

УДК 579.832./833:579.26

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ КУЛЬТУРЫ *Bacillus thuringiensis*, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ МЕРЗЛОТНОЙ ПОЧВЫ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2020 г. В. П. Ходырев*, @, И. М. Дубовский**, @, О. В. Поленогова*

*Институт систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

**Новосибирский государственный аграрный университет, ул. Добролюбова, 160, Новосибирск, 630039 Россия

@E-mail: vpbio@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.09.2018 г.

После доработки 15.05.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Обнаружено, что в мерзлотной почве Магаданской обл. кристаллообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* неподвижны и не образуют жгутиков. Отмечено, что у выделенных бактерий кристалл не отделялся от споры, данные бактерии встречались в 80% почвенных образцов, численность бактерий *B. thuringiensis* достигала 4×10^3 КОЕ/г воздушно-сухой почвы. Установлено, что выделенные непосредственно из почвы бактерии *B. thuringiensis* образовывали неплотные колонии, в которых формировались длинные цепочки из многих сотен клеток со спорами и кристаллами (размером от 0.4 до 0.9 мкм), а в составе параспоральных включений доминировали белки молекулярной массой 120, 80, 45, 43, 40 и 18 кДа.

DOI: 10.31857/S0002332920060077

Интерес к бактериям *Bacillus thuringiensis* не ослабевает благодаря тому, что *B. thuringiensis* синтезируют токсины с инсектицидными свойствами (Palma *et al.*, 2014). Эти бактерии составляют основу биопрепаратов, которые широко применяются в борьбе с листогрызущими насекомыми (Somerville *et al.*, 1970; Krieg *et al.*, 1983; Bravo *et al.*, 2011), кровососущими комарами (Brownbridge, Margalit, 1986). К числу чувствительных организмов к этим бактериям относят нематод и простейших (Feitelson *et al.*, 1990). Бактерии *B. thuringiensis* могут иметь и медицинское значение, так как эндотоксин оказывает ингибирующее действие на развитие опухолевых клеток млекопитающих (Egorov, Yudina, 1987). Многие штаммы *B. thuringiensis* продуцируют различные факторы антибиотической активности: термостабильный β -экзотоксин, лецитиназу, протеазы, хитиназы (Бурцева и др., 2001).

В настоящее время возрастает интерес к *B. thuringiensis* как к продуценту бактериоцинов и бактериоциноподобных веществ (Kamoun *et al.*, 2009; Martinez-Cardeñas *et al.*, 2012; Zimina *et al.*, 2016). Данные вещества могут выполнять различные функции, в том числе проявлять активность по отношению к своему виду и восстанавливать баланс кишечного микробного сообщества у человека и животных (Prasad, Shethna, 1976; Helgason *et al.*, 2000; McFall-Ngai *et al.*, 2013).

Бактерии *B. thuringiensis* встречаются повсеместно, в том числе в почве (De Luca *et al.*, 1981; Ohba, Aratake, 1994), на поверхности растений (Smith, Couche, 1991), в кормах для животных (Meadows *et al.*, 1992). Однако их численность, как правило, очень низка, поэтому постоянно разрабатываются различные приемы для обнаружения и выделения этих бактерий (Travers *et al.*, 1987).

Для идентификации *B. thuringiensis* существуют различные критерии, среди которых термостойкость соматических О-антигенов, биохимические характеристики, чувствительность к фагам, специфичность жгутикового Н-антигена (de Bařas, Bonnefoi, 1962, 1973; Смирнова и др., 1993).

Цель работы – изучение некоторых фенотипических (культурально-морфологические, биохимические, антибиотические свойства, способность к образованию бактериоцинов, отношение к температуре, скорость роста, состав белкового профиля), инсектицидных свойств и секвенирование 16S РНК бактерий, изолированных из мерзлотной почвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кристаллообразующие бактерии *B. thuringiensis* были изолированы из образцов почвы Среднеканского р-на Магаданской обл., вблизи пос. Сеймчан,

берег оз. Щучье (62°43'16" с.ш., 152°28'44" в.д.). На местности присутствовала растительность, состоящая преимущественно из лиственничника с тополем и кедровым стлаником, верхний слой с подстилкой. Глубина взятия почвенных проб 0–5 см. Смешанные образцы готовили из пяти проб (собрано 15 образцов).

Почвенные суспензии высевали на среду А следующего состава, %: пептон ферментативный – 0.7, рыбный автолизат – 0.4, NaCl – 0.6, агар-агар – 1.5. Для посева использовали пастеризованные и непастеризованные почвенные суспензии в разведениях 1 : 5, 1 : 10 и 1 : 50. Для изучения колоний кристаллообразующих бактерий проводили посев на среду LB такого состава, %: триптон – 1, дрожжевой экстракт – 0.5, NaCl – 0.5, агар-агар – 1.5. Инкубацию посевов осуществляли при 28°C.

