

УДК 579.852.11

А. М. Остапчук, к.б.н., завідувач лабораторією
Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
лабораторія біологічних полімерних сполук,
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, 03680, Україна, e-mail: chromas@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ШКІДНИКА ГРИБІВ *BRADISIA PILISTRIATA* FREY ШТАМІВ *BACILLUS* SP. *ONU15* ТА *BACILLUS* SP. *ONU29*

Із застосуванням методів аналізу жирно-кислотного складу, реакції мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із групо-специфічними праймерами, методів фазово-контрастної та електронної мікроскопії, аналізу плазмідного профілю, SDS-PAGE, градієнтного ультрацентрифугування та RAPD з універсальним праймером M13 охарактеризовано та ідентифіковано штами *Bacillus* sp. *ONU15* та *Bacillus* sp. *ONU29*, які є ентомопатогенними проти *Bradisia pilistriata* Frey. За складом жирних кислот та продуктами реакції мультиплексної ПЛР з групо-специфічними праймерами досліджувані штами ідентифіковано як *Bacillus thuringiensis*. Показано, що ізоляти проявляють міжштамову гетерогенність за складом загально клітинних білків, плазмідним профілем та продуктами RAPD реакції з універсальним праймером M13.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, жирнокислотний склад, мультиплексна ПЛР, *Bradisia pilistriata* Frey.

Представники родини *Bacillus* об'єднанні у велику та гетерогенну групу мікроорганізмів космополітів з широким спектром фізіолого-біохімічних властивостей. Вони широко використовуються в сучасній біотехнології для синтезу протеолітичних ферментів, біосурфактантів, фітогормонів, тощо. Особливим видом, який відрізняється від інших представників групи є *Bacillus thuringiensis*. На сьогодні представники цього виду бактерій широко вивчені та інтенсивно використовуються у сільському господарстві в боротьбі з комахами-шкідниками [10], проте з'являються нові ізоляти, які розширюють відомі уявлення про фізіолого-біохімічні характеристики цієї групи.

Метою роботи було провести ідентифікацію, охарактеризувати та визначити гетерогенність штамів *Bacillus* sp. *ONU15* та *Bacillus* sp. *ONU29*, патогенних для *Bradysia pilistriata* Frey.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження були ендоспоро-утворюючі штами *Bacillus* sp. *ONU15* та *Bacillus* sp. *ONU29*, виділені із мертвих комах виду *Bradysia pilistriata* Frey – шкідника їстівних грибів (глива, печериця), які зберігаються в колек-

ції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова [1].

Культивування проводили на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані при 30 °С впродовж 24 год за 180 об/хв. Для індукції споруутворення та кристалізації добову культуру поміщали в розчин 0,86 % NaCl та культивували при 30 °С впродовж наступних 24 год за 180 об/хв. Формування спор та кристалів спостерігали в фазово-контрастний мікроскоп Laboval 4 (Karl Zeiss, Німеччина).

Морфологію та розміри клітин досліджували методом електронної мікроскопії на електронному мікроскопі JEM-1400 (Jeol, Японія) при 80 кВ. Зразки адсорбували на мідних сіточках з формваровою підложкою впродовж 10 хв, промивали водою та контрастували спиртовим розчином уранілу ацетату (1 %).

Для виділення кристалів добову культуру поміщали в колбу з стерильною водою та культивували при 30 °С впродовж 72 год до повного лізису клітин. Ступінь лізису контролювали методом фазового контрасту та забарвленням розчином 0,1 % сафраніну.

Очистку кристалів проводили методом ультрацентрифугування в лінійному градієнті розчину ренографіну згідно [12] на ультрацентрифузі Beckman при 20 000 g впродовж 1 год.

Розчинення очищених кристалів проводили в розчині 50 mM Na₂CO₃ pH 10,5 для вивільнення молекул протоксинів, які входять до складу кристалів.

Спектр протоксिनних білкових субодиниць очищених кристалів досліджуваних штамів вивчали методом вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилу сульфату натрію (SDS-PAGE). Розділення проводили в 14 % гелі на електрофоретичній камері Mini Protean (Bio-Rad, США).

