

## АКТИВНОСТЬ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ ХРАНЕНИЯ\*

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

Микробиологический метод борьбы с вредными насекомыми служит альтернативой применению химических пестицидов. Основу энтомоцидных биопрепаратов составляют микроорганизмы, обладающие стабильно высокими показателями эффективности против вредителей. Целью настоящего исследования было изучение культуры штаммов *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>) на жизнеспособность, продуктивность и ларвицидность при хранении различными методами. Штамм 266/2 хранился на мясопептонном агаре (МПА) и в трупах комаров *Culex pipiens molestus* 1 год, в кристаллах NaCl 1,5 года; штамм 71 — на МПА 1 год без пересева, 2 года с пересевом через 6 мес; штамм 87а — методом криоконсервации 10 лет; штаммы 87, 404, 19/43 — в лиофильно высушенном состоянии 28 лет; штаммы 7-1/23, 71/82, 19/1 — в кристаллах NaCl 27 лет. Культуру штаммов BtH<sub>14</sub> выращивали на скошенном МПА при температуре 28-30 °С в течение 5-7 сут до полного образования спор и кристаллического эндотоксина. При хранении BtH<sub>14</sub> методом лиофилизации биомассу споровой культуры в пробирке на скошенном МПА смывали 5 мл 20 % раствора NaCl. По 0,5 мл полученной суспензии с титром 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> КОЕ/мл вносили пастеровской пипеткой в стеклянные ампулы, закрывали стерильным тампоном, затем стерильной пробкой и замораживали в холодной ванне при температуре -22 °С в течение 1 ч, высушивали при -45 °С в течение 23 ч, запаивали под вакуумом над газовой горелкой и хранили в холодильнике при 3-5 °С. При хранении BtH<sub>14</sub> в кристаллах NaCl в пробирку со споровой культурой на скошенном МПА вносили 5 мл 0,9 % физиологического раствора, тщательно растирали петлей до получения гомогенной взвеси, по 0,5 мл вносили в стерильные биологические пробирки, закрывали ватно-марлевыми пробками и хранили при комнатной температуре. При хранении методом криоконсервации спорую культуру BtH<sub>14</sub> суспендировали в мясопептонном бульоне (МПБ) с 10 % глицерина. Полученные суспензии (по 200 мкл) разливали в криопробирки и хранили при -80 °С. Титр BtH<sub>14</sub> и ларвицидную активность для комаров *Aedes aegypti* определяли 1-2 раза в год. Исследования показали, что культура штамма 266/2 через 1 год хранения в трупах комаров *C. pipiens molestus* и на МПА диссоциировала с образованием колоний IV морфотипа S-формы (соответственно 0,8 и 1,6 %), утратившего активность для комаров *A. aegypti*. Титр спор и ларвицидность штамма 71 через 1 год хранения на МПА в пробирках с запарафинированными пробками сохранялись на исходном уровне. При пересеве через каждые 6 мес эти показатели снизились соответственно на 12 и 16 % через 1 год, на 25 и 27 % — через 2 года хранения. Криоконсервация штамма 87а обеспечила стабильность титра и ларвицидной активности через 10 лет. Исходный титр и ларвицидная активность были соответственно 2,74×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,178×10<sup>-3</sup> %. Через 6 и 10 лет они составляли 2,82×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,19×10<sup>-3</sup> %; 2,72×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,18×10<sup>-3</sup> %. Через 27 лет хранения в кристаллах NaCl титры штаммов BtH<sub>14</sub> 7-1/23, 71/82, 19/1 и ЛК<sub>50</sub> для комаров *A. aegypti* варьировали в пределах 3,12×10<sup>9</sup>-3,52×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,135×10<sup>-3</sup>-0,150×10<sup>-3</sup> % при исходных значениях соответственно 3,98×10<sup>9</sup>-4,29×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,10×10<sup>-3</sup>-0,11×10<sup>-3</sup> %. Титры и ларвицидная активность штаммов 87, 404, 19/43, которые хранили методом лиофильного высушивания, оставались в пределах 3,32×10<sup>9</sup>-3,68×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,11×10<sup>-3</sup>-0,14×10<sup>-3</sup> % при исходных значениях 3,86×10<sup>9</sup>-4,45×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и 0,087×10<sup>-3</sup>-0,103×10<sup>-3</sup> %. Таким образом, лучшие показатели для BtH<sub>14</sub> получены при хранении в лиофильно высушенном состоянии, в кристаллах NaCl и с использованием криоконсервации.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>), хранение, титр, ларвицидная активность.

