

УДК 616-092.9

***Brevibacillus laterosporus* КАК АГЕНТ БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ**

© 2023 г. Т. А. Смирнова¹, М. В. Зубашева^{1, *},
Н. В. Шевлягина¹, Ю. А. Смирнов¹, В. Г. Жуховицкий^{1, 2}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

*e-mail: mzubasheva@mail.ru

Поступила в редакцию 21.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Проанализированы и обобщены литературные данные и результаты собственных исследований свойств *Brevibacillus laterosporus* (*Bl*). Приводятся данные по морфологии и характеристике биологических свойств *Bl*. Сообщается о новых кристаллоносных штаммах. Обсуждаются особенности строения спор и кристаллов *Bl*, выявленных с помощью электронной микроскопии. Анализируются данные по кристаллообразованию у разных бацилл. Кристаллы *Bl* обладают москитоцидной активностью. Представлены данные об антимикробных свойствах *Bl*, в том числе об активности *Bl* против лекарственно-устойчивых бактерий. Антимикробная, фунгицидная и цианолитическая активности штаммов *Bl* позволяют использовать их в качестве продуцентов инсектицидов, антибиотиков, бактериоцинов и экологически безопасных бактериальных агентов биоконтроля насекомых, микроорганизмов, беспозвоночных.

Ключевые слова: *Brevibacillus laterosporus*, биологическая активность, бактериальные агенты биоконтроля, инсектициды, антибиотики, бактериоцины

DOI: 10.31857/S0042132423060091, **EDN:** QXCLMT

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проводится поиск и изучение экологически безопасных бактериальных агентов биоконтроля как альтернативы химическим препаратам. Бациллы *Brevibacillus laterosporus* (*Bl*) — перспективный, но недостаточно изученный объект. Для них характерно образование уникального тела в форме каноз. Бациллы *Bl* — естественные обитатели воды, почвы и насекомых. *Bl* продуцируют различные биоактивные факторы: инсектициды, экстраклеточную протеазу, антибиотики, бактериоцины. Установлена активность *Bl* против насекомых различных отрядов чешуекрылых, двукрылых, жесткокрылых, а также против нематод и моллюсков. Наибольшая активность у *Bl* выявлена против насекомых отряда двукрылых Diptera. К этому отряду относятся комары родов *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* и черные мушки *Simulium vittatum*. Они представляют собой существенную угрозу для здоровья людей во многих странах вследствие их способности переносить возбудителей опасных заболеваний, в частности малярии, лимфатического филяриоза, а также ряда вирусных инфекций. *Bl* обладает большим спектром биологической активности, по сравнению с хорошо изученными инсектицидными бактериями *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) и *Bacillus sphaericus* (*Bs*). По-

мимо патогенности в отношении беспозвоночных, штаммы *Bl* проявляют антимикробное действие против различных бактерий и микроскопических грибов. Ряд штаммов *Bl* представляют медицинский интерес, связанный с продукцией антибиотиков и бактериоцинов. Антагонистический потенциал *Bl* в отношении патогенов человека значителен. Важное свойство *Bl* — подавление роста лекарственно-устойчивых бактерий. Штаммы *Bl* характеризуются вариабельностью биологических свойств. Инсектицидная активность *Bl* и способность к кристаллообразованию сближает этот вид с *Bt*, несмотря на их принадлежность к разным группам бацилл. Однако количество исследованных штаммов *Bl* незначительно, по сравнению с *Bt*. Это не позволяет создать классификацию штаммов *Bl*, аналогичную *Bt*. Каждый новый факт, полученный при исследовании свойств *Bl*, будет способствовать формированию группы инсектицидных штаммов, параллельной *Bt*. Нами из природных источников выделены штаммы *Bl*, в том числе кристаллоносный. Ряд неизученных штаммов *Bl* получен из коллекции института Пастера (Institut Pasteur, Paris). Цель настоящего обзора — обобщить имеющиеся данные по *Bl* в качестве агента биоконтроля.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДА

Brevibacillus laterosporus

Бациллы *Bl* — грамположительные спорообразующие бактерии. На вегетативной стадии бактерии растут в виде подвижных палочек. *Bl* — факультативный анаэроб. Образует овальные споры в раздувающемся спорангии. К споре прикреплено канозвидное включение. Морфолого-биохимические и культурально-диагностические признаки (Claus, Berkeley, 1986) представлены в табл. 1.

МОРФОЛОГИЯ *Brevibacillus laterosporus*

Отличительная особенность *Bl* — раздувание спорангия при споруляции и параспоральное канозвидное включение (каноз). Канозвидное включение прикреплено к одной стороне споры.

Происхождение *Bl* описано в обзоре (Ruiu, 2013). Эти бациллы впервые выделены в начале XX в. при исследовании бактериального сообщества медоносных пчел, пораженных европейским гнильцом. Новый вид был назван *Bacillus orpheus* White (White, 1912; McCray, 1917). В 1916 г. эти бациллы, только выделенные из воды, были названы (Laubach, 1916) *Bacillus laterosporus* (*Bl*). При сходстве двух изолятов в дальнейшем второе название получило приоритет (White, 1920). *Bl* причислили к спорообразующим энтомопатогенным видам (Steinhaus, 1946). В результате недавних таксономических исследований, основанных на анализе последовательности 16S-РНК, вид помещен в новый род *Brevibacillus*, внутри кластера *Brevibacillus* (Shida et al., 1996).