Для визначення загальноклітинного білкового профілю 20–40 мг бактеріальної маси змішували з 60 мкл лізуючого буферу (20 % гліцерол, 2 % 2-меркаптоетанол, 4 % SDS, 70 % концентруючий буфер для електрофорезу – 1,0 M Tris-HCl, pH 6.8) та витримували впродовж 5 хв при 100 °С, додавали 60 мкл води. Проби центрифугували та вносили по 10 мкл в лунку. Розділення здійснювали методом SDS-PAGE на електрофоретичній камері Mini Protean (Bio-Rad, США).

Реакцію мультиплексної ПЛР проводили згідно [11]. Групоспецифічні праймери (BCGSH-1F з послідовністю 5'-GTG CGA ACC CAA TGG GTC TTC-3' та BCGSH-1R з послідовністю 5'-CCT TGT TGT ACC ACT TGC TC-3'), які визначають належність досліджуваного мікроорганізму до групи бактерій *B. cereus* та специфічно взаємодіють з геном *groEL* (продукт 400 п.н.), та видоспецифічні праймери до *B. thuringiensis* (BTJH-1F з послідовністю 5'-GCT TAC CAG GGA AAT TGG CAG-3' та BTJH-R з послідовністю 5'-ATC AAC GTC GGC GTC GG-3'), які взаємодіють з геном *gyrB* (продукт 299 п.н.). В якості негативного контролю використовували ДНК *B. subtilis* ATCC 7001, позитивного

контролю на групоспецифічний праймер ДНК *B. cereus* ATCC 10702 та ДНК *B. thuringiensis* IMV 7173 на видоспецифічний праймер.

RAPD аналіз проводили з універсальним праймером M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') згідно [9].

Виділення плазмід здійснювали згідно [2]. Біомасу бактерій ресуспендували в 100 мкл буфера E (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо (0,05 М Tris, 3 % SDS, рН 12,5). Зразки інкубували при 58–60 °С впродовж 60 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1), акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували 5 хв за 8800g.

Ідентифікацію за жирно-кислотним складом проводили методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, США) на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Колонка капілярна 25м×0,2мм×0,33мм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв. Досліджувану культуру двічі пересівали на тверде поживне середовищі Лурія-Бертані.

Чисту культуру пересівали на TSA середовище (виробник Sigma-Aldrich, США, кат. № 22091) та вирощували впродовж 24 год при 28 °С. Послідовно проводили: омилення ліпідів клітинної стінки бактерій після додавання метанольного розчину NaOH, метилювання вивільнених солей жирних кислот в присутності кислого розчину метанолу, екстракцію органічним розчинником методом рідинно-рідинної екстракції та нейтралізацію проби з додаванням 0,1 М розчину NaOH. Отримані метилові ефіри аналізували методом газової хроматографії.

Результати дослідження та обговорення

Штам *Bacillus sp. ONU15* характеризувався поодинокими розташованими та рухливими клітинами. Клітини штаму *Bacillus sp. ONU29* – розміщувались ланцюжками, не рухливі. Для двох штамів на 3 добу культивування спостерігалось утворення ендоспор, за Грамом досліджувані штами забарвлювалися позитивно.

Методом електронної та фазово-контрастної мікроскопії показана здатність досліджуваних штамів формувати контрастні включення, неправильної форми для штаму *Bacillus sp. ONU15* та овальної – для *Bacillus sp. ONU29* (рис. 1).

Подібні білкові включення характерні для представників виду *B. thuringiensis* та є факторами патогенності поряд з фосфоліпазами, хітиназами, протеазами, β-екзотоксином та речовинами з антифунгіцидною дією, такими як цвітерміцин [8]. Формування таких кристалів у *B. thuringiensis* є унікальним генетично детермінованим феноменом, який індукується стресовими факто-