Защита сельскохозяйственных растений, включая овощные, зерновые и плодовые культуры, от насекомых-вредителей представляет серьезную экономическую проблему. Ежегодные потери сельского хозяйства достигают несколько миллиардов рублей (1). Для получения экологически чистой продукции используются биологические препараты, изготовленные на основе микроорганизмов различного происхождения: бактерий, виру-

\* 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.

сов, актиномицетов (1, 2), энтомофторовых грибов и энтомопатогенных нематод (3, 4). Однако в мировой практике защиты растений от вредных насекомых приоритетное место отводится энтомопатогенным бактериям *Bacillus thuringiensis* (Bt) (5-7). Они с успехом используются в качестве безопасного энтомоцидного и ростостимулирующего средства (8, 9). За последние годы число разновидностей *B. thuringiensis*, выделенных отечественными и зарубежными исследователями, многократно увеличилось — в настоящее время их идентифицировано более 70 (10). Бациллы группы *thuringiensis* образуют споры, кристаллический эндотоксин (11-13), термостабильный экзотоксин (14), а некоторые — ферменты с антифунгальными свойствами (15). К преимуществам бактерий Bt можно отнести технологичность, широкий спектр действия (16-18), безопасность для человека и окружающей среды (19, 20), нецелевых насекомых (21-23). Рентабельное производство экологически безопасных биологических препаратов на основе *B. thuringiensis* нуждается в постоянном снабжении штаммами-продуцентами с высокой технологичностью и вирулентностью, что требует создания их коллекций и подбора оптимальных сроков и методов хранения.

Традиционно бактериальные культуры хранятся при периодическом пересеве на свежие среды. При использовании этого метода должны быть соблюдены три основных условия: подходящая поддерживающая среда, идеальная температура хранения, необходимая частота пересевов (24, 25). Коллекции культур Bt сохраняются на скошенном мясопептонном агаре (МПА), рыбном агаре (РА) при температуре 3-5 °С в пробирках с незапарафинированными и запарафинированными ватно-марлевыми пробками, под минеральным маслом, в трупах насекомых, в кристаллах NaCl, в лиофильно высушенном состоянии и методом криоконсервации.

Бактокулицид — высокоэффективный экологически чистый биопрепарат на основе BtH<sub>14</sub> для подавления численности кровососущих комаров и мошек (разработан во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург), который испытан в различных эколого-географических зонах от северных регионов до тропического пояса (Россия, Беларусь, Украина, Франция, Чехословакия, Куба, Индия, Шри-Ланка). По активности он не уступает, а в ряде случаев превосходит зарубежные аналоги (26).

Мы изучили сохранность технологически значимых свойств у штаммов BtH<sub>14</sub>, используемых в производстве бактокулицида, при разных методах хранения. В настоящей работе для этого впервые применили криоконсервацию, а при хранении в лиофильно высушенном состоянии в качестве защитной среды использовали 20 % NaCl.

Цель исследования — оценить жизнеспособность, продуктивность и ларвицидность у набора штаммов *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>) при хранении различными методами в течение разного времени.

**Методика.** Штамм BtH<sub>14</sub> 266/2 поступил из коллекции ССЕВ (Culture Collection of Entomogens Bacteria, г. Прага, Чехословакия). Штаммы 87, 404, 19/43, 7-1/23, 71/82 были выделены из природных субстратов (вода, ил, почва), штаммы 71, 87а, 19/1 получили методом селекции. Изучали активность штаммов BtH<sub>14</sub> при различных методах и сроках хранения: 266/2 — на мясопептонном агаре (МПА) и в трупах комаров *Culex pipiens molestus* 1 год, в кристаллах NaCl 1,5 года; 71 — на МПА 1 год без пересева, 2 года с пересевом через 6 мес; 87а — методом криоконсервации 10 лет; 87, 404, 19/43 — в лиофильно высушенном состоянии 28 лет; 7-1/23, 71/82, 19/1 — в кристаллах NaCl 27 лет.

Культуру BtH<sub>14</sub> выращивали на плотных питательных средах МПА

или РА при температуре  $29 \pm 1$  °С до полного образования спор и кристаллов. При изучении морфологических типов колоний культуру рассеивали на РА методом истощающегося мазка. Микроскопию выполняли с использованием черного анилинового красителя (26) на 7-е сут. Продуктивность штаммов 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 учитывали общепринятым методом серийных разведений с высевом на РА.

Ларвицидную активность изолятов оценивали по методике, предложенной Всемирной организацией здравоохранения (10, 28), на личинках комаров *Aedes aegypti* 4-го возраста инсектарной популяции. Готовили суспензию культуральной жидкости (КЖ) методом разведений в водопроводной воде в 200, 400, 800 и 1600 тыс. раз, что соответствовало 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. В чашки Петри наливали по 50 мл суспензии в соответствующем разведении и помещали по 25 личинок комаров. Чашки ставили в термостат на 24 ч при 28-30 °С, после чего учитывали гибель личинок. Смертность для каждой концентрации с поправкой на гибель в контроле вычисляли по формуле  $X = (M_o - M_k) / (100 - M_k) \times 100$  %, где  $M_o$  и  $M_k$  — средние арифметические значения 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 (29):  $\lg \text{ЛК}_{50} = \lg C_M - \sigma (\sum X_2 - 0,5)$ , где  $C_M$  — максимальная апробированная концентрация препарата,  $\sigma$  — 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.

Лиофилизацию штаммов 87, 404, 19/43 выполняли в 1988 году по следующей схеме. На скошенном МПА выращивали культуру в течение 7 сут, биомассу смывали 5 мл 20 % NaCl, получали бактериальную суспензию с титром  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/мл. Пастеровской пипеткой вносили по 0,5 мл суспензии в стеклянные ампулы, закрывали стерильным ватным тампоном, затем ватной пробкой. Интервал между внесением суспензии в ампулу и процессом лиофилизации сводили до минимума (не более 1 ч). Замораживали культуру в холодной ванне при температуре -22 °С в течение 1 ч, высушивали при -45 °С в течение 23 ч, предварительно удалив ватные пробки из ампулы. Ампулы запаивали вод вакуумом над газовой горелкой и хранили в холодильнике при 3-5 °С.

При хранении VtH<sub>14</sub> в кристаллах NaCl культуру выращивали на МПА при температуре 30 °С в течение 5-7 сут до полного образования спор и кристаллов эндотоксина. В пробирку с культурой вносили 5 мл физиологического раствора, затем петлей тщательно растирали биоматериал до получения гомогенной взвеси и вносили по 0,5 мл в биологические пробирки, которые закрывали обычными ватно-марлевыми пробками и хранили при 18-22 °С. Повторность каждого варианта 20-кратная. Используя метод криоконсервации, культуру в стационарной фазе роста замораживали в 10 % глицерине и размещали в Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн) при 80 °С (28). Для контроля культуры VtH<sub>14</sub> на жизнеспособность после замораживания и оценки исходных значений продуктивности и ларвицидной активности одну из повторностей размораживали при 37 °С в течение 3 мин и пересевали на РА для дальнейших манипуляций.

Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анали-

за (29) при доверительном интервале 95 %. В таблицах представлены средние ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ).

**Результаты.** В морфологическом составе популяции штамма VtH<sub>14</sub> 266/2, хранившегося тремя методами, происходили изменения (табл. 1). При расसेве на МПА были выявлены колонии четырех морфотипов: I-RS форма — колонии серовато-белого цвета со слегка розовым оттенком, округленные или неправильно округлой формы, плоские, с мелко-шероховатой поверхностью; через 5 сут образовывали споры и кристаллы эндотоксина. II-RS форма (пигментированная) — колонии окрашены в сиренево-розовый цвет; пигмент в среду не выделялся. III-R форма — колонии матово-белые, сухие, морщинистые, плоские, округлые; на агаризованных средах процесс споро- и кристаллообразования завершался через 3 сут. IV-S форма — колонии кремово-бежевого цвета с лопастно-изрезанными краями; в 6-суточной культуре на МПА встречались только вегетативные клетки в цепочках, часто деформированные. Соотношение колоний различных морфологических типов менялось в зависимости от способа хранения культуры. Типичные для популяции фенотипы I-RS формы составляли от 70,4 до 98,6 %, морфологически измененные — от 0,1 до 28,8 % (см. табл. 1). Наибольшую изменчивость наблюдали при хранении штамма в трупах личинок комара *C. pipiens molestus*. При рассеве культуры, кроме основного I-RS морфотипа, выявили 28,8 % и 0,8 % колоний соответственно III-R и IV-S морфотипов.

### 1. Характеристика естественной изменчивости штамма VtH<sub>14</sub> 266/2 в зависимости от метода хранения (лабораторный опыт)

Метод и срок хранения	Просмотрено колоний, шт.	Доля колоний по морфотипу, %			
		I-RS	II-RS (пигментированный)	III-R	IV-S
На МПА, 1 год	1147	98,3	0,1	—	1,6
В кристаллах NaCl, 1,5 года	654	98,6	—	1,4	—
В трупах личинок <i>Culex pipiens molestus</i> , 1 год	974	70,4	—	28,8	0,8

Примечание. МПА — мясоептонный агар. Прочерки означают отсутствие колоний соответствующего морфологического типа. Описание морфотипов см. в разделе «Результаты».

### 2. Биологическая активность различных морфотипов штамма VtH<sub>14</sub> 266/2 в зависимости от метода хранения ( $M \pm SEM$ , лабораторный опыт)

Морфотип	Метод хранения	Титр спор, $\times 10^9$ /мл	ЛК <sub>50</sub> для L4 комара <i>Aedes aegypti</i> , $\times 10^{-3}$ %
I-RS	На МПА (мясоептонный агар)	2,55 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,04
II-RS (пигментированный)		2,43 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,04
IV-S		1,23 $\pm$ 0,12	0
I-RS	В кристаллах NaCl	3,23 $\pm$ 0,11	0,19 $\pm$ 0,04
III-R		2,20 $\pm$ 0,12	0,26 $\pm$ 0,04
I-RS		2,28 $\pm$ 0,09	0,24 $\pm$ 0,04
II-R	В трупах личинок <i>Culex pipiens molestus</i>	1,21 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,04
IV-S		0,98 $\pm$ 0,10	0

Примечание. Описание морфологических типов колоний см. в разделе «Результаты».

У разных морфологических вариантов изучили продуктивность при культивировании в жидкой питательной среде и ларвицидность для комара *A. aegypti* (табл. 2). Колонии I и II морфотипов в культуре, хранившейся на МПА, имели практически равную продуктивность: их титры достигали соответственно  $(2,55 \pm 0,10) \times 10^9$  и  $(2,43 \pm 0,11) \times 10^9$  КОЕ/мл культуральной жидкости. По ларвицидной активности, составившей  $(0,21 \pm 0,04) \times 10^{-3}$  и  $(0,32 \pm 0,04) \times 10^{-3}$  %, I морфотип превосходил II морфотип в 1,5 раза. Культура VI морфотипа медленно росла без образования спор и кристаллического эндотоксина и была непатогенной для личинок *A. aegypti*. Лучшие результаты показал метод хранения VtH<sub>14</sub> в кристаллах NaCl. Хуже всего

штамм хранился в трупах личинок комаров. Штамм 266/2 не обладал стабильностью и при хранении диссоциировал с образованием вариантов с пониженной продуктивностью, причем гладкие S-варианты полностью утратили вирулентность. Селекционная работа позволила выделить более стабильный штамм VtH<sub>14</sub> 71, на основе которого был разработан способ получения ларвицидного препарата.

В таблице 3 представлены титры и активность штаммов VtH<sub>14</sub> при разных методах хранения.

### 3. Биологическая характеристика штаммов VtH<sub>14</sub> после длительного хранения ( $M \pm m$ , лабораторный опыт)

Штамм	Метод и срок хранения	Титр спор, $\times 10^9$ /мл		ЛК <sub>50</sub> для L4 комара <i>Aedes aegypti</i> , $\times 10^{-3}$ %	
		исходное значение	после хранения	исходное значение	после хранения
71	На МПА, 1 год без пересева	2,29 $\pm$ 0,10	2,83 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,02
	На МПА, 2 года с пересевом каждые 6 мес		2,19 $\pm$ 0,10		0,21 $\pm$ 0,02
87a	Криоконсервация:				
	сразу после замораживания	2,74 $\pm$ 0,12		0,178 $\pm$ 0,02	
	через 3 года		2,78 $\pm$ 0,11		0,18 $\pm$ 0,02
	через 6 лет		2,82 $\pm$ 0,10		0,19 $\pm$ 0,02
	через 10 лет		2,73 $\pm$ 0,10		0,19 $\pm$ 0,02
87	Лиофилизация, 28 лет	4,45 $\pm$ 0,14	3,68 $\pm$ 0,12	0,087 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02
404	Лиофилизация, 28 лет	4,34 $\pm$ 0,12	3,42 $\pm$ 0,10	0,092 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02
19/43	Лиофилизация, 28 лет	3,86 $\pm$ 0,11	3,32 $\pm$ 0,12	0,103 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02
7-1/23	В кристаллах NaCl, 27 лет	4,29 $\pm$ 0,11	3,52 $\pm$ 0,12	0,10 $\pm$ 0,02	0,135 $\pm$ 0,02
71/82	В кристаллах NaCl, 27 лет	4,18 $\pm$ 0,14	3,28 $\pm$ 0,13	0,11 $\pm$ 0,02	0,142 $\pm$ 0,02
19/1	В кристаллах NaCl, 27 лет	3,98 $\pm$ 0,12	3,12 $\pm$ 0,12	0,108 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02

Примечание. МПА — мясепетонный агар.

Сравнение титров и ларвицидной активности у разных штаммов VtH<sub>14</sub> в зависимости от метода хранения подтвердило (табл. 3), что у штамма 71 через 1 год хранения на МПА с запарафинированными пробками свойства практически сохранялись. При пересеве через каждые 6 мес эти показания снизились соответственно на 12 и 16 % через 1 год и на 25 и 27 % — через 2 года. Криоконсервация штамма 87a обеспечивала его высокую технологичность и ларвицидность через 10 лет хранения. Штаммы 7-1/23, 71/82, 19/1 после хранения в течение 27 лет в кристаллах NaCl имели высокие значения титра и ларвицидной активности. Не уступали им и штаммы 87, 404, 19/43, которые хранились 28 лет в ампулах в лиофильно высушенном состоянии. Рассев штаммов VtH<sub>14</sub> на РА методом истощающего мазка не выявил существенной изменчивости после длительного хранения в случае лиофилизации и криоконсервации.

Появление атипичных форм при хранении вполне закономерно. На основании полученных данных по предпочтительности хранения VtH<sub>14</sub> с помощью криоконсервации, лиофилизации или в кристаллах NaCl не следует рассматривать как основание для противопоставления разных методов, которые следует использовать в дополнение друг к другу, осуществляя анализы культуры на жизнеспособность и чистоту, оценивая ее продуктивность и выполняя биотестирования перед сезоном наработки бактериального ларвицидного препарата (1).

Отметим, что коллекция штаммов Vt постоянно пополняется. Штаммы, выделенные из природных субстратов, первоначально оцениваются на энтомоцидность и продуктивность. Отобранные активные штаммы после многоступенчатой селекции депонируются и размещаются в Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов, в которой обеспечивается не только долгосрочное сохранение культур микроорганизмов без потерь их полезных свойств, но и надежная маркировка

образцов, регистрация и отслеживание судьбы единиц хранения. База данных Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (RCAM) (Russian Collection of Agricultural Microorganisms) доступна online (<http://62.152.67.70/cryobank/login.jsp>). RCAM поддерживает около 40 штаммов *Bacillus thuringiensis* различных серотипов (в зависимости от действия на насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур): var. *thuringiensis* (BtH<sub>1</sub>), var. *darmstadiensis* (BtH<sub>10</sub>), var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>), var. *kurstaki* (BtH<sub>3a3b</sub>) (30).

Таким образом, штаммы *Bacillus thuringiensis* BtH<sub>14</sub> можно эффективно хранить методами криоконсервации, лиофилизации и в кристаллах NaCl, осуществляя анализ коммерческих продуцентов с энтомо-ларвицидным действием на жизнеспособность, чистоту, продуктивность и активность перед каждым сезоном наработки бактериального ларвицидного препарата на биофабриках и в биолaborаториях. Более ранние исследования показали возможность хранения этими же методами культур *B. thuringiensis* других серотипов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кандыбин Н.В., Патыка Т.И., Ермолова В.П., Патыка В.Ф. *Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта Bacillus thuringiensis*. СПб—Пушкин, 2009.
2. Тихонович И.А., Кожемяков А.П., Чеботарь В.К., Круглов Ю.В., Кандыбин Н.В., Лаптев Г.Ю. *Биопрепараты в сельском хозяйстве. Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве*. М., 2005.
3. Леднев Г.Р., Новикова И.И. Энтомофторовые грибы — перспективы и проблемы использования в биологической защите растений. В сб.: *Биологические средства защиты растений, технологии их изготовления и применения*. СПб, 2005: 261-272.
4. Данилов Л.Г. Научно-методические основы изучения энтомопатогенных нематод (*Rhabditidae: Steinernematidae*) и создание промышленных производств препаратов на их основе. В сб.: *Биологические средства защиты растений, технологии их изготовления и применения*. СПб, 2005: 282-293.
5. Polanczyk R.A., Piresda Silva R.F., Fiuza L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiper* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazil. J. Microbiol.*, 2000, 31: 165-167 (doi: 10.1590/S1517-8382200000300003).
6. Zhong C.H., Ellar D.J., Bishop., Johnson., Lin S.S., Hart E.R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.*, 2000, 76: 131-134 (doi: 10.1006/jjpa.2000.4962).
7. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.*, 2001, 17: 193-199 (doi: 10.1016/S0168-9525(01)02237-5).
8. Siegel J.P. The mammalian safety *Bacillus thuringiensis* based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.*, 2001, 77: 13-21 (doi: 10.1006/jjpa.2000.5000).
9. Haidar R., Deschamps A., Roudet J., Calvo-Garrido C., Bruez E., Rey P., Fermaud M. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biol. Control*, 2016, 92: 55-65 (doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.09.003).
10. Ермолова В.П. *Bacillus thuringiensis* из природных субстратов в Ленинградской области: выделение и идентификация. *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(1): 128-136 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.128rus).
11. Raimondo S., Pauley T.K., Butler L. Potential impacts of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on five salamander species in West Virginia. *Northeast. Nat.*, 2003, 10(1): 25-38 (doi: 10.2307/3858670).
12. 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 CryIAc. *Curr. Microbiol.*, 2004, 48: 47-50 (doi: 10.1007/s00284-003-4102-9).
13. 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(5): 1590-1595 (doi: 10.1603/0022-0493-99.5.1590).
14. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20: 749-753 (doi: 10.1007/s11274-004-4517-x).
15. Shrestha A., Sultana R., Chae J.-C., Kim K., Lee K.-J. *Bacillus thuringiensis* C-25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently control lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. *Eur.*

- J. Plant Pathol.*, 2015, 142(3): 577-589 (doi: 10.1007/s10658-015-0636-5).
16. 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. *J. Invertebr. Pathol.*, 2015, 132: 1-41 (doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009).
  17. Eswarapriya B., Gopalsamy B., Kameswari B., Meera R., Devi P. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* IBt-15 strain against *Plutella xylostella*. *Int. J. PharmTech. Res.*, 2010, 2(3): 2048-2053.
  18. Patel K.D., Bhanshali F.C., Ingle S.S. Diversity and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from alluvial soils of Mahi river basin, India. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2011, 2: 14-20.
  19. Рахманин Ю.А., Новиков С.М., Румянцев Г.И., Иванов С.И. Оценка ущерба здоровью человеку как одно из приоритетных направлений экологии человека и инструмент обоснования управленческих решений. *Гигиена и санитария*, 2006, 5: 10-13.
  20. 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).
  21. Narayanasamy P. Mechanisms of action of bacterial biological control agents. In: *Biological management of diseases of crops. Progress in Biological Control, V. 15*. Springer, Dordrecht, 2013: 295-429 (doi: 10.1007/978-94-007-6380-7\_5).
  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. Biotech.*, 2013, 170: 58-66 (doi: 10.1007/s12010-013-0145-y).
  23. 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).
  24. Speck M. L., Cowman R.A. Preservation of lactic streptococci at low temperatures. In: *Culture collections of microorganisms. Proceedings of the International Conference on Culture Collections, Tokyo* /H. Iizuka, T. Hasegawa (eds.). University Park Press, Baltimore, 1970: 241-250.
  25. Смирнов О.В., Гришечкина С.Д. Проблемы стабилизации ценных свойств штаммов *Bacillus thuringiensis* — продуцентов ларвицидных препаратов. *Вестник защиты растений*, 2009, 1: 26-34.
  26. 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.
  27. Лабинская А.С. *Микробиология с техникой микробиологических исследований*. М., 1972: 139-142.
  28. Safronova V., Tikonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: *Microbes in applied research: Current advances and challenges* /A. Mendez-Vilas (ed.). World Scientific Publishing Co., 2012: 331-334 (doi: 10.1142/9789814405041\_0066).
  29. Доспехов Б.А. *Методика полевого опыта*. М., 1973.
  30. Сафронова В.И., Сазанова А.Л., Кузнецова И.Г., Попова Ж.П., Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Андронов Е.Е. Полногеномное секвенирование и сравнительный анализ генов «домашнего хозяйства» и вирулентности у коммерческих штаммов *Bacillus thuringiensis* с энтомоцидным действием. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(3): 332-338 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.332rus).

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: Ermolovavalya1940@mail.ru ✉, svetagrishechkina@mail.ru,  
ant.nizhnicov@gmail.com

Поступила в редакцию  
20 декабря 2017 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 1, pp. 201-208

## ACTIVITY OF INSECTICIDAL *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* STRAINS STORED BY VARIOUS METHODS

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

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail: Ermolovavalya1940@mail.ru (✉ corresponding author), svetagrishechkina@mail.ru, ant.nizhnicov@gmail.com

ORCID:

Ermolova V.P. orcid.org/0000-0002-9473-8334

Nizhnikov A.A. orcid.org/0000-0002-8338-3494

Grishechkina S.D. orcid.org/0000-0002-4877-705X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

This work was supported by the project of applied research and experimental development (PNER) batch 2017-14-

## Abstract

Microbiological method of insecticidal pests control is an alternative to chemical pesticides. Insect control agents are based on different microorganisms, which should be stably effective against target pest organism. There are different origins of industrial strains including isolation from natural objects, screening of collections, selection of existing strains, genetic engineering etc. but in all cases beneficial features of the strains should be preserved. In this article, the problems of preserving beneficial features of insecticidal bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>) are discussed. This strain is effective as the pest control agent against larvae of mosquitoes, midges and rice and champignons mosquitoes. Different methods and time of storage of various BtH<sub>14</sub> strains are shown: 266/2 on meat-peptone agar (MPA) and in corpse of mosquitoes for one year, in sodium chloride crystals for one and a half year; 71 on MPA without reseeded for one year and for two years with reseeded every six months; 87a by cryopreservation for ten years; 87, 404, 19/43 as lyophilized bacteria for 28 years; 7-1/23, 71/82, 19/1 in sodium chloride crystals for 27 years. Culture of BtH<sub>14</sub> strain was grown on MPA slants at 28-30 °C for 5-7 days until reaching the complete formation of spores and endotoxin crystals. Microscopic analysis was carried out with aniline black dye. Morphological analysis of colonies was performed with colony-purified BtH<sub>14</sub>. When BtH<sub>14</sub> was stored by the lyophilization method, the spore culture in a tube on a slant MPA was washed with 5 ml of a 20 % NaCl solution. Then 0.5 ml of the resulting suspension with a titer of 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ml was added with a Pasteur pipette into glass ampoules, covered with a sterile swab, then sterile stopper and frozen in a cold bath at a temperature of -22 °C for 1 hour, dried at -45 °C for 23 hours, sealed under vacuum over a gas burner and stored in a refrigerator at 3-5 °C. When using the BtH<sub>14</sub> storage method in NaCl crystals, 5 ml of 0.9 % saline was added to a tube with spore culture on slant MPA, resuspended, and 0.5 ml of suspension was added to sterile tubes, covered with cotton-gauze stoppers and stored at room temperature. When BtH<sub>14</sub> was stored by cryopreservation, the spore culture of BtH<sub>14</sub> was suspended in meat-peptone broth (MBP) with 10 % glycerol. The resulting suspensions (200 μl each) were poured into cryovials and stored at -80 °C. The BtH<sub>14</sub> titer and larvicidal activity for *Aedes aegypti* mosquitoes were measured once or twice per year. The results showed that the culture of the 266/2 strain after a year of storage in the corpses of mosquitoes *Culex pipiens molestus* or on MPA dissociated with the formation of 0.8 and 1.6 % of the IV S form morphotype which lost activity against *A. aegypti* mosquitoes. The titer of the spores and the larvicidity of the 71 strain were at the initial level after one year of storage on MPA in tubes with paraffinized plugs when reseeded every 6 months. These indicators decreased, respectively, by 12 and 16 % in a year and by 25-27 % after 2 years of storage. Cryopreservation of the 87a strain provided stability of titer and larvicidal activity after 10 years. Thus, the initial titer and larvicidal activity expressed as LC<sub>50</sub> for *A. aegypti* mosquitoes were 2.74×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.178×10<sup>-3</sup> %, respectively. After 6 and 10 years, they corresponded to the following indicators: 2.82×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.19×10<sup>-3</sup> %; 2.72×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.18×10<sup>-3</sup> %. The BtH<sub>14</sub> strains 7-1/23, 71/82, and 19/1 were stored in NaCl crystals. After 27 years of storage, their titers and LC<sub>50</sub> for *A. aegypti* mosquitoes varied within the range of 3.12×10<sup>9</sup>-3.52×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.135×10<sup>-3</sup>-0.150×10<sup>-3</sup> % as compared to the initial values that were 3.98×10<sup>9</sup>-4.29×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.10×10<sup>-3</sup>-0.11×10<sup>-3</sup> %, respectively. The 87, 404, and 19/43 strains were stored by the method of freeze drying. After 28 years, their titers and larvicidal LC<sub>50</sub> for *A. aegypti* mosquitoes remained within 3.32×10<sup>9</sup>-3.68×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.11×10<sup>-3</sup>-0.14×10<sup>-3</sup> % as compared to the initial values 3.86×10<sup>9</sup>-4.45×10<sup>9</sup> CFU/ml and 0.087×10<sup>-3</sup>-0.103×10<sup>-3</sup> %, respectively. Thus, the best indicators for preservation of valuable properties of BtH<sub>14</sub> were obtained when stored in a lyophilized state, in NaCl crystals and using cryopreservation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BtH<sub>14</sub>), titer, storage, larvicidal activity.

### Научные собрания

#### КОНФЕРЕНЦИЯ «ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ И ЕГО ПРИЛОЖЕНИЯ»

(24 мая 2018 года, г. Москва)

**Организаторы:** ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН совместно с Научным советом РАН по биотехнологии, при поддержке РАН и РФФИ

**Основная цель конференции** — развитие фундаментальных основ технологии редактирования геномов растений и животных как одной из новейших научных задач в геномной инженерии для ускоренного получения новых сортов агрокультуры и линий животных без трансгенеза.

**Контакты и информация:** <http://www.fbras.ru/meropriyatiya-centra/konferentsiya-genomnoe-redaktirovanie-i-ego-prilozheniya>