Уникальная особенность *Bl*, не обнаруженная у других бацилл, — канозвидное включение CSPB (canoe-shaped parasporal body), которое формируется до завершения споруляции, а после споруляции остается прикрепленным к споре как часть споры. Изучены динамика формирования параспорального тела и его структура (Hannay, 1957). При споруляции тонкие вегетативные клетки набухают и образуют более крупные веретенообразные клетки, в которых формируются споры. По завершении споруляции цитоплазма вегетативной клетки и клеточная стенка лизируются, оставляя спору связанной с параспоральным телом. Это прикрепление сохраняется неопределенно долгое время даже после того, как споры прорастут. Строение параспорального тела отличается от клеточной цитоплазмы, которая имеет зернистый вид. Параспоральное тело как в продольном, так и в поперечном сечении состоит из электронно-плотных пластинок, идущих параллельно оболочке споры, и из менее электронно-плотного материала между ними. Разработан метод выделения каноз-споровой оболочки и проанализирован ее химический состав (Fitz-James, Young, 1958). Согласно данным исследования, основные компоненты ка-

ноз — фосфор и азот. Белки каноз-споровой оболочки экстрагированы щелочью. Результаты комбинированного морфологического и химического анализа показали, что фосфорный компонент является частью ламеллярной структуры, в то время как экстрагируемые белки содержатся в матрице каноз. Установлено, что в каноз локализуются токсины против насекомых *M. domestica* и *A. aegypti* (Ruiu et al., 2007). Потеря токсичности после прогрева свидетельствует о том, что токсин имеет белковую природу. Основные поверхностные белки спор *Bl* охарактеризованы с использованием модели комнатной мухи (Marche et al., 2017). Белки, связанные с оболочкой спор и CSPB, представляют собой факторы вирулентности, действующие против насекомых. Показано, что данные белки синтезируются во время роста бактерий, спора становится токсичной, когда эти структуры полностью оформлены. Морфология клеток и спор *Bl* штамма SAM19, активного против личинок *Aedes albopictus*, и эталонного штамма LMG15441 изучена с помощью ТЭМ — трансмиссионной электронной микроскопии (Barbieri et al., 2021). Во время поздней стационарной фазы (24 ч) на полюсе клетки штамма SAM19 наблюдается электронно-плотная структура, вероятно, связанная с зарождающимся CSPB. Через 48 ч, когда споруляция завершена, наблюдается пластинчатый CSPB, прочно прикрепленный к одной стороне оболочки споры. Установлено, что морфология зрелой споры штамма SAM19 похожа на морфологию эталонного штамма LMG15441 и других штаммов *Bl* с энтомопатогенной активностью против двукрылых. Недавно с помощью ТЭМ и СЭМ — сканирующей электронной микроскопии — исследована ультраструктура штамма *Bl* NRS590, активного против мух на разных этапах роста (De Andrade Pereira et al., 2022). Посредством СЭМ выявлена складчатая поверхность зрелых спор. На срезах наблюдается строение спор и канозвидного включения. Оболочка имеет выступы, соответствующие складкам поверхности. Ранее обнаружены параспоральные тела, отличные от CSPB (Montaldi, Roth, 1990), которые идентифицированы как второй тип включений шарообразной и угловатой формы и третий тип — с поперечнополосатыми чередующимися параллельными полосами.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Brevibacillus laterosporus

Известно, что *Bl* продуцирует биоцидные вещества, активные против насекомых, бактерий, грибов: инсектициды, антибиотики, бактериоцины, ферменты. Данные по биологической активности *Bl* (Ruiu, 2013) представлены в табл. 2.

Также обнаружена антивирусная активность у *Bl*. Штамм *Bl* B8 ингибирует вирус табачной моза-

Таблица 1. Морфолого-биохимические и культурально-диагностические признаки *Brevibacillus laterosporus*^a

Признак	Характеристики штаммов <i>Bl</i>
Палочки:	
ширина, мкм	0.5–0.6
длина, мкм	1.5–6.0
Раздутость спорангия	≥90%
Форма споры	Эллиптическая
Преобладающее положение споры	Центральное и латеральное
Параспоральные кристаллы	<10%
Каталаза	≥90%
Анаэробный рост	≥90%
Реакция Фогеса–Проскауэра	<10%
Рост в бульоне Фогеса–Проскауэра	
при pH < 6	11–89%
при pH > 7	<10%
Образование кислоты из D-глюкозы	≥90%
L-арабинозы	<10%
D-ксилозы	< 10%
D-маннитола	≥ 90%
Образование газа из глюкозы	<10%
Гидролиз	
казеина	≥90%
желатина	11–89%
крахмала	<10%
мочевины	<10%
Утилизация	
цитрата	<10%
пропионата	н. д.
Расщепление тирозина	≥90%
Деаминирование фенилаланина	<10%
Лецитиназа на агаре с яичным желтком	≥90%
Окисление нитрата в нитрит	≥90%
Образование	
индола	11–89%
дигидроксиацетона	<10%
Образование газа из нитрата	11–89%
Потребности в NaCl и KCl	<10%
Потребность в аллантоине или мочеvine	<10%
Потребность в ростовых факторах	≥90%
Рост	
при pH 5.0	<10%
при pH 6.8	≥90%
при pH 5.7	<10%

Таблица 1. Окончание

Признак	Характеристики штаммов <i>B1</i>
Рост	
при 2% NaCl	н. д.
при 5% NaCl	11–89%
при 7% NaCl	<10%
Рост	
при 5°C	<10%
при 10°C	<10%
при 30°C	≥90%
при 40°C	11–89%
при 50°C	<10%
Рост при 0.001% лизоцима	≥90%
Автотрофия с H ₂ +CO ₂ или CO	—
Состав Г + Ц в молекуле ДНК (мол. %)	40.2 (по Tm) ^б ; 40.5 (по Bd) ^б
Тип муреина	Мезо-ДАПК ^в
Главный изопреноид хинон	МК-7 ^г

Примечание: ^а “—” — 90% или более штаммов проявляют отрицательную реакцию; <10% штаммов проявляют положительную реакцию; 11–89% штаммов проявляют положительную реакцию; ≥90% штаммов проявляют положительную реакцию; н. д. — нет данных; ^б Tm — температурная денатурация, Bd — плавающая плотность, данные относятся к типовому штамму; ^в Мезо-ДАПК — диаминопимелиновая кислота; ^г МК-7 — менахинон-7.