рами навколишнього середовища та пов'язаний із фізичним виходом води в процесі споруляції. Біологічно, такий ефект направлений на виживання клітин, провокуючи летальну дію, направлену на комаху господаря. Потрапивши до кишково-шлункового тракту комахи, кристали розчиняються з утворенням протоксинів, які в свою чергу, активуються протеазами, перетворюючись у активну токсичну форму. Така форма токсину проявляє дві функції – рецептор-зв'язувальну (високо-специфічне зв'язування з рецепторами епітеліальних клітин) та функцію формування іонних каналів, яка індукує руйнування цих клітин. Рівень токсичності мікроорганізмів визначається наявністю специфічних рецепторів до токсину та ступенем розчинності кристалів в кишківнику комахи. Параспоральні включення *B. thuringiensis* являють собою олігомери, які складаються з поліпептидних протоксिनних субодиноць. Розчинення кристалів і вивільнення протоксинів відбувається за лужних умов середнього відділу кишківника комах [4].

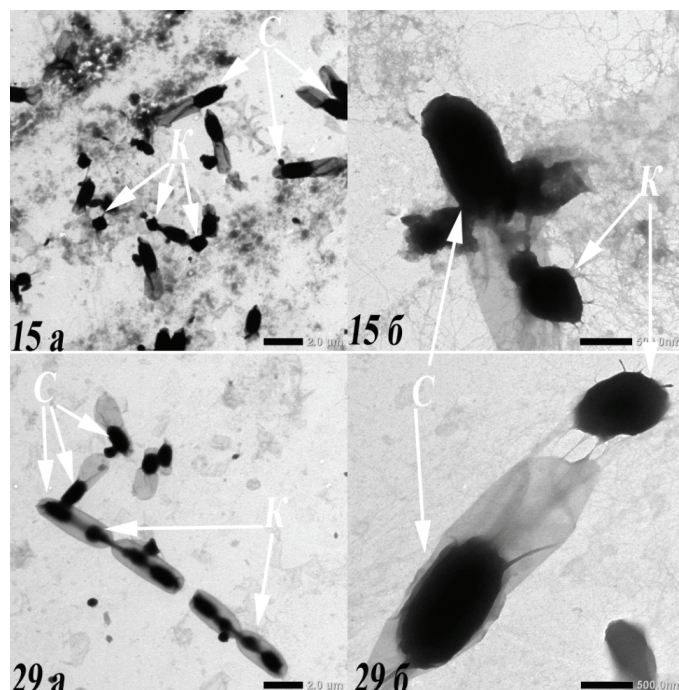


Рис. 1. Ендоспори (С) та кристали (К) штамів *Bacillus* sp. ONU15 (15а, 15б) та *Bacillus* sp. ONU29 (29а, 29б) отримані методом електронної мікроскопії

Методом ультрацентрифугування були отримані очищені кристалічні включення досліджуваних штамів. Методом SDS-PAGE для штаму *Bacillus* sp. ONU29 показано, що після розчинення кристалів утворюються протоксини з молекулярною масою близько 65 кДа. Також виявлена інтенсивна білкова по-

лоса з молекулярною масою близько 30 кДа (рис. 2). Для штаму *Bacillus* sp. *ONU15* характерним є утворення трьох мажорних білкових зон (близько 70, 20 та 25 кДа). Відомо, що *B. thuringiensis* можуть формувати два типи протоксинів з молекулярною масою 125–135 кДа, які процесуються в активні токсини з молекулярною масою близько 65 кДа та протоксин з молекулярною масою 72 кДа, що утворюють токсин в 68 кДа [10]. Крім того, до складу кристалів можуть входити різні Сгу та Сут токсини. Так, Сгу токсини вимагають специфічного білкового рецептора для зв'язування з епітеліальними клітинами кишково-шлункового тракту комахи та характеризуються вибірковою дією щодо комахи. У свою чергу, Сут токсини не мають такої суворої специфічності, можуть зв'язуватися з фосфоліпідами, а тому можуть формувати пори в клітинах різного походження [7], вони мають молекулярну масу близько 22–28 кДа [5] та можуть підсилювати дію Сгу токсинів [13]. Обидва токсини формують пори в мембранах епітеліальних клітин, порушуючи гомеостаз та руйнуючи клітини-мішені. Проростання спор активує експресію та продукцію інших факторів вірулентності, які включені в деструкцію тканин кишково-шлункового тракту комахи.

Серед методів ідентифікації мікроорганізмів можна виділити класичні підходи – морфологічна ідентифікація, біохімічна характеристика, серологічні методи, так і більш сучасні – методи засновані на ДНК технологіях, MALDI-TOF мас-спектрометрії, тощо. Загально визнаним методом ідентифікації мікроорганізмів є аналіз їх загальноклітинного жирнокислотного профілю.

Для жирно-кислотного складу досліджуваних штамів (рис. 3) виявлено характерні розгалужені та ненасичені жирні кислоти. Для *Bacillus* sp. *ONU15* домінуючими в профілі були C15:0 iso (33,67 %), ізомери C16:1 (9,64 %), C13:0 iso (8,32 %), ізомери C17:1 iso (7,61 %), C17:0 iso (10,25 %), в менших кількостях виявлені C14:0 iso (3,38 %), C14:0 (3,63 %), C15:0 anteiso (4,15 %), C16:0 iso (4,45 %), C16:0 (4,16 %). Для штаму *Bacillus* sp. *ONU29* – C15:0 iso (33,73 %), ізомери C16:1 (11,8 %), C13:0 iso (7,86 %), ізомери C17:1 iso (6,9 %), C17:0 iso (7,9 %), в менших кількостях виявлені C14:0 iso (4,48 %), C14:0 (4,37 %), C15:0 anteiso (4,93 %), C16:0 iso (5,14 %), C16:0 (3,66 %), для обох штамів ізомери C12:0 iso, C12:0, C13:0 anteiso, C17:0 anteiso, C17:1 anteiso представлені кількостями до 2 % від загальної суми площ піків. Жирні кислоти можуть містити в своїй структурі розгалуження у вигляді додаткових метильних груп. Їх положення визначає тип ізомерів, так, iso – розгалуження на передостанньому ато-

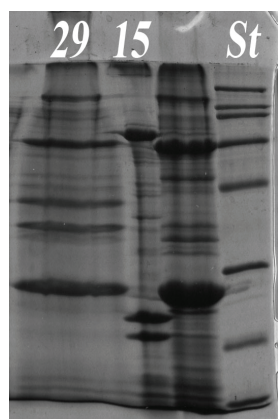
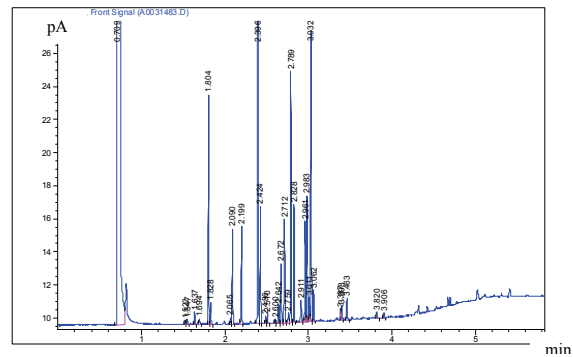
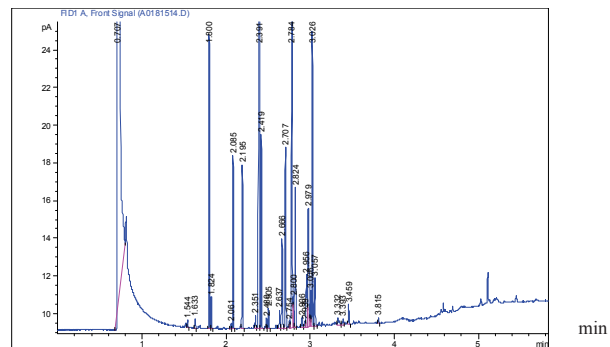


Рис. 2. SDS-PAGE очищених кристалів штаму.
15 – *Bacillus* sp. *ONU15*,
29 – *Bacillus* sp. *ONU29*,
St – маркер молекулярної маси білків



3a



3б

Рис. 3. Жирно-кислотні профілі штамів.
Bacillus sp. ONU15 (3a) та Bacillus sp. ONU29 (3б)

мі вуглецю молекули жирної кислоти, anteiso – на атомі вуглецю, який передує передостанньому атому вуглецю молекули жирної кислоти.

Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA) досліджувані штами ідентифіковано як *B. thuringiensis*.

Методом мультиплексної ПЛР для досліджуваних штамів показана здатність до утворення продуктів двох типів – амплікону в 400 п.н. до гену *groEL*, який характерний для всіх представників групи *B. cereus* та амплікону в 299 п.н. до гену *gyrB* діагностичного маркера для виду *B. thuringiensis* (рис. 4).

Відомо, що характеристика загально-клітинного білкового профілю може бути використана для визначення штамової подібності та ідентифікації бактерій [3]. Білковий профіль штаму *Bacillus sp. ONU29* був ідентичним до профілю штаму *B. thuringiensis* IMV 7173 (рис. 5). Профіль штаму *Bacillus sp. ONU29* відрізнявся присутністю мажорного білка близько 45 кДа, який був відсутній у штаму *Bacillus sp. ONU29*.

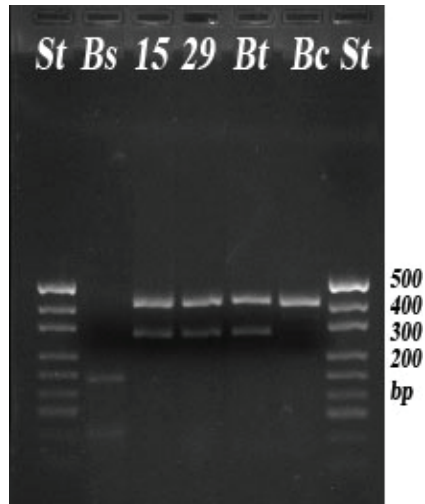


Рис. 4. Електрофорез продуктів мультиплексної ПЛР ДНК штамів з групо- та видоспецифічними праймерами.
15 – *Bacillus sp. ONU15*, 29 – *Bacillus sp. ONU29*, Bs – *B. subtilis ATCC 7001*,
Bc – *B. cereus ATCC 10702*, Bt – *B. thuringiensis IMV 7173*,
St – маркер молекулярної маси ДНК

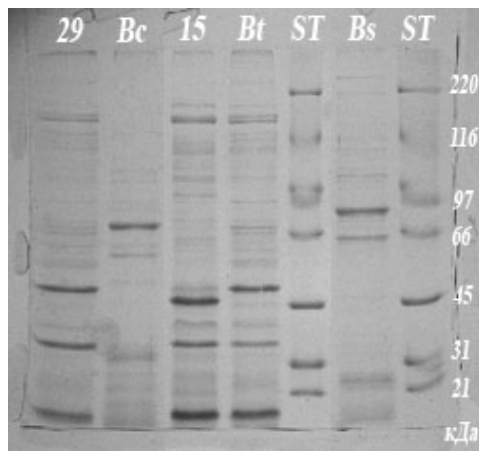


Рис. 5. Загально-клітинний білковий профіль досліджуваних штамів бацил визначений методом SDS-PAGE.
15 – *Bacillus sp. ONU15*, 29 – *Bacillus sp. ONU29*, Bs – *B. subtilis ATCC 7001*,
Bc – *B. cereus ATCC 10702*, Bt – *B. thuringiensis IMV 7173*,
St – маркер молекулярної маси білків

Для визначення міжштамової гетерогенності *B. thuringiensis* застосували RAPD аналіз з універсальним праймером M13 [6]. Показано, що профіль продуктів штаму *Bacillus sp. ONU29* був більш близьким до профілю *B. thuringi-*

ensis IMV 7173 (рис. 6). Набір продуктів реакції для штаму *Bacillus sp. ONU15* мав інший характер розподілу, що може свідчити про міжштамову гетерогенність досліджуваних штамів.

Відомо, що Сгу-токсини кодуються генами розміщеними на великих плазмідах, хоча деякі можуть бути інтегровані і в хромосоми. Той факт, що гени Сгу-токсинів містяться на трансмісильних плазмідах, підвищує можливість горизонтального генного переносу серед різних штамів *Bacillus thuringiensis*, що може призвести до появи нових штамів з іншим набором Сгу-токсинів [4]. Аналіз плазмідного профілю показав, що досліджувані штами мали різні набори великих плазмід, що підтверджує їх міжштамову гетерогенність (рис. 7).

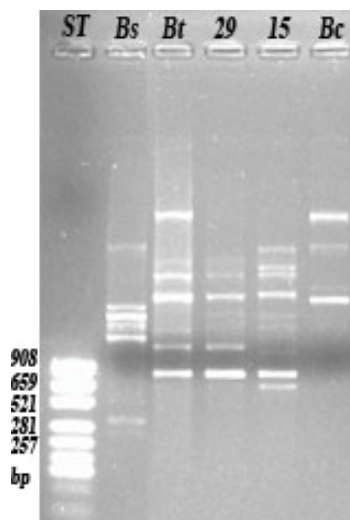


Рис. 6. Електрофоретичний розподіл продуктів реакції RAPD ДНК досліджуваних штамів з праймером M13 в агарозному гелі.
15 – *Bacillus sp. ONU15*, 29 – *Bacillus sp. ONU29*, Bs – *B. subtilis* ATCC 7001, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, St – маркер молекулярної маси ДНК

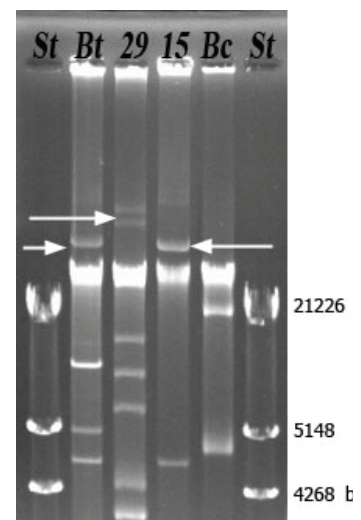


Рис. 7. Плазмідний профіль досліджуваних штамів.
15 – *Bacillus sp. ONU15*, 29 – *Bacillus sp. ONU29*, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, St – маркер молекулярної маси ДНК, стрілками відмічені мегаплазміди, на яких кодуються Сгу-токсини

Відомо, що Сгу-токсини кодуються генами розміщеними на великих плазмідах, хоча деякі можуть бути інтегровані і в бактеріальні хромосоми. Той факт, що гени Сгу-токсинів містяться на трансмісильних плазмідах, підвищує можливість горизонтального генного переносу серед різних штамів *Bacillus thuringiensis*, що може призвести до появи нових штамів з іншим набором Сгу-токсинів [4].

Висновки

З використанням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів охарактеризовано ендоспоро-утворювальні штами *Bacillus* sp. *ONU15* та *Bacillus* sp. *ONU29*. Для досліджуваних штамів характерні кристали неправильної та овальної форми, відповідно, до складу яких входить протоксини з молекулярною масою близько 65 та 25 кДа. За жирно-кислотним складом та продуктами реакції ПЛР штами віднесено до виду *Bacillus thuringiensis*. Досліджувані штами виявили міжштамову гетерогенність за складом загально клітинних білків, плазмідним профілем та продуктами RAPD реакції з універсальним праймером M13.

Автор висловлює щирю вдячність науковому співробітнику кафедри мікробіології, вірусології і біотехнології Н. В. Коротаєвій за допомогу в організації та проведенні експериментів.

Список використаної літератури

1. Кривицька Т. М. Характеристика штамів бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю до грибних комариків *Bradysia pilistriata* Frey / Т. М. Кривицька, О. С. Багасва, С. П. Ужеська, Н. М. Непом'яша, В. О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія. – 2010. – № 3. – С. 86–94.
2. Сергєєва Ж. Ю. Плазмідні профілі фітопатогенних бактерій родів *Erwinia*, *Ralstonia*, *Agrobacterium* / Ж. Ю. Сергєєва, В. О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 4(28). – С. 36–44.
3. Costas M. Numerical analysis of sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis protein patterns for the classification, identification and typing of medically important bacteria / M. Costas // Electrophoresis. – 1990. – 11. – P. 382–391.
4. Ibrahim M. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective / M. A. Ibrahim., N. Griko, M. Junker, L. A. Bulla // Bioeng Bugs. – 2010. – 1(1). – P. 31–50.
5. Ishii T. Diversity of *Bacillus thuringiensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquitoes / T. Ishii, M. Ohba // J Gen Microbiol. – 1993. – 139(11). – P. 2849–54.
6. Konecka E. Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia Pomonella* L / E. Konecka, Kaznowska A., Ziennicka J., Ziennicki K. // J. of Invertebr. Path. – 2007. – 94. – P. 56–63.
7. Koni Li J. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation / Li J. Koni. D. J. Ellar // J Mol Biol. – 1996. – 257(1). – P. 129–52.
8. Lawrence I. Gill Insect Control: Biological and Synthetic Agents / Gilbert and S. Sarjeet. – Elsevier: London, 2010. – 451 p.
9. Martínez-Blanch J. F. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates / J. F. Martínez-Blanch, G. Sánchez, E. Garay, R. Aznar // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2010. – 99(3). – P. 697–709.
10. Ohba M. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* / M. Ohba, E. Mizuki, A. Uemori // Anticancer Res. – 2009. – 29(1). – P. 283–300.
11. Park S. H. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR / S. H. Park, H. J. Kim, T. W. Kim, H. Y. Kim // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 17(7). – P. 1177–1182.
12. Sharpe E. S. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents / E. S. Sharpe, K. W. Nickerson, L. A. Bulla, Jr., and J. N. Aronson // Appl. Microbiol. – 1975. – 30. – P. 1052–1053.
13. Soberón M. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms / M. I. Soberón, J. A. López-Díaz, A. Bravo // Peptides. – 2013. – 41. – P. 87–93.

Стаття надійшла до редакції 12.03.2015

А. Н. Остапчук

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного
НАН Украины, лаборатория биологических полимерных соединений,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, e-mail: chromas@ukr.net

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГЕННЫХ
ДЛЯ ГРИБНОГО КОМАРИКА *BRADISIA PILISTRIATA* FREY
ШТАММОВ *BACILLUS* SP. *ONU15* И *BACILLUS* SP. *ONU29***

Резюме

Методами анализа жирно-кислотного состава, реакции мультиплексной полимерозной цепной реакции (ПЦР) с группоспецифическими праймерами, методами фазово-контрастной и электронной микроскопии, анализа плазмидного профиля, SDS-PAGE, градиентного ультрацентрифугирования, RAPD с универсальным праймером M13 охарактеризированы и идентифицированы *Bacillus* sp. *ONU15* и *Bacillus* sp. *ONU29* с энтомопатогенной активностью против *Bradisia pilistriata* Frey. Состав жирных кислот и продукты реакции мультиплексной ПЦР позволяют отнести их к виду *Bacillus thuringiensis*. Показано, что изоляты проявляют межштаммовую гетерогенность по составу общеклеточных белков, плазмидным профилям и продуктам реакции RAPD с универсальным праймером M13.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, жирно-кислотный состав, мультиплексная ПЦР, *Bradisia pilistriata* Frey.

А. М. Ostapchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
NASU, Laboratory of Biological Polymeric Compounds,
154, Zabolotny str., Kyiv, MSP 03680, Ukraine, e-mail: chromas@ukr.net

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACTIVE
AGAINST FUNGOUS MIDGE *BRADISIA PILISTRIATA* FREY
STRAINS OF *BACILLUS* SP. *ONU15* AND *BACILLUS* SP. *ONU29***

Summary

By the methods of FAMES analysis, multiplex PCR with group-specific primers, phase-contrast microscopy, electron microscopy, plasmids profile detection, SDS-PAGE, gradient ultracentrifugation and RAPD with M13 *Bacillus* sp. *ONU15* and *Bacillus* sp. *ONU29* strains active against *Bradisia pilistriata* Frey were identified and characterized. Fatty acids composition and multiplex reaction products make it possible to identify the strain as *Bacillus thuringiensis*. The strains are heterogenic according to whole cell proteins and plasmids composition and also as RAPD amplification products developed with M13 primer.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, fatty acids composition, multiplex PCR, *Bradisia pilistriata* Frey.