Микробиологический анализ выделенных бактерий проводили с помощью микроскопа Axioscop 40 с видеокамерой AmScope.com FMAO50 в программе Topview (Carl Zeiss, Германия). Для возможного выделения подвижных клонов *B. thuringiensis* проводили ежедневные пересевы штамма 3081 на смеси дрожжевого экстракта и пептонной воды в 1.5%-ных концентрациях. На протяжении 19 сут проводили периодическую проверку культуры на подвижность. Для этой же цели бактерии высевали в U-образные трубки с добавлением 0.5% агар-агара.

Скорость роста *B. thuringiensis* штамма 3081 изучали при инкубировании колонии при 9, 12, 28 и 45°C. Для посева использовали суспензии бактерий с титром 1×10^6 КОЕ/мл. Объем высеваемого материала составил 25 мкл на чашку Петри. Динамику роста колоний отслеживали на протяжении 8 сут при точечном посеве на среду А. Инкубирование посевов осуществляли при 28°C. В качестве контроля использовали *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* штамма 2127 из коллекции музея энтомопатогенных микроорганизмов (УНУ Сибирский зоологический музей Института систематики и экологии животных СО РАН).

Чувствительность *B. thuringiensis* 3081 к антибиотикам определяли с помощью бумажных дисков (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Санкт-Петербург). Кроме того, у *B. thuringiensis* 3081 определяли возможный антагонизм в отношении серологических вариантов Н1–Н34, коллекционных культур *B. thuringiensis* 3081, 3079 и 3098 методом перпендикулярных штрихов (Егоров, 1965), а также возможный взаимный антагонизм штаммов *B. thuringiensis* 3081, 3079 и 3098.

Биохимические признаки и молекулярную массу белка кристаллов *B. thuringiensis* 3081 сравнивали с другими подвидами subsp. *finitimus* 218 (Н2), subsp. *tochigiensis* 1203 (Н19), subsp. *silo* 9413

(Н26) с не отделяющимися от спор кристаллами. Необходимо отметить, что сцепленность спор и параспоральных кристаллов присуща тем подвидам *B. thuringiensis*, у которых включения формируются с внутренней стороны экзоспориума, что, вероятно, способствует спорам и кристаллам оставаться в сцепленном состоянии после лизиса материнской клетки (Debro *et al.*, 1986).

Спорокристаллические смеси шестисуточных культур анализировали с помощью электрофореза в присутствии 0.1% додецилсульфат натрия, используя 10%-ный полиакриламидный гель (Laemeli, 1970). Для визуализации белки окрашивали кумасси R-250. В качестве стандартов молекулярной массы были использованы маркерные белки (AppliChem, Германия). Биохимические свойства кристаллообразующих бактерий характеризовали по методу Барджак и др. (de Bardjas, Bonnefoi, 1962, 1973).

Способность *B. thuringiensis* 3081 синтезировать бактериоцин и бактериоцинподобные вещества выявляли согласно методическим указаниям (Методические..., 2010). В слой среды А на чашках Петри, содержащей 1.5% агар-агара, вносили по 5 мкл 12-часовой культуры с последующей инкубацией 12 ч при 37°C. Синтез бактериоцина инициировали УФ-облучением в течение 30 с и дальнейшим инкубированием. По истечении 12 ч культуры инактивировали хлороформом, поместив под перевернутую чашку Петри без крышки фильтровальную бумагу, смоченную хлороформом. Экспозиция продолжалась 30 мин. После 15 мин проветривания наслаивали 5 мл 0.5%-ного агар-агара, содержащего 1×20 КОЕ/мл тест-штамма. Крышки чашек Петри были заменены стерильными. Инкубирование продолжали 12–15 ч при 37°C. Наличие зон просветления регистрировали в слое тест-культуры.

Анализ гена 16S рРНК проводили в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) (Dubovskiy *et al.*, 2016). Полученные си-квенсы анализировали с использованием базы GenBank NCBI.

Для выявления инсектицидной активности штамма проводили пероральное инфицирование личинок листогрызущих насекомых 2-го возраста следующих видов: капустной *Pieris brassicae* L. и репной *Pieris rapae* L. белянки, непарного шелкопряда *Lymantria dispar* L., черемуховой моли *Yponomeuta evonymella* L., колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say. Листья кормового растения опрыскивали спорокристаллической суспензией шестисуточной культуры с титром 1×10^7 спор/мл (время наблюдения 5 сут). Кроме того, инсектицидную активность штамма выявляли по отношению к



Рис. 1. Неплотная колония *Bacillus thuringiensis* 3081 с нитевидным ростом от центра к периферии, радиальными фракциями с разветвлениями и небольшим плотным центром.

личинкам двукрылых 4-го возраста *Aedes aegypti* и *Culex pipiens pipiens* (время наблюдения 1 сут).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На фоне почвенной микрофлоры при первичном высеве суспензии отчетливо выделялись более крупные колонии бактерий, численность которых составляла 3×10^2 – 4×10^3 КОЕ/г воздушно-сухой почвы. Встречаемость данных колоний составляла 80% всех исследованных образцов. Данные бактерии образовывали параспоральные тела, сцепленные со спорой. Высокая численность и встречаемость кристаллообразующих бактерий в образцах почвы подтверждают их постоянное присутствие в структуре естественной почвенной микробиоты.

Культурально-морфологические свойства. На агаризованной питательной среде А выделенные почвенные бактерии *B. thuringiensis* образовывали неплотные колонии с нитевидным ростом от центра к периферии, радиальными фракциями с разветвлениями и небольшим плотным центром (рис. 1). Подобный рост наблюдался и при посеве методом штриха (рис. 2). По форме колонии характеризуются как ризоидные (Пименова и др., 1983). Профиль колонии плоский, поверхность ровная, струк-

тура зернистая, края волнистые или лопастные, край струйчатый, цвет серо-белый без блеска, при этом культура образует кристаллические включения, сцепленные со спорой. Бактериальные колонии на среде А соответствовали R-варианту.

Колонии кристаллообразующих культур имели разную морфологию при рассеивании на агаризованные питательные среды. *B. thuringiensis* 3081 и 3086 практически не изменяли морфологии колоний, а *B. thuringiensis* 3085, 4001, 4003 и другие диссоциировали на R- и S-варианты. Из 300 исследованных колоний каждого штамма S-варианты составляли от 1.0 до 20.0%, чем подтверждаются данные о переходе *B. thuringiensis* в S-варианты от 1.0 до 3.3% (Макарова и др., 2008). Наши исследования показали, что клоны S-вариантов имеют плотные структуры бело-серого цвета с блеском и неровной поверхностью. Нередко колонии гетерогенных штаммов образовывали несколько сегментов с нечеткими R- и S-вариантами (рис. 3).

Мы выявили, что на формирование колоний также существенно влиял состав питательной среды. На “богатой” среде LB изолированные из почвы штаммы образовывали колонии с обильной биомассой, плоским профилем и слабым блеском, а также имели ризоидный характер роста по краю колоний на 6-е–7-е сут (рис. 4). В смеси дрожже-



Рис. 2. Штриховой посев *Bacillus thuringiensis* 3081. Свободное пространство на питательной среде зарастает нитевидными отростками.

вого экстракта и пептонной воды бактерии формировали пленку и хлопьевидный осадок на дне пробирок, в то же время отсутствовала мутность, характерная для неподвижных бактерий. Многократные пассажи в полужидкую среду с использованием U-образной трубки не выявили подвижных клонов.

Микробиологический анализ. Процесс образования спор и кристаллов у выделенных кристалло-

образующих бактерий завершался на 5-е сут при инкубации 28°C, причем кристаллы оставались сцепленными со спорой (рис. 5). Свободные кристаллы встречались редко, чаще в мазках были видны споры без кристаллов. Однако частично кристаллы были заметно удалены от спор и были расположены под углом к споре. Размеры параспоральных включений составляли от 0.4×0.5 до 0.7×0.9 мкм, т.е. ~50% размера клетки. Споры имели эллиптическую форму размером от 0.4×0.8 до 0.9×1.4 мкм, а размеры клеток 36-часовой культуры составляли от 0.9×2.8 до 1.2×4.5 мкм. Колонии бактерий R-варианта образовывали длинные цепочки из нескольких сотен клеток, которые сохранялись в мазках в виде тяжей, что напоминало бактерии *B. mycoides*. Однако пересевы *B. thuringiensis* 3081 приводили к потере сцепления между полюсами клеток и образованию небольших цепочек, чаще только в растущей культуре. Данное явление присуще практически всем подвидам *B. thuringiensis*. Колонии *B. thuringiensis* 3087 образовывали цепочки клеток из спор и кристаллов или только из спор (рис. 6). Клоны S-формы образовывали мелкие кристаллы, олиго- или акристаллогенные клетки, что приводило к потере спорообразования. На “богатой” среде LB *B. thuringiensis* 3981, 3084, 3098 образовывали преимущественно мелкие кристаллические включения или аспорогенные клетки, расположенные в коротких цепочках.

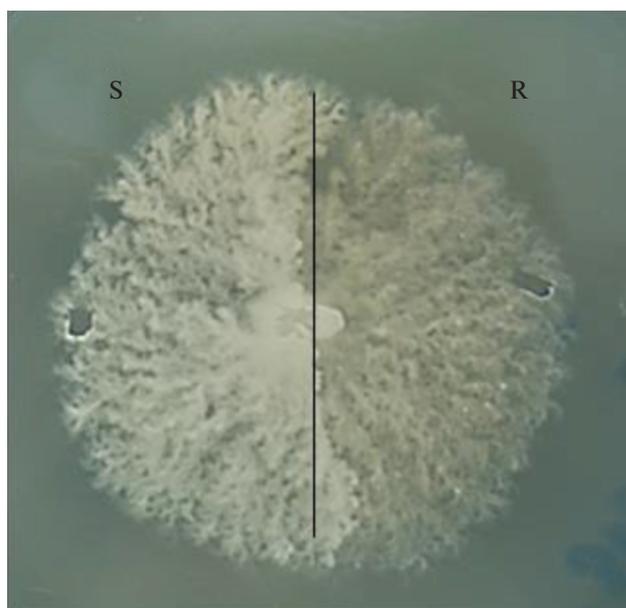


Рис. 3. S- и R-формы бактериальной колонии *Bacillus thuringiensis* 4001.

Таким образом, можно сделать вывод, что образование S-вариантов бактериальных колоний сопряжено с изменением споро- и кристаллообразования. Расщепление на разные морфологи-



Рис. 4. Плотные колонии с ризоидным краем *Bacillus thuringiensis* 3081 на среде LB.

ческие варианты свойственны многим видам бактерий, в том числе *B. thuringiensis*, входящим в группу *Bacillus cereus* (Милько, Егоров, 1991; Дорошенко и др., 2001). Считается, что диссоциация — способ адаптации популяции к меняющимся условиям среды (Милько, Егоров, 1991).

Отношение к температуре и скорость роста. *B. thuringiensis* 3081, как и *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 2127, не растут при температуре инкубирования 9°C. Видимый рост происходит в течение 2 сут от начала инкубирования при 12°C и в течение 5–6 ч при 28°C. При 45°C у *B. thuringiensis* 3081 в течение 3 сут рост отсутствовал, тогда как у *B. thuringiensis* 2127 наблюдался интенсивный рост уже после 6 ч инкубирования. Данный температурный показатель свидетельствует о том, что температура 45°C стрессовая для *B. thuringiensis* 3081, выделенного из зоны вечной мерзлоты, в отличие от *B. thuringiensis* 2127, выделенного на юге Казахстана (Ходырев и др., 2008).

Динамику скорости роста колоний *B. thuringiensis* 3081 и 2127 наблюдали в течение 8 сут. Ризоидные полупрозрачные колонии *B. thuringiensis* 3081 показали более интенсивный рост, чем плотные колонии *B. thuringiensis* 2127 (табл. 1). На 8-е сут эксперимента диаметр колоний *B. thuringiensis* 3081 превышал диаметр колоний *B. thuringiensis* 2127 в 2 раза (46 ± 3.7 и 24 ± 1.9 соответственно).

Биохимические свойства. *B. thuringiensis* 3081 отличался от подвидов *B. thuringiensis* с неотделяющимися кристаллами по ряду биохимических

признаков (табл. 2). Так, данный штамм не образовывал ацетилметилкарбинол в отличие от трех исследуемых подвидов *B. thuringiensis* 218, 1203, 9413 и имел отрицательный результат лецитовителлиновой реакции, как у *B. thuringiensis* 9413.

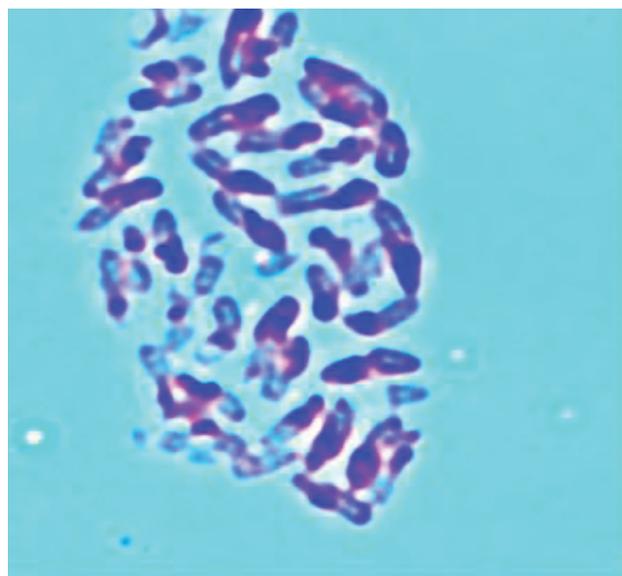


Рис. 5. Сцепленные параспоральные включения размером от 0.4×0.5 до 0.7×0.9 мкм и споры эллиптической формы размером от 0.4×0.8 до 0.9×1.4 мкм штамма *Bacillus thuringiensis* 3081 (использован микроскоп Axsioscop 40 с видеокамерой AmScope.com FMAO50 в программе Topview).

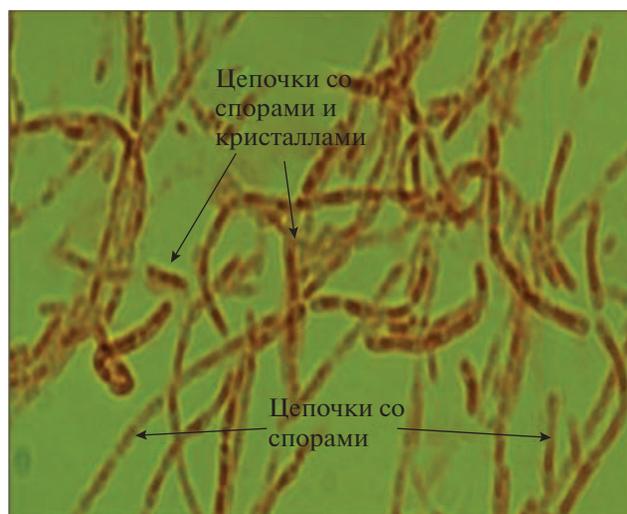


Рис. 6. Микроскопический анализ бактериальных колоний R-варианта *B. thuringiensis* 3087, образованных длинными цепочками из нескольких сотен клеток.

Общие показатели для четырех исследуемых культур – отсутствие уреазной активности, способности усваивать маннозу и образовывать пигмент на желтковой среде.

Антибиотические свойства. Нами была установлена резистентность *B. thuringiensis* 3081 к ряду антибиотических веществ: бензилпенициллину, оксациллину, линкомицину, цефазолину. Однако данная культура обладала чувствительностью к

ципрофлоксацину, эритромицину, гентамицину, стрептомицину, мономицину, левомицетину, клиндамицину (зона угнетения составляла 20–25 мм), тетрацицину, рифампицину, ванкомицину (зона угнетения 10–14 мм). *B. thuringiensis* 3081 не угнетал собственный рост при взаимно-перпендикулярном посеве и рост серологических вариантов от Н1 до Н34, в то же время подвергался угнетению *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (Н4ab) и *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* (Н5ab), образуя свободную от роста зону 5–6 мм.

Бактериоциногенность. *B. thuringiensis* 3081 продуцировал бактериоцины или бактериоциноподобные вещества. Наличие данных веществ подтвердилось проявлением зон просветления тест-культуры на втором слое питательной среды. При газонном способе посева рост *B. thuringiensis* отсутствовал в проекциях нанесения культуры (рис. 7).

Анализ белкового профиля. Результат электрофореза спорокристаллических смесей *B. thuringiensis* 3081 и 3084 показал наличие доминирующих белков с молекулярными массами 120, 80, 45, 43, 40 и 18 кДа и присутствие минорных белков 30 и 28 кДа. Электрофорез выявила, что у *B. thuringiensis* 218 доминируют белки с молекулярными массами 45, 43, 40, 30 и 20 кДа, а *B. thuringiensis* 1203 кроме белков массой 65, 33, 30 и 20 кДа имел минорный белок 17 кДа (рис. 8). Таким образом, белковый профиль выделенных из почвы бактерий *B. thuringiensis* 3081 и 3084 отли-

Таблица 1. Динамика роста бактериальных колоний на плотной питательной среде А при температуре инкубирования 28°C (диаметр, мм)

<i>Bacillus thuringiensis</i>	Период инкубирования, сут				
	1	2	3	4	8
3081	5 ± 0.7	20 ± 1.3	26 ± 1.7	43 ± 2.8	46 ± 2.7
subsp. <i>kurstaki</i> 2127	7 ± 0.9	15 ± 0.8	18 ± 1.3	20 ± 1.6	24 ± 1.9

Таблица 2. Сравнительный биохимический анализ сцепленных со спорой кристаллообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis*

Вид	Штамм	АМК	ЛВР	Амилаза	Уреаза	Эскулин	Усвоение сахаров				Пигмент
							сахароза	салицин	манноза	целлюлоза	
<i>B. thuringiensis finitimus</i>	218	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–
<i>B. thuringiensis tochiensis</i>	1203	+	+	+	–	–	+	–	–	–	–
<i>B. thuringiensis silo</i>	9413	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>B. thuringiensis</i> ssp.	3081	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–

Примечание. АМК – образование ацетилметилкарбинола; ЛВР – лецитовителлиновая реакция; “+” – положительная реакция; “–” – отрицательная реакция.

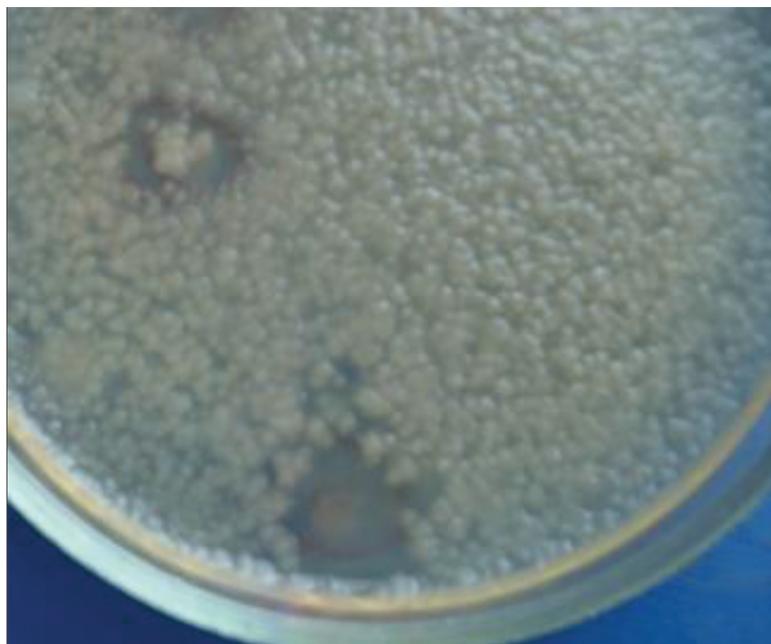


Рис. 7. Продукция бактериоцина или бактериоциноподобных веществ у *Bacillus thuringiensis* 3081 в зонах просветления тест-культуры.

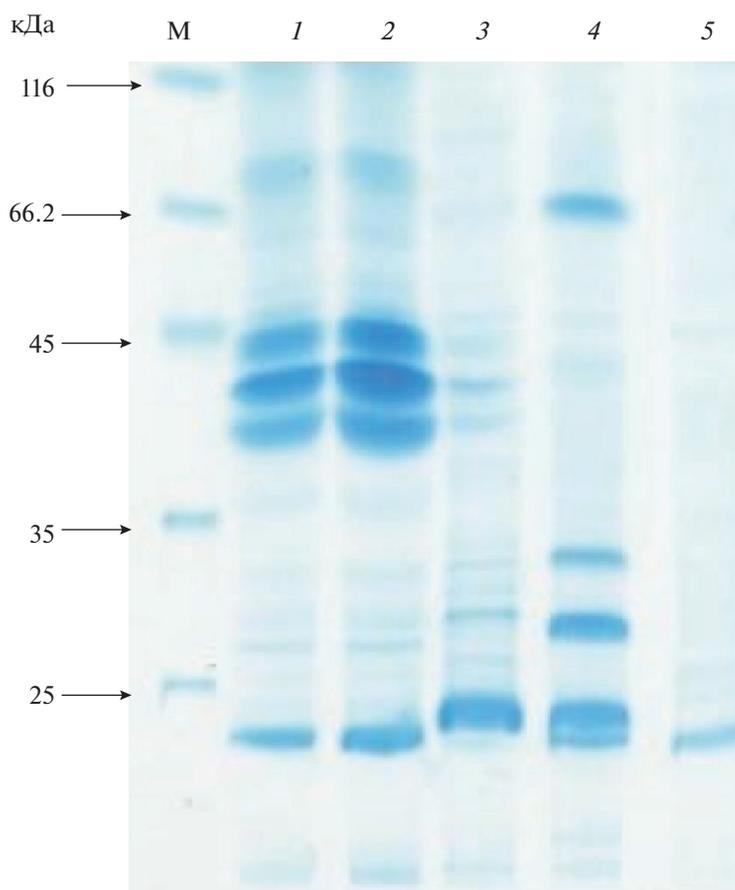


Рис. 8. Сравнительный электрофорез спорокристаллических смесей штаммов *Bacillus thuringiensis*. 1 и 2 – штаммы 3081 и 3084, 3 – штамм ssp. *finitimus* 218, 4 – штамм ssp. *tochigiensis* 1203, 5 – штамм ssp. *silo* 9413. М – стандарты молекулярных масс (AppliChem, Германия).

чался по составу от структуры известных подвигов *B. thuringiensis* ssp. *finitimus* 218 (H2), *B. thuringiensis* ssp. *tochigiensis* 1203 (H19) и *B. thuringiensis* ssp. *silo* 9413 (H26).

Штаммы *B. thuringiensis* 3081 и 3084, изолированные из мерзлотной почвы, факультативные анаэробы, грамположительные, образуют каталазу, способны гидролизировать крахмал и казеин, восстанавливать нитраты, образовывать щелочь на цитратно-солевом агаре, не выделяют аммиака и сероводорода, не образуют индола, способны расти с 7%-ным содержанием NaCl. Бактериальные колонии S-вариантов не изменяли основных биохимических свойств. Таким образом, изучаемые культуры соответствуют кристаллообразующим бактериям группы *B. thuringiensis* (Пименова и др., 1983), что также подтверждено результатами анализа сиквенсов гена 16S рРНК. Изучаемые бактерии наиболее близко соответствуют кристаллообразующим бактериям *B. thuringiensis*, что подтверждено результатами BLAST-анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и сравнения с базами данных GenBank NCBI (Query Cover = 100%, Identities = 99%; MT292104.1; MT292102.1; MT292101.1; MN203618.10). Культура *B. thuringiensis* 3081 не вызывала бактериозов у тестовых насекомых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактериальные культуры *B. thuringiensis* 3081 и 3084, изолированные из мерзлотной почвы Магаданской обл., не были способны к образованию жгутиков. Совокупность морфологических и биохимических показателей выявила соответствие данных бактерий кристаллообразующим *B. thuringiensis*, что в свою очередь было подтверждено анализами секвенирования.

Эти бактерии формируют кристаллы, сцепленные со спорой, и отличаются по ряду биохимических показателей от *B. thuringiensis* ssp. *finitimus* 218, ssp. *tochigiensis* 1203, ssp. *silo* 9413 с не отделяющимися от спор кристаллами. *B. thuringiensis* 3081 и 3084 образуют неплотные колонии, которые формируются клетками, сцепленными с полюсов, объединяясь в длинные цепочки, как у *B. thuringiensis* ssp. *mycooides*, во время роста культуры, что способствует длительному периоду покоя. Вероятно, данная особенность — один из способов адаптации бактерий для сохранения в естественных условиях, так как пассажи на питательной среде часто способствовали утрате образованных длинных цепочек. Клоны данных штаммов формировали R- и S-варианты. Последние образовывали неровную, в то же время гладкую с блеском поверхность, формировали клетки с мелкими кристаллами или без кристаллических включений.

Бактериальная культура штамма *B. thuringiensis* 3081 обладала способностью роста в условиях пониженных и повышенных температур, а также отличалась повышенной скоростью роста колоний по сравнению с *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 2127. Изучаемые бактерии отличались от контрольных штаммов *B. thuringiensis* продуцируемым белковым спектром и способностью к синтезу бактериоцинов.

Таким образом, изолированные в зоне вечной мерзлоты бактерии *B. thuringiensis* имеют оригинальные свойства по культурально-морфологическим показателям, отношению к температурному фактору, а также по структуре белкового профиля. Отсутствие жгутиков и образование ризоидных колоний, по-видимому, одна из форм адаптации бактерий к короткому лету в условиях мерзлоты. Высокая встречаемость и численность (обнаружены в 80% почвенных образцов с численностью до 4×10^3 КОЕ/г почвы) свидетельствуют о том, что бактерии — часть почвенного биоценоза. Мы с осторожностью предполагаем, что выделен новый вид бактерий и планируем продолжить изучение данных бактерий, в том числе их генетических свойств.

Исследование поддержано Комплексной программой фундаментальных научных исследований СО РАН II.1. (проект № АААА-А17-117091270110-0), Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., проект № VI.51.1.4. (АААА-А16-116121410124-8) и грантом Президента РФ (МД-1843.2017.11).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурцева Л.И., Штерншиц М.В., Калмыкова Г.В. Бактериальные болезни насекомых // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. Глупова В.В. М.: Круглый год, 2001. С. 189–245.
- Дрошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.Б., Климанова Е.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. 2001. Т. 70(6). С. 811–819.
- Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высш. шк., 1965. 202 с.
- Макарова О.В., Секерина О.А., Чемерилова В.И. Частота и особенности диссоциации у штаммов 3-х подвигов *Bacillus thuringiensis* // Бюл. ВШЦ СО РАН. 2008. № 2 (60). С. 71–72.
- Методические указания. (Утв. Роспотребнадзором. 21.04.2010.) <https://www.lawmix.ru/medlaw/2718> МУК 4.2.2602-10. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Определение продукции бактериоцинов и чувствительности бактерий к его действию // Методические указания. Система предрегистрационного доклинического

- изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков.
- Милюк Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 143 с.
- Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г., Семенова Е.В., Мильникова С.И. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ, 1983. 210 с.
- Смирнова Т.А., Миненкова И.Б., Шамшина Т.Н., Константинова Т.Е., Кузнецова Н.И., Кузин А.И., Николоенко М., Клищунова Н., Ганушкина Л., Шагов Е., Азизбекян Р.Р. Характеристика природных штаммов *Bacillus thuringiensis* // Биотехнология. 1993. № 11(12). С. 12–16.
- Ходырев В.П., Копжасаров Б.К., Сагитов О.А., Глунов В.В. Бактериоз американской белой бабочки (*Hypantaria cunea* Drury) на юго-востоке Казахстана, вызванный *Bacillus thuringiensis kurstaki* // Евразият. энтомол. журн. 2008. № 7 (2). С. 91–96.
- Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide // Insect. Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 41. Iss. 7. P. 423–431.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Brownbridge M., Margalit J. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae // J. Invertebr. Pathol. 1986. V. 48. P. 216–222.
- De Barjac H., Bonnefoi A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* de type *B. thuringiensis* // Entomophaga. 1962. V. 1. P. 5–31.
- De Barjac H., Bonnefoi A. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis* // Entomophaga. 1973. V. 18. P. 5–17.
- Debro L., Fitz-James P.C., Aronson A. Two different parasporal inclusions are produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus* // J. Bacteriol. 1986. V. 165. P. 258–268.
- De Lucca A.J., Simonson J.G., Larson A.D. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States // Can. J. Microbiol. 1981. V. 27. P. 865–870.
- Dubovskiy I.M., Grizanova E.V., Whitten M.M.A., Mukherjee K., Greig C., Alikina T., Kabilov M., Vilcinskas A., Glupov V.V., Butt T.M. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis* // Virulence. 2016. V. 30. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.008>
- Egorov N.S., Yudina T.G. The antibiotic activity of parasporal crystal solutions from *Bacillus thuringiensis* // Proc. 4 Etit. Congr. Biotechnol. Amsterdam. 1987. V. 3. P. 550–552.
- Feitelson J.S., Payle J., Kim L. *Bacillus thuringiensis* insect and Beyond // Biotechnology. 1990. V. 10. P. 271–274.
- Helgason E., Dominique A., Caugant D.A., Olsen I., Kolsto A.B. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 1615–1622.
- Katoun F., Zoouari N., Jaous S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin production through culture conditions optimization // Biochem. Biotechnol. 2009. V. 39. P. 400–412.
- Krieg A., Huger A.M., Langenbruch G.A., Schnetter W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera // Z. Angew. Entomol. 1983. V. 96. P. 500–508.
- Laemeli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Martinez-Cardeñas 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 // J. Ind Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 39. P. 183–189.
- McFall-Ngai M., Hadfield M.G., Bosch T.C., Carey H.V., Domazet-Lošo T., Douglas A.E., Dübilier N., Eberl G., Fukami T., Gilbert S.F., Hentschel U., King N., Kjelleberg S., Knoll A.H., Kremer N., Mazmanian S.K., Metcalf J.L., Neilson K., Pierce N.E., Rawls J.F., Reid A., Ruby E.G., Rumpho M., Sanders J.G., Tautz D., Wernegreen J.J. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 3229–3236.
- Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarrett P., Burges H.D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill // Appl. Environ. Microbiol. 1992. P. 1344–1350.
- Ohba M., Aratake Y. Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm-breeding environments // J. Appl. Microbiol. 1994. V. 76. P. 203–209.
- Palma L., Muñoz D., Berry C., ús Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: an overview of their bioicidal activity // Toxins. 2014. V. 6. P. 3296–325.
- Prasad S.S., Shethna Y.I. Antitumor immunity against Yoshida ascites carcinoma after treatment with the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* // Indian J. Exp. Biol. 1976. V. 14. P. 285–288.
- Smith R.A., Couche G.A. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. P. 311–315.
- Somerville H.J., Tanada Y., Omi E.M. Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects // J. Invertebr. Pathol. 1970. V. 16. P. 241–248.
- Travers R.S., Martin P.A., Reichelderfer C.F. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. Iss. 6. P. 1263–1266.
- Zimina M.I., Sukhih S.A., Babich O.O., Noskova S.Yu., Abrashina A.A., Prosekov A.Yu. Investigating antibiotic activity of the genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next-generation pharmaceuticals // Foods Raw Mater. 2016. V. 4. P. 92–100.

A New Strain of *Bacillus thuringiensis* Isolated from the Frozen Soil of the Magadan Region

V. P. Khodyrev^{1, #}, I. M. Dubovskiy², and O. V. Polenogova¹

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB PAS, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia*

²*Novosibirsk State Agriculture University, ul. Dobrolyubova 160, Novosibirsk, 630039 Russia*

[#] e-mail: vpbio@yandex.ru

Immobile and not forming flagella crystallogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* were found in the frozen soil of the Magadan Region. In the isolated culture of bacteria the crystals were not separated from the spore. The isolated bacteria were detected in 80% of the soil samples. The number of bacteria reached 4×10^3 cfu/g of dry soil. The soil bacteria formed the friable colonies. The long chains of many hundreds of cells with spores and crystals were presented. The result of electropherogram SDS-PAAG showed that proteins with different molecular weight from 120, 80, 45, 43, 40 to 18 kDa predominated.