ики (Li et al., 2021). Множественная биологическая активность *B1* позволяет использовать эти бациллы для биологического контроля (De Oliveira et al., 2004). К антимикробным веществам *B1*, подавляющим рост бактерий, относят антибиотики и бактериоцины. Выделен (Shoji et al., 1976) новый биоцид — водорастворимый антибиотик латероспороамин. Сообщается, что латероспороамин оказывает ингибирующее действие *in vitro* и *in vivo* на широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий: *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*. Обнаружено, что штамм *B1*, выделенный из тропической морской воды на побережье Новой Гвинеи, продуцирует противогрибковые вещества, которые также ингибируют бактерии *E. coli*. Тот же морской изолят — PBG-276 — продуцирует различные антибиотики, включая лолоатины, богролы и липопептид таурамамид. У *B1* также найдены циклодекапептид, латероцидин, ингибиторы тромбина, бацитроцины А, В, С, ингибитор аминокислотной пептидазы М лейгистин и противоопухолевый антибиотик спергуалин (Ruiu, 2013). Антибиотик спергуалин имеет уникальную структуру и излечивает мышиные лейкемии. Спергуалин также подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий *in vitro* (Takeuchi, 1984; Umezawa, Takeuchi, 1987). Недавно выделен антибиотик бревибациллин 2V, активный в отношении грам-

положительных бактериальных патогенов, включая устойчивые к антибиотикам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* и *St. aureus*. Он обладает гораздо более низкой гемолитической активностью, чем известные бревибациллины (Zhao et al., 2021). Это предполагает возможность его использования в качестве лечебного препарата.

Данные об активности *B1* против грибных фитопатогенов представлены в работе (Ruiu, 2013). Результаты ингибирования грибов получены с помощью изолята *B1* ZQ2, выделенного из ризосферы яблони в Китае. Штамм подавляет рост *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Physalospora piricola*. Противогрибковая активность культурального фильтрата с уровнем ингибирования около 80% сохраняется после УФ-облучения, изменения pH или термообработки при 120°C в течение 30 мин. Бациллы *B1*, найденные в образцах ризосферной почвы, известны своими противогрибковыми свойствами, связанными с продукцией противомикробных пептидов. Действие антимикробных пептидов против их мишеней подразумевает взаимодействие с клеточной мембраной, когда образование ионных каналов и трансмембранных пор приводит к разрыву и лизису клетки. Пептиды могут проникать в клетку и нарушать синтез белка, взаимодействуя с ДНК и РНК. Некоторые штаммы *B1* продуцируют хитиназы, которые могут играть важную роль в деградации клеточной

Таблица 2. Биологически активные соединения *Brevibacillus laterosporus*

Активные соединения	Основная активность
Комплементарные токсины ISP1 и ISP2 (Vip1Da1; Vip2Ad1)	Инсектицидная (<i>Coleoptera</i>)
Дополнительные токсины MIS и RAR (Vip1Ba1 и Vip2Ba1)	Инсектицидная (<i>Coleoptera</i>)
Инсектицидные кристаллические белки (PB)	Москитоцидная
Белки спор и CSPB	Инсектицидная (комары, мухи)
Белок с низкой молекулярной массой (2900 Да)	Нематоцидная
Щелочная протеаза BLG4	Нематоцидная
Хитиназы (ChiA1, хитодекстриназа)	Инсектицидная, фунгицидная
Грамицидины S и D	Моллюскоцидная
Разнообразные противомикробные соединения	Антибактериальная, фунгицидная
BL-A60-антимикробный пептид	Антибактериальная, фунгицидная
Латероспорулин	Антибактериальная
Антибиотики и другие лекарственные средства (латероцидин, латероспорамин, тупуселеамиды, базиликамиды, лолоатины, богролы, тарамид, бацитроцины ABC, лейгистин, спергуалин, цефалоспорициназа)	Антибактериальная, фунгицидная
Ферменты (лигнинпероксидаза, лакказа, аминопирин-N-деметилаза, NADH-DCIP-редуктаза и малахитовая зеленая редуктаза)	Обеззараживание, дезинтоксикация, биоремедиация

стенки грибов. Новый изолят *Bl* Lak1210 из почвы в Индии при выращивании на среде, содержащей коллоидный хитин, продуцирует хитиназы. Оценена (Prasanna et al., 2013) активность этих ферментов в отношении фитопатогенного грибка *Fusarium equiseti*.

Благодаря продукции различных метаболитов биоактивность *Bl* имеет широкий диапазон, включающий алыцигидную активность (Кузнецова и др., 2006). Штаммы *Bl* продуцируют, помимо антибиотиков, и другие антимикробные вещества — бактериоцины. В отличие от антибиотиков бактериоцины, хотя и не все, имеют узкий спектр антибактериального действия. Их синтезируют грамположительные и грамотрицательные бактерии. В настоящее время большое внимание уделяется применению природных и генетически модифицированных бактериоцинов.

Бактериоцины — антимикробные пептиды, которые обладают либо узким спектром действия — в отношении родственных видов, либо широким, если речь идет об активности против рода. Бактерии, продуцирующие бактериоцины, невосприимчивы к своим собственным бактериоцинам. Бактериоцины обладают свойствами, которые делают их пригодными для консервирования пищевых продуктов. К этим свойствам относятся: нетоксичность для эукариотов; устойчивость к пищеварительным протеазам и низкому pH;

термоустойчивость; широкий антимикробный спектр против пищевых патогенов; воздействие на цитоплазматическую мембрану бактерий; плазмидная детерминированность признака бактериоциногенности (Rameshkumar et al., 2016). Добавление бактериоцинов в пищевые продукты позволяет бороться с бактериями, вызывающими порчу пищевых продуктов: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *St. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* и *Bacillus cereus*. Другое направление использования бактериоцинов — ингибирование бактерий с множественной лекарственной устойчивостью — *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus* sp., вызывающих опасные заболевания.

В ряде работ приводится классификация бактериоцинов (Scholl, 2017; Zimina et al., 2020).

Бактериоцины грамотрицательных бактерий делят на 4 основных класса: колицины, колициноподобные, подобные фаговым отросткам — тайлоцины, микроцины.

Бактериоцины, подобные фаговым отросткам (тайлоцины), разделяют на типы R и F. R-тип эволюционно связан с семейством фагов Myoviridae, особенностью представителей которого являются фаговые отростки с чехлом, окружающим стержень и имеющим на конце базальную пластинку для связывания с белками клеточной стенки. F-тип бактериоцинов в форме отростков без чехла характерен

для фагов семейства Siphoviridae. Хорошо изучены подобные фаговым отросткам бактериоцины *P. aeruginosa*.

Бактериоцины грамположительных бактерий разделяют на три класса: I, II, III. Класс I — лантибиотики, представляющие собой пептиды с модифицированными аминокислотами (лантионин, метиллантионин); класс II — небольшие (<10 кДа), относительно термоустойчивые, немодифицированные бактериоцины; класс III — большие термолabile белки. Лантибиотики — это бактериальные полипептиды, в состав которых входят тиоэфирные аминокислоты, лантионин и метиллантионин. Данные вещества имеют широкий антимикробный спектр действия. Механизм биологического действия лантибиотиков связан с нарушением проницаемости бактериальных цитоплазматических мембран.

Штаммы *Bacillus* продуцируют бактериоцины всех трех классов. Представители I класса: субтилин, эрицин А, эрицин S, мерсацидин, пенибациллин, субланцин 168, лихеницидин и субтилозин А. Бактериоцины класса II включают коагулин, продуцируемый *Bacillus coagulans*, лихеноцин, продуцируемый *B. licheniformis* VPS50, и др. Класс III представлен крупными белками, обладающими ферментативной активностью: мегацины, бактериоцины, продуцируемые штаммами *Bacillus megaterium*.

Лантибиотики низин и лактицин широко используются в качестве консервантов мясных и молочных продуктов. Эти бактериоцины также применяются в здравоохранении. Лантибиотик лактицин 3147 проявляет активность против вирулентных штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью — стафилококков MRSA и энтерококков, устойчивых к ванкомицину VRE.

Представляют интерес данные по бактериоцинам инсектицидных бацилл *Bt*, которые, возможно, имеют сходство с антибактериальными веществами *Bl*. Инсектицидные бациллы *Bt* занимают ту же экологическую нишу, что и *Bl*, и синтезируют антибактериальные факторы, генетические детерминанты которых способны к переносу в гетерогенные бактерии и имеют плазмидную локализацию. Бациллы *Bt* хорошо известны тем, что синтезируют белки, активные против насекомых. Представители группы *Bt* могут стать источником получения бактериоцинов, обладающих значимой для практических целей активностью. Обнаружен (Favret, Younsten, 1989) пептид, синтезируемый *Bt*, который назван тюрицином. Имеются сведения, что тюрицины ингибируют *L. monocytogenes* (Salazar-Marroquín et al., 2016). Штамм MRSA — метициллин-резистентный *St. aureus* — также оказался чувствительным к тюрицинам. Некоторые бактериоцины *Bt* могут также подавлять грибы. Например, бактериоцин Bn1 и энтомоцин ингибируют рост *Aspergillus niger*. Авторы считают возможным

широкое использование бактериоцинов *Bt*, так как эти бактерии длительно использовались в качестве биоинсектицидов без побочных эффектов.

В настоящее время появились сообщения о бактериоцинах и бактериоциноподобных веществах, вырабатываемых *Bl*. В некоторых случаях антибиотики и бактериоцины рассматриваются вместе. *Bl* SA14, выделенный из пробы воздуха в Таиланде, обнаружил продукцию бактериоцина на восьмой день культивирования. Полученный бактериоцин ингибирует грамположительные бактерии, вызывающие внутрибольничные инфекции. Посредством СЭМ показано, что MRSA разрушается под действием бактериоцина (Somsap, Lertcanawanichakul, 2013). Бактерии, выделенные из силоса и идентифицированные как *Bl*, активны против штаммов грамотрицательных (*Klebsiella pneumoniae* Ni9 и *Ps. aeruginosa* MMA83) и грамположительных (*St. aureus* ATCC 25923 и *L. monocytogenes* ATCC 19111) бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Секвенирование генома этих трех изолятов *Bl* выявило наличие кластеров генов, связанных с продуцированием бревибациллина, грамицидина S, латероспорилина и бактериоцина, подобного лактококцину 972 (Miljkovic et al., 2019). Некоторые штаммы *Bl*, как уже сообщалось, синтезируют спергуалин, который является новым противоопухолевым антибиотиком, и бацитроцины А, В и С (Lertcanawanichakul, Chawawisit, 2020).

Как показывают последние исследования, благодаря антимикробной активности *Bl* может использоваться также как пробиотик. На основе *Bl* производится коммерческий препарат Flora Balance™ в виде капсул, содержащих штамм *Bl* BOD (Hong et al., 2005).

Из представленных данных следует, что благодаря своим антимикробным свойствам вид *Bl* может быть использован в медицине. Он также был предложен для использования в биоремедиации (Ruiu, 2013).

МОСКИТОЦИДНЫЕ СВОЙСТВА *Brevibacillus laterosporus* И АКТИВНОСТЬ ПРОТИВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

О действии *Bl* на насекомых различных отрядов, включая двукрылых, жесткокрылых, чешуекрылых, а также против нематод и моллюсков, сообщается в различных публикациях (Favret, Younsten, 1985; Rivers et al., 1991; Orlova et al., 1998; De Oliveira et al., 2004; Benedict et al., 2007; Ruiu et al., 2012; Ruiu, 2013). Известно, что биоинсектициды обеспечивают целенаправленное действие на насекомых.

Биологический метод борьбы с комарами начался с обнаружения бацилл, активных против двукрылых, — *Bt* var. *israelensis* (Goldberg, Margalit, 1977) и *Bs* (Singer, 1981). Эти два вида бацилл в на-

стоящее время широко известны. Токсическая активность *Bt* var. *israelensis* обусловлена тремя кристаллическими белками Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa и цитотоксическим белком Cyt1Aa, гены которых находятся на плазмиде размером 128 т.п.н. (Ben-Dov, 2014). Белки Cry10Aa, Cyt2Ba, Cyt1Ca, P19 и P20 способствуют токсичности *Bt* var. *israelensis* (Palma et al., 2014). Ларвицидная активность токсинов Cry и Cyt обусловлена их способностью связываться с мембранным фосфолипидным слоем и перфорировать мембраны эпителиальных клеток средней кишки (Du et al., 1999; Bravo et al., 2007). Один из недостатков биологических пестицидов на основе *Bt* — их низкая устойчивость к природным факторам, в частности к УФ-излучению. В связи с этим рецептуру биопестицидов изменяют путем добавления различных УФ-защитных средств (Maghsoudi, Jalali, 2017). Используются также биотехнологические подходы, включающие получение трансгенных культур или рекомбинантных бактерий, экспрессирующих токсины *Bt* (Federici et al., 2003). Кристаллические гены *Bt* введены в *E. coli*, *B. subtilis*, *B. megaterium* и *Ps. fluorescens*. Культивирование рекомбинантных псевдомонад используется для получения концентрированных водных составов биопестицидов, состоящих из включений Cry, инкапсулированных в мертвые клетки этих бактерий. Инкапсулированные формы Cry-белков демонстрируют повышенную устойчивость в окружающей среде (Schnepf et al., 1998; Federici et al., 2003). Имеется возможность возникновения у насекомых устойчивости к биопестицидам, так как в некоторых случаях *Bt* var. *israelensis* может сохраняться в окружающей среде в течение длительного времени, повышая вероятность появления резистентных популяций комаров (Goldman et al., 1986). К недостаткам *Bt* следует отнести родство с видами *B. anthracis* и *B. cereus*. Известна способность *B. cereus* вызывать желудочные заболевания и секретировать токсин цереулидин (Agata et al., 1995). Предполагается, что некоторые штаммы *Bt* имеют гены для синтеза этого токсина или что некоторые препараты могут его содержать, так что требуется полногеномное секвенирование используемых штаммов *Bt*. Гены *ces* расположены на мобильном элементе у *B. weihenstephanensis*, что свидетельствует о возможном горизонтальном переносе между видами (Kalfon et al., 1984; Baumann et al., 1991; Mei et al., 2014).

Штаммы *Bs* также проявляют высокую активность против москитов (Park et al., 2010). Штамм *Bs* 2362, активный компонент препарата VectoLex®, вместе с *Bt* var. *israelensis* используется для контроля насекомых во многих регионах мира. Этот москитоцидный штамм продуцирует различные типы токсинов: 1 — бинарный токсин, состоящий из протеинов BinA (42 кДа) и BinB (51 кДа), образующихся при споруляции и ко-кристаллизующихся; 2 — растворимые токсины Mtx1, Mtx2 и

Mtx3, образующиеся на стадии вегетативного роста; 3 — двухкомпонентный кристаллический токсин Cry48Aa1/Cry49Aa1. Токсины *Bs* при связывании с мембранами клеток средней кишки интернализуются и вызывают гибель клеток (Wirth et al., 2007).

Высоко эффективные, но имеющие недостатки бациллы *Bt* var. *israelensis* и *Bs* стали стимулом для поиска альтернативных видов бактериальных биопестицидов. Выделены штаммы *Bl* с инсектицидными свойствами, активные против жесткокрылых, чешуекрылых и комнатных мух. С учетом необходимости использования новых препаратов постоянно расширяется поиск возможных альтернативных биопестицидов, в том числе на основе *Bl*. Недавно изолирован штамм *Bl* с высокой токсичностью против личинок комаров. Этот штамм выделен в ходе поиска бактериальных изолятов, активных против *Aedes albopictus*, распространенного вида-переносчика многих болезней (Barbieri et al., 2021) — малярии, лихорадки денге и лихорадки Зика. Эндемичными для них являются тропические и субтропические регионы. Но изменение климата и интенсивная коммерческая деятельность человека расширяют географическое распространение многих видов комаров, что способствует передаче болезней в новые страны. Так, *Ae. albopictus* распространился из Юго-Восточной Азии по всему миру и вызвал за последнее десятилетие несколько вспышек лихорадки чикунгунья и лихорадки денге в Европе. В связи с опасностью этого вида комаров проведена работа, направленная на выделение новых культивируемых бактериальных штаммов, обладающих инсектицидной активностью в отношении личинок *Ae. albopictus*. В процессе этой работы такой штамм изолирован. Новый изолят может рассматриваться как кандидат для разработки новых составов биоконтроля, отдельно или в сочетании с *Bt* var. *israelensis* и *Bs*. Также получены данные о применении *Bl* против комнатных мух, развивающихся в навозе (Ruiu et al., 2014). Пероральное введение энтомопатогенных бактерий *Bl* птицам обеспечивает гомогенное включение их активных ингредиентов в среду для размножения мух. Фекалии обработанных *Bl* бройлеров или кур проявляют токсичность в отношении взрослых мух и их личинок. Действие на мух заключается в значительном увеличении времени развития личинок, в снижении веса куколок, плодовитости и долголетия взрослых особей. Показано, что патогенность связана с CSPB, которое состоит из четырех основных белков: CspbA, CspbB, CHRД и ExsC. Поглощение домашними мухами лизатов рекомбинантных штаммов *E. coli*, экспрессирующих гены этих белков, приводит к гибели мух. Это характеризует CspbA, CspbB, CHRД и ExsC в качестве инсектицидных токсинов. Перенос токсинов, локализованных на поверхности споры и прочно прикрепленных к жизнеспособным спорам, рассматривается

как преимущество *Bt*, по сравнению с другими бактериями, поскольку, например, полное инсектицидное действие *Bt* зависит от случайного совместного проглатывания спор и свободных кристаллов токсина (Ruiu et al., 2014).

В экспериментах с использованием разных штаммов *Bt* и с разными видами жесткокрылых обнаружено, что некоторые штаммы токсичны для личинок жесткокрылых видов. Один из изолятов *Bt* токсичен против *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Установлено, что *Bt* является средством биологической борьбы с нематодами. Показана роль внеклеточных протеаз, продуцируемых штаммом *Bt* G4, в активности против нематод, разрушающих их внешнюю протеиновую кутикулу (Tian et al., 2007). В обзоре (Ruiu et al., 2007) приводятся данные о моллюскоцидной активности *Bt*, зарегистрированной против водной улитки *Biomphalaria glabrata* (Say) — переносчика паразитов плоских червей из рода *Schistosoma*, этиологических агентов шистосомоза (тропической болезни). В целевой диапазон *Bt* входит также мидия *Dreissena polymorpha* (Pallas) — инвазивный вид двустворчатых моллюсков, оказывающий негативное воздействие на водные экосистемы. Таким образом, *Bt* с широким спектром биологически активных соединений может быть использован для борьбы против насекомых-вредителей и переносчиков инфекционных заболеваний, патогенных микроорганизмов (бактерий, грибов), простейших, нематод, моллюсков. Важное свойство *Bt* — отсутствие патогенности по отношению к нецелевым объектам.

КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ, ОБРАЗУЕМЫЕ БАЦИЛЛАМИ

Кристаллические включения обнаружены у ряда бацилл. Активность *Bt* и *Bs*, энтомопатогенных бактерий, обусловлена главным образом инсектицидными кристаллами, образующимися во время споруляции. Инсектицидные кристаллы *Bt* и *Bs* хорошо изучены (Смирнова и др., 1984; Baumann et al., 1991; Schnepf et al., 1998).

Наряду с известными инсектицидными кристаллами, белки S-слоя образуют новую группу параспоральных включений *Bt*. Показано, что S-слой состоит из двумерной решетчатой структуры и является самым внешним компонентом многих бактерий. Обнаружено, что параспоральное включение штамма *Bt* CTC представляет собой не типичный кристаллический белок, кодируемый геном *cry*, а белковое включение, кодируемое геном S-слоя. Кроме того, CTC-подобные штаммы (с их параспоральными включениями, кодируемыми геном S-слоя) широко распространены и составляют 25.4% штаммов *Bt*. Эти штаммы составляют новую группу *Bt*, параспоральные включения которых кодируются геном S-слоя (Guo et al., 2008).

Существуют и другие менее известные энтомопатогенные бактерии, которые также образуют кристаллические белковые включения, обладающие инсектицидным действием. Например, *Paenibacillus popilliae* образует параспоральные кристаллы, токсичные для личинок скарабеев (Bulla et al., 1978). Инсектицидный и кристаллоносный штамм *Bacillus pumilus* 15.1 вызывает гибель личинок средиземноморской мухи *Ceratitis capitata* (Garcia-Ramon et al., 2016). Электронно-микроскопически было показано, что этот штамм образует кристаллы, сходные с *Bt*. Для спорующих клеток характерна гиперпродукция белка с молекулярной массой 45 кДа, количество которого достигает максимума через 72 ч культивирования. Кристаллы состоят из белка, который идентифицирован как оксалацетатдекарбоксилаза. Кристаллы самопроизвольно растворяются при хранении в низких температурах, а образующийся белок устойчив к обработке трипсином. Нерастворимые кристаллы, продуцируемые *B. pumilus* 15.1, не показывают значительной токсичности против личинок *C. capitata*, но после солиubilизации наблюдается усиление токсичности. Установлено (Garcia-Ramon et al., 2016), что по своей природе кристаллы *B. pumilus* являются оксалацетатдекарбоксилазой; это стало первым сообщением о естественной продукции параспоральных включений как фермента. Традиционно *B. pumilus* не относили к инсектицидным видам бацилл. Обнаруженная активность против *C. capitata* позволяет рассматривать *B. pumilus* как новый энтомопатоген. Ценная особенность *B. pumilus* — его устойчивость к УФ-облучению.

У неинсектицидных бацилл *B. subtilis* также были найдены кристаллические включения (Rubikas et al., 1987). При электронной микроскопии ультратонких срезов *B. subtilis* обнаружены белковые кристаллические включения в неспорулирующих клетках. Белок, образующий кристаллы, имеет молекулярную массу 47 кДа. По антигенной характеристике и аминокислотному составу кристаллообразующий белок сходен с белком споровой оболочки.

Кристаллические включения найдены у спорующих клеток *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a при электронной микроскопии ультратонких срезов. Кристаллы располагаются рядом со спорой и превышают ее по размерам. Они сходны по морфологии с кристаллами *Bt*. Но у них не обнаружена биологическая активность (Yan et al., 2007).

СВОЙСТВА НОВЫХ КРИСТАЛЛОНОСНЫХ ШТАММОВ *Brevibacillus laterosporus*

Изучены кристаллоносные штаммы *Bt* 16-92 и LAT 006. Штамм *Bt* 16-92 выделен нами. Штамм LAT 006 получен из Института Пастера. Ранее кристаллоносные штаммы *Bt* не были известны.

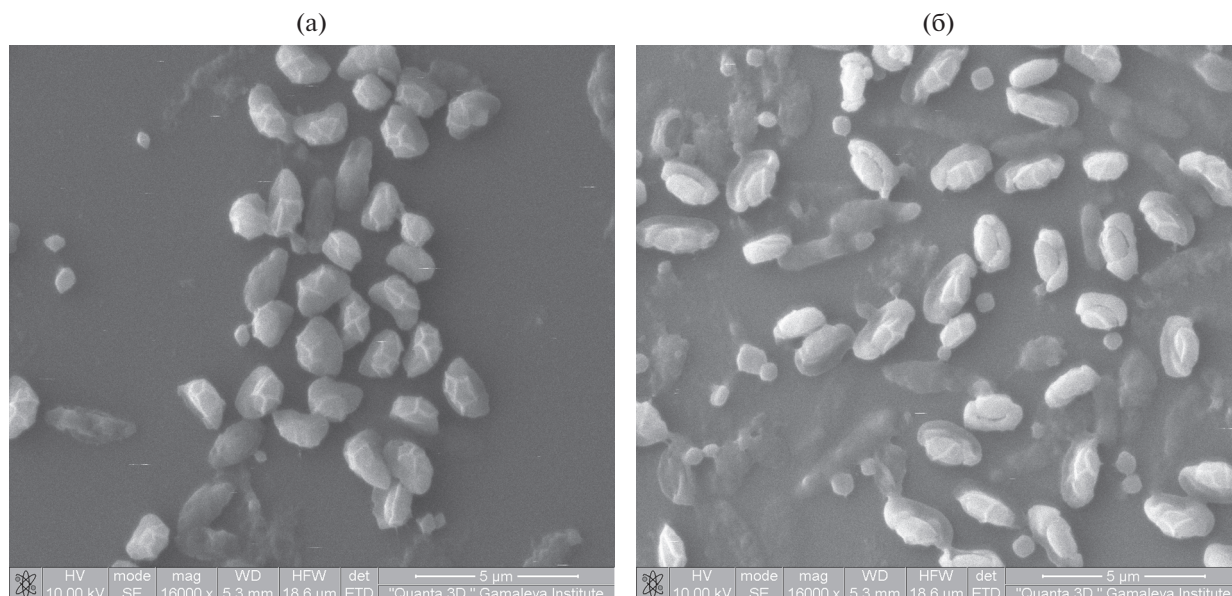


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия — СЭМ: (а) — споры и кристаллы штамма *B/16-92*; метка 5 мкм; (б) — споры и кристаллы штамма *LAT 006*; метка 5 мкм.

Кристаллы *B/* сходны по морфологии и инсектицидной активности с *Bt*, хотя и образуются другой группой бацилл. Это свидетельствует о еще не изученном потенциале бацилл, который может быть использован в биотехнологии. Опубликованы результаты изучения этих штаммов *B/* (Зубашева и др., 2017, 2020; Smirnova et al., 1996; Orlova et al., 1998; Zubasheva et al., 2010, 2011). Ниже представлены данные о кристаллоносных штаммах *B/*, демонстрирующие их особенности.

Уникальное свойство *B/*, как уже упоминалось, — канозвидное включение, прикрепленное к споры. При фазово-контрастной микроскопии включение визуализируется как темное каноз, связанное с оптически прозрачной овальной спорой. На препаратах, обработанных амидошварцем (Smirnoff, 1962), каноз окрашивается, как и белковые кристаллы *Bt*, что позволяет предположить его белковую природу. Кристаллы *B/*, обнаруженные нами при световой микроскопии споро-кристаллической суспензии, также окрашиваются амидошварцем. Проведено изучение *B/16-92* и *LAT 006* методами СЭМ и ТЭМ. Кристаллы и споры хорошо видны при использовании СЭМ (рис. 1). На рис. 1а представлены споры и ромбические кристаллы штамма *B/16-92*, а на рис. 1б — споры и прямоугольные кристаллы штамма *LAT 006*.

Методом ТЭМ с помощью негативного контрастирования также наблюдают споры и кристаллы, форма которых соответствует видимой при исследовании методом СЭМ (рис. 2а–в). На ультратонких срезах видны кристаллы в виде ромба у штамма *B/16-92* и квадратные или в виде пластинок — у *LAT 006*, в зависимости от плоскости сре-

за (рис. 2г–е). Кристаллы появляются в клетках после деления и локализуются рядом со спорой. Освобождаются отдельно от споры при лизисе спорангия. У штамма *B/16-92* наблюдаются двойные кристаллы, окруженные общей оболочкой, имеющей сетчатую структуру (рис. 2ж). У кристаллов *Bt* также наблюдается поверхностная сетка (Fitz-James et al., 1984). Сдвоенные кристаллы *B/* имеют одинаковую плотность и на срезах не обнаруживают исчерченности. Этим они отличаются от кристаллов *Bt var. israelensis*, также окруженных оболочкой. Показано, что включения штамма *Bt var. israelensis*, активного против двукрылых, состоят из различных сегментов: осмиофобного — слегка окрашенного кристаллизованного в виде решетки с периодом 4.3 нм и осмиофильного — окрашенного сегмента с кристаллической решеткой с периодом 7.8 нм (Insell, Fitz-James, 1985).

Москитоцидное действие кристаллоносных штаммов *B/* показано в опытах по биотестированию. Установлено, что эти штаммы обладают токсичностью в отношении личинок комаров *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens*. Ларвицидная активность *B/* связана со спорами и кристаллическими включениями. Кристаллы монокомпонентные, содержат белок с молекулярной массой 68 или 130 кДа. Очищенные белковые кристаллы проявляют различную ларвицидную активность в отношении личинок комаров *A. stephensi* и *A. aegypti*. Очищенные кристаллы штамма 615 (получен из штамма *LAT 006*) — высокотоксичны для *Aedes aegypti* и *Anopheles stephensi* (Orlova et al., 1998; Zubasheva et al., 2010). Биоинкапсуляция спор и кристаллов кристаллообразующего штамма *B/LAT 006* с

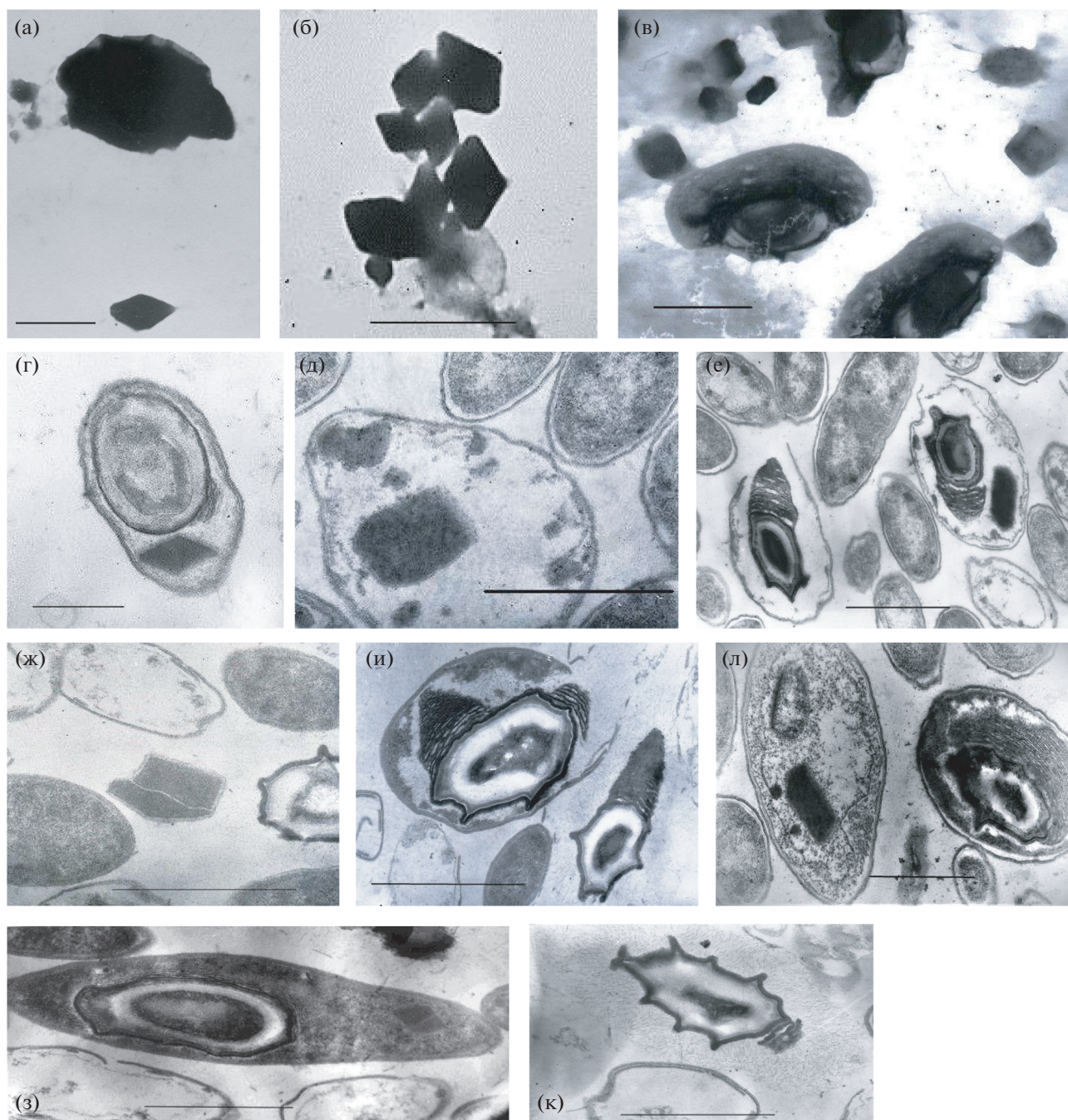


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия – ТЭМ: (а) – кристалл и спора штамма *Bl* 16-92; негативное контрастирование; метка 1 мкм; (б) – кристаллы штамма *Bl* 16-92; негативное контрастирование; метка 1 мкм; (в) – кристалл и споры штамма LAT 006; негативное контрастирование; метка 1 мкм; (г) – спора и кристалл штамма *Bl* 16-92; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (д) – кристалл штамма LAT 006; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (е) – кристалл и споры штамма LAT 006; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (ж) – двойной кристалл штамма *Bl* 16-92; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (з) – спора и кристалл штамма *Bl* 16-92 в раздувающемся спорангии на фоне лизированных клеток; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (и) – лизис спорангия вокруг споры штамма *Bl* 16-92; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (к) – волокнистая капсула споры штамма *Bl* 16-92; ультратонкий срез; метка 1 мкм; (л) – кристалл и спора штамма LAT 006; ультратонкий срез; метка 1 мкм.

использованием простейших *Tetrahymena pyriformis* и *Entamoeba moshkovsky* приводит к повышению ларвицидной активности инкапсулированных бактерий (Zubasheva et al., 2011). Кристаллообра-

зование у *Bl* сопряжено со споруляцией (Смирнова, Азизбеян, 2002). Цитологические особенности *Bl* ранее не изучены, за исключением канозвидного включения. Основные фазы жизненного цикла

спорообразующих бактерий: вегетативный рост, спорообразование, созревание спор, прорастание. При споруляции образуются зрелые метаболически инертные споры, которые остаются длительное время в состоянии покоя.

Споры разных видов бацилл имеют в основном общий план строения (Leggett et al., 2012). Однако разные группы бацилл характеризуются своими особенностями структуры. Общими для спор являются споровая оболочка, наружная мембрана, кортекс, внутренняя мембрана, сердцевина.

Зрелые споры *Bt* имеют типичную структуру, видимую на срезах: споровую оболочку, кортекс, сердцевину, но лишены экзоспориума, имеющегося у *B. cereus-thuringiensis-anthraxis*. У *Bt* после поглощения проспоры материнской клеткой вокруг нее формируются новые структуры, характерные для зрелой споры. При этом происходит раздувание спорангия (рис. 2ж). Одновременно с созреванием споры происходит лизис цитоплазмы спорангия вокруг споры (рис. 2з). Цитоплазма заполняется нитевидными волокнами.

У *Bs* при спорообразовании наружную споровую оболочку окружает светлый ореол, заполненный фибриллярным материалом, вместо гранулярной цитоплазмы материнской клетки. Фибриллы прикрепляются к споровой оболочке, и спора окружается пушистой массой фибрилл. Эти фибриллы, предположительно, являются субъединицами оболочки, не включенными в процесс самосборки этой структуры (Holt et al., 1975).

У *Bt* избыточный споровый материал остается первоначально свободным, но впоследствии концентрируется около споры, образуя фибриллярную капсулу (рис. 2и). Эти фибриллы сходны с прикрепительными волокнами бацилл *Arthromitus*, кишечными симбионтами насекомых. *Arthromitus* прикрепляются волокнами к кишечному эпителию, растут нитевидно и образуют споры на своих дистальных концах. На тонких срезах *Arthromitus* из кишечника видно, что эндоспоры образуют прикрепительные волокна и сохраняют их при высвобождении из родительской клетки. Они обнаружены у новых изолятов *Arthromitus* из пищеварительного тракта клопов *Porcellio scaber*, тараканов *Gromphodrhina portentosa*, *Blaberus giganteus* и термитов *Cryptotermes brevis*, *Kaloterms flavicollis* (Margulis et al., 1998). Возможно, что фибриллярная капсула спор *Bt* также выполняет прикрепительную функцию. На рис. 2и представлена спора с фибриллярной капсулой. Каноэ появляется позже кристаллов в виде электронно-плотного ободка с одной стороны проспоры одновременно со споровой оболочкой. Электронно-плотный ободок контактирует с плотно прилегающим к нему более светлым слоем. В дальнейшем число параллельно уложенных электронно-плотных и электронно-прозрачных слоев каноэ умно-

жается. При этом они остаются связанными со споровой оболочкой. Во время прорастания споровая оболочка остается объединенной с каноэ.

Поверхность спор различных видов бацилл изучена посредством СЭМ и ТЭМ методами реплик, негативного контрастирования, ультратонких срезов. С помощью реплик исследована поверхность спор *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. sphaericus* (Bradley, Williams, 1957). С помощью СЭМ наблюдались гладкие споры у *B. subtilis* и слегка морщинистые из-за присутствия экзоспориума у *B. cereus-thuringiensis-anthraxis*. С помощью СЭМ у *B. polymyxa* показано наличие ребристой поверхности спор. Характерные ребра или гребни идут параллельно длинной оси споры. Методом ТЭМ на поперечных срезах эти гребни выявлены как выступы споровой оболочки числом от 6 до 9 (Murphy, Campbell, 1969). Аналогичные гребни обнаружены у *B. fastidiosus* и других бацилл (Leadbetter, Holt, 1968). Образование гребней размером от 30 до 60 нм, идущих вдоль всей поверхности спор, а также ряда более коротких (5–15 нм) обнаружено у спор *B. atrophaeus* (Sella et al., 2014). Изменение размера спор зарегистрировано с помощью оптