыми для производства жидких форм препаратов дрожже-полисахаридными средами. Поскольку *Bacillus thuringiensis* — одна из наиболее широко используемых в биотехнологии бактерий (35, 36), оптимизация сред для ее культивирования представляет существенный интерес. Так, в качестве органических компонентов сред используют сложные субстраты мелассу, кукурузный экстракт, кукурузную муку (37), соевую муку и др. (38). Важный фактор производства биопрепаратов — удешевление стоимости сред для культивирования, и соевая мука служит одним из наиболее дешевых компонентов (39). Однако их использование часто приводит к вспениванию культуры при наработке препаратов, что требует замены фильтров, повышая, в конечном итоге, цену производства.

В ряде исследований также показана важность баланса источников углерода и азота в средах для достижения оптимальной эффективности споруляции культуры Vt. Установлено, что увеличение концентрации глюкозы в среде повышает оптическую плотность культуры, в то время как повышение содержания дрожжевого экстракта подавляет споруляцию (40). Другие источники азота могут оказывать как стимулирующие, так и ингибирующие эффекты, в зависимости от фазы роста культуры (41). Более того, недавно опубликовано исследование, в котором провели, по-видимому, наиболее детальный на сегодняшний момент сравнительный анализ влияния баланса источников азота и углерода в среде для культивирования на споруляцию культуры Vt. Было показано, что наиболее эффективное спорообразование происходит при соотношении углерода к азоту в среде, равном 5:1 (42).



**Рост колоний грибов *Botrytis cinerea* Pers. штамм С-5 (А) и *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker штамм С-20 (Б) на 5-е сут и диаметр колоний *B. cinerea* и *B. sorokiniana* (В) на 5-е и 10-е сут выращивания на картофельном агаре после обработки препаратом на основе *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadensis* 25 (ВtН<sub>10</sub> 25): а — контроль (без использования препарата), б — препарат наработан на среде ДПС, в — препарат наработан на среде ММВt (см. описание в разделе «Методика»).**

\* Различия между вариантами статистически значимы при  $p < 0,0001$ .

Примечательно, что при использовании бактерий рода *Bacillus* для продукции ферментов на стадии вегетативной культуры, повышение содержания азота, напротив, может оказывать благоприятный эффект (43). Таким образом, подбор компонентов сред для оптимизации культивирования существенно зависит не только от систематического положения культивируемых микроорганизмов, но и от стадии жизненного цикла (вегетативной или споровой). Традиционно используемые в средах для культивирования Vt автолизаты дрожжей задерживают споруляцию. Кроме того, сложные органические компоненты снижают технологичность получаемых сред.

Итак, разработанная нами модифицированная полусинтетическая среда (ММВt), которая состоит из гидролизата казеина, стандартного набора



солей с дополнительным внесением 1 % глюкозы и 2 г/л цитрата Na в качестве источников углерода, позволила устранить эти недостатки. ММВt подходит для производства жидких препаратов на основе *Bacillus thuringiensis* и имеет преимущества перед дрожже-полисахаридными средами (ДПС). Так, использование среды ММВt может обеспечить получение достаточно эффективных и более удобных для применения биопрепаратов на основе *B. thuringiensis*, поскольку при выращивании на этой среде увеличивается скорость роста культуры, сокращается период формирования спор и белкового кристаллического эндотоксина. Так, на среде ММВt этот процесс заканчивался через 48 ч, а на среде ДПС через 72 ч, что позволяет уменьшить энергозатраты. При проведении полевых испытаний эффективности препаратов, полученных на ММВt, не было отмечено засорения форсунок в обрабатываемом оборудовании, в то время как при обработке препаратами, полученными на ДПС, требуется промывание опрыскивающего оборудования, из-за засоренности частицами органической среды. Опыты на картофеле, проведенные в полевых условиях в Тамбовской области против колорадского жука и на Дальнем Востоке против 28-пятнистой картофельной коровки, подтвердила, что препараты *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 и *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 25, полученные на ММВt, не уступали по эффективности ДПС-препаратам и отличались более длительным инсектицидным эффектом. Применение разработанной среды способствовало усилению активности препарата на основе *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 25 в отношении фитопатогенных грибов. В целом, использование ММВt можно рассматривать как перспективную и более технологичную альтернативу дрожже-полисахаридным средам, позволяющую избежать применения дополнительных органических компонентов, которые в некоторых случаях могут быть нестандартными и сложными для приобретения.

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,  
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: svetagrishechkina@mail.ru ✉, k.antonets@arriam.ru,  
a.nizhnikov@arriam.ru;

Поступила в редакцию  
16 октября 2022 года

<sup>2</sup>ФГБНУ Дальневосточный НИИ защиты растений — филиал ФГБНУ ФНЦ агробиологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки,  
692682 Россия, Приморский край, с. Камень-Рыболов, ул. Мира, 42-а,  
e-mail: biometod@rambler.ru;

<sup>3</sup>Екатерининская опытная станция — филиал ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,  
393023 Россия, Тамбовская обл., Никифоровский р-н, с. Екатерино, Екатериинская опытная станция,  
e-mail: ecosvir@yandex.ru

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, V. 58, № 3, pp. 416-428

## MODIFIED SEMISYNTHETIC MEDIUM MMBt FOR PRODUCTION OF PREPARATIONS BASED ON *Bacillus thuringiensis*

S.D. Grischechkina<sup>1</sup> ✉, T.K. Kovalenko<sup>2</sup>, T.V. Kirpicheva<sup>3</sup>,  
K.S. Antonets<sup>1</sup>, A.A. Nizhnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail svetagrishechkina@mail.ru (✉ corresponding author), k.antonets@arriam.ru, a.nizhnikov@arriam.ru;

<sup>2</sup>Far Eastern Research Institute of Plant Protection — Branch of the Chaika Federal Research Center of Agricultural Biotechnology of the Far East, 42-a, ul. Mira, s. Kamen'-Rybolov, Primorsky Krai, 692682 Russia, e-mail biometod@rambler.ru;

<sup>3</sup>Ekaterrinskaya Experimental Station — Branch of the Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Ekaterininsky experimental station, s. Ekaterino, Nikiforovsky District, Tambov Province, 393023 Russia, e-mail ecosvir@yandex.ru

ORCID:

Grishchekina S.D. [orcid.org/0000-0002-4877-705X](https://orcid.org/0000-0002-4877-705X)

Kovalenko T.K. [orcid.org/0000-0003-1432-4500](https://orcid.org/0000-0003-1432-4500)

Kirpicheva T.V. [orcid.org/0000-0002-9459-507](https://orcid.org/0000-0002-9459-507)

Antonets K.S. [orcid.org/0000-0002-8575-2601](https://orcid.org/0000-0002-8575-2601)

Nizhnikov A.A. [orcid.org/0000-0002-8338-3494](https://orcid.org/0000-0002-8338-3494)

Acknowledgements:

Supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-15-2021-1055 dated September 28, 2021 on providing a grant in the form of subsidies from the Federal budget of the Russian Federation). The grant was provided for the implementation of the project: "Mobilization of the genetic resources of microorganisms on the basis of the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM) at the All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM) according to the network principle of organization".

The authors declare no conflict of interests

Final revision received October 16, 2022

doi: 10.15389/agrobiology.2023.3.416eng

Accepted February 28, 2023

## Abstract

One of the trends in the biological control of pests is the use of bacteria belonging to the genus *Bacillus* and, first of all, entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis*. Of great interest to industrial biotechnology are studies related to the search for optimal cultivation conditions that can improve the manufacturability of the production of microbiological preparations and their effectiveness. Previously, the nutrient media for the production of microbiological preparations based on *B. thuringiensis* which include natural organic components have been developed. Nevertheless, during the production of biopreparations based on this bacterium, the foaming of the culture frequently occurs and expensive filters of bioreactors have to be replaced. Also, during the treatment of plants, working solutions containing organic components of the liquid medium can clog the nozzles. This effect complicates the treatment process. In addition, organic cultural media components are not standard and depend on the quality and source origin. In this regard, it is important to carry out the screening of optimal synthetic media that could eliminate these shortcomings. Our study was aimed at selecting the optimal synthetic media and evaluating the effectiveness of the obtained preparation samples in laboratory and field conditions. The objects of study were the cultures of *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 800/15 (BtH<sub>1</sub> 800/15) and *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 25 (BtH<sub>10</sub> 25). The composition of the culture media was as follows: CCY medium — 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.05 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.05 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 13 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mg/l glutamine, 1 g/l casein hydrolysate, 0.4 g/l yeast extract, 0.6 g/l glycerol; MBt medium: 7 g/l casein hydrolysate, 6.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.12 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0022 g/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.014 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/l Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0.18 g/l CaCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; LB medium: 10 g/l trypton, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl; modified semi-synthetic medium MMBt (modified MBt): 7 g/l casein hydrolysate, 6.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.12 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0022 g/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.014 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/l Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 0.18 g/l CaCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (25), glucose (1.0 %), Na citrate (2 g/l). Yeast polysaccharide media (YPM) for BtH<sub>1</sub> and BtH<sub>10</sub> served as a reference. Bt strains were cultivated in 750 ml Erlenmeyer flasks filled with 40-50 ml of medium on a shaker at 220 rpm and 29 °C for 48-72 h until the maturation of culture, accompanied by the formation of spores and crystalline endotoxin. On the basis of BtH<sub>1</sub> 800/15 and BtH<sub>10</sub> 25 strains, batches of liquid preparations were obtained, the effectiveness of which was evaluated in 2020 and 2021 on potatoes (*Solanum tuberosum* L.) of the Yantar variety in the Far East (Ussuri district of Primorsky Krai) against *Henoseplachna vigintioctomaculata* Motsch and on potatoes of the Emelya variety in the Tambov region against *Leptinotarsa decemlineata* Say. In the experiments, liquid preparations obtained on YPM and MMBt were used, which were used at consumption rates of 15 and 20 l/ha. The biological effectiveness of the preparations was calculated according to the formula W.S. Abbot. The antifungal activity of the preparation BtH<sub>10</sub> 25, obtained on MMBt and YPM, was determined by the method of agar blocks in vitro in Petri dishes. The control medium was used without the addition of drugs. Fungi *Botrytis cinerea* Pers (strain C-5) and *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (strain C-20) served as test cultures. The inhibitory activity was calculated according to the W.S. Abbot. Cultivation of BtH<sub>1</sub> 800/15 and BtH<sub>10</sub> 25 strains on different nutrient media showed that on semi-synthetic media MBt and LB CFU titers were 2 times lower than on YPM, while on CCY medium they were 10 times lower. Their activity, determined by the content of exotoxin, was also lower, but on the MBt medium it was slightly inferior to YPM for BtH<sub>1</sub> 800/15. Therefore, MBt medium was chosen for further studies, and the composition of this medium was modified by adding glucose (1.0 %) and Na citrate (2 g/l). The resulting MMBt medium made it possible to achieve a significant increase in titers, activity, and the rate of culture development compared to the initial MBt. In 2020 in the Tambov region, the effectiveness of the preparation based on BtH<sub>1</sub> 800/15 obtained on DPS was high against the Colorado potato beetle and on the 5th day was 95.3 %, slightly inferior to the chemical standard. In the case of preparation obtained on MMBt, it was slightly lower (83.3 %), but the protective effect lasted longer, and on day 15 the efficiency was 73.7 %. In 2021, the efficacy of BtH<sub>1</sub> 800/15 was lower than in 2020. In the preparation obtained on MMBt, it was slightly inferior to the effectiveness of the preparation obtained on YPM, amounting to 75.3 and 67.7 %, respectively, on the 5th day after treatment. The effect of the BtH<sub>10</sub> 25 preparation

obtained on MMBt was weaker than in the variant with BtH<sub>1</sub> 800/15 (47.7 % on day 5). In Primorsky Krai, the high efficacy of liquid preparations against *H. vigintioctomaculata* was also noted. In 2020, at a rate of application of the BtH<sub>1</sub> 800/15 preparation of 15 l/ha, the effectiveness in the YPM and MMBt variants was 60.5 and 63.9 %, respectively, on day 5. Similar data was obtained in 2021. The inhibitory activity of the BtH<sub>10</sub> 25 preparation obtained on MMBt was 12 % higher on day 5 than that of the preparation obtained on YPM, and was 72.3 and 60.8 % for *B. sorokiniana* and 78.9 and 67.4 % for *B. cinerea*. On day 10, this trend persisted, but for the preparation produced on YPM, a decrease in the inhibition of the growth of *B. sorokiniana* and *B. cinerea* colonies, respectively, to 57.3 and 44.3 % was noted. Thus, preparations based on *Bacillus thuringiensis* obtained on the MMBt medium were only slightly inferior in terms of effectiveness against pests to preparations obtained on YPM, while their effectiveness against phytopathogens was higher than that of preparations with YPM. The MMBt medium is promising for agricultural biotechnology, since its use reduces the time required for the formation of spores and crystalline protein endotoxin by increasing the growth rate of the *B. thuringiensis* culture. Thus, on the MMBt medium, this process ends after 48 h, and on the YPM medium, after 72 h, which makes it possible to reduce energy consumption.

Keywords: biopreparation, *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, Colorado potato beetle, potato ladybug, inhibitory activity, cultural medium.

## REFERENCES

1. Navon A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection — reality and prospects. *Crop Protection*, 2000, 19(8-10): 669-670 (doi: 10.1016/S0261-2194(00)00089-2).
2. Kalmykova G.V., Gorobey I.M., Osipova G.M. *Biotehnologiya*, 2016, 4: 12-19 (in Russ.).
3. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 2001, 17(4): 193-199 (doi: 10.1016/S0168-9525(01)02237-5).
4. Marroquin L.D., Elyassnia D., Griffiths J.S., Feitelson J.S., Aroian R.V. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2000, 155(4): 1693-1699 (doi: 10.1093/genetics/155.4.1693).
5. Grischechkina 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).
6. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775-806 (doi: 10.1128/mmmbr.62.3.775-806.1998).
7. Siegel J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* — based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, 77(1): 13-21 (doi: 10.1006/jjpa.2000.5000).
8. Raymond B., Federici B.A. In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity — a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(7): fix084 (doi: 10.1093/femsec/fix084).
9. Belousova M.E., Malovichko Yu.V., Shikov A.E., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. Dissecting the environmental consequences of *Bacillus thuringiensis* application for natural ecosystems. *Toxins*, 2021, 13(5): e355 (doi: 10.3390/toxins13050355).
10. Grischechkina S.D., Smirnov O.V., Kandybin N.V. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2002, 36(1): 58-62 (in Russ.).
11. Smirnov O.V., Grischechkina S.D. Polyfunctional activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 2011, 3: 123-126.
12. Grischechkina 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. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, 54(3): 494-504 (doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.494eng).
13. 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): 347 (doi: 10.3390/toxins11060347).
14. Mordkovichskiy K.Z. *Zashchita i karantin rasteniy*, 2016, 3: 36-38 (in Russ.).
15. Kovalenko T.K., Matsishina N.V. *Chteniya pamyati A.I. Kurentsova* [Readings in memory of A.I. Kurentsov]. Vladivostok, 2015, vyp. KhKhVI: 128-136 (in Russ.).
16. Volkov O.G., Smirnov Yu.V., Kovalenko T.K. *Karantin rasteniy. Nauka i praktika*, 2012, 1(1): 41-44 (in Russ.).
17. Grischechkina S.D., Ermolova V.P. Efficiency of batsikol based on a new strain *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* № 25 for biocontrol of phytophagous pests and phytopathogens. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(3): 361-368 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.361eng).

18. Kamoun F., Zouari F.N., Saagdaoui I., Jaoua S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin production through culture conditions optimization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2009, 39(4): 400-412 (doi: 10.1080/10826060903209653).
19. Martínez-Cardenas J.A., de la Fuente-Salcido N.M., Salcedo-Hernández R., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39(1): 183-189 (doi: 10.1007/s10295-011-1014-8).
20. Prabakaran G., Balaraman K., Hoti S.L., Manonmani A.M. A cost — effective medium for the large-scale production of *B. sphaericus* H5a5b (VCRC) for mosquito control. *Biological Control*, 2007, 41(3): 379-383 (doi: 10.1016/J.Biocontrol.2007.02.004).
21. Pearson D., Ward O.P. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10: 451-456 (doi: 10.1007/bf01027055).
22. Kalmykova G.V., Cheshkova A.F., Akulova N.I. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*, 2020, 50(2): 44-51 (doi: 10.26898/0370-8799-2020-2-6) (in Russ.).
23. Smith R.A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1982, 28(9): 1089 (doi: 10.1139/m82-162).
24. Gladstone G.P., Fildes P.A. A simple culture medium for general use without meat extract or peptone. *British Journal of Experimental Pathology*, 1940, 21(4): 161-173.
25. Lecadet M.-M., Dedonder R. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. *European Journal of Biochemistry*, 1971, 23(2): 282-294 (doi: 10.1111/j.1432-1033.1971.tb01620.x).
26. Bertani G. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1951, 62(3): 293-300 (doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951).
27. Tikhonovich I.A., Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Romanova T.A. *Shtamm Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* № 800/15 v kachestve sredstva dlya polucheniya entomotsidnogo preparata. Patent St. Petersburg, GNU VNII sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii RU 2514211 S1. Zayavl. 10.10.2012. Opubl. 27.04.2014. Byul. № 12 [The strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* No. 800/15 as a means for obtaining an insecticide preparation. Patent Petersburg, GNU All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology RU 2514211 C1. Appl. 10/10/2012. Publ. 04/27/2014. Bull. № 12] (in Russ.).
28. Tikhonovich I.A., Ermolova V.P., Grishechkina S.D., Romanova T.A. *Shtamm Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* № 25 v kachestve sredstva kompleksnogo vozdeystviya na vrednykh zhestkokrylykh nasekomykh i fitopatogennye gryby. Patent St. Petersburg, GNU VNII sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii RU 2514211 S 1. Zayavl. 26.12.2012. Opubl. 27.04.2014. Byull. № 12 [The strain of *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* No. 25 as a means of complex action on harmful beetles and phytopathogenic fungi. Patent Petersburg, GNU All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology RU 2514211 C 1. Appl. 12/26/2012. Publ. 04/27/2014. Bull. № 12] (in Russ.).
29. Grishechkina S.D., Ermolova V.P., Minina G.N., Safronova V.I., Bologova E.V. *Metodika. Kolleksiya shtammov bakteriy-simbiontov vrednykh nasekomykh i gryzunov, prigodnykh dlya biokontrolya chislennosti vrediteley sel'skokhozyaystvennykh rasteniy* [Methodology. Collection of strains of bacteria-symbionts of harmful insects and rodents suitable for biocontrol of pests of agricultural plants]. St. Petersburg, 2014 (in Russ.).
30. Abbott 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).
31. *Metody eksperimental'noy mikologii* /Pod redaktsiyey V.I. Bilay [Methods of experimental mycology. V.I. Bilay (ed.)]. Kiev, 1982 (in Russ.).
32. Dosepkhov B.V. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1985 (in Russ.).
33. Nickerson K.W., Bulla Jr. L.A. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.*, 1974, 28(1): 124-128 (doi: 10.1128/AEM28.1.124-128.1974).
34. Biryukov V.V. *Osnovy promyshlennoy biotekhnologii* [Fundamentals of industrial biotechnology]. Moscow, 2004 (in Russ.).
35. 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).
36. Domínguez-Arrizabalaga M., Villanueva M., Escriche B., Ancin-Azpilicueta C., Caballero P. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(7): 430 (doi: 10.3390/toxins12070430).
37. Tsarenko I.Yu., Roy A.A., Kurdish I.K. *Microbiol. zhurn.*, 2011, 73(2): 13-19.
38. Matsumoto T., Sugiura Y., Kondo A., Fukuda H. Efficient production of protopectinases by *Bacillus subtilis* using medium based on soybean flour. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 6(2): 81-86 (doi: 10.1016/s1369-703x(00)00079-6).
39. Devidas P.C., Pandit B.H., Vitthalrao P.S. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against

- larvae of *Aedes aegypti* Scientif. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 273030 (doi: 10.1155/2014/273030).
40. Anderson R.K.I., Jayaraman K. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2003, 17(3): 225-231.
  41. Sarrafzadeh M.H. Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by Plackett-Burman method. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 2014, 31(4): 131-136 (doi: 10.30492/IJCCE.2012.5936).
  42. Saberi F., Marzban R., Ardjmand M., Shariati F.P., Tavakoli O. Optimization of culture media to enhance the ability of local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2020, 19(7): 468-475 (doi: 10.1016/j.jssas.2020.08.004).
  43. Pustake S.O., Bhagwat P.K., Dandge P.B. Statistical media optimization for the production of clinical uricase from *Bacillus subtilis* strain SP6. *Heliyon*, 2019, 5(5): e01756 (doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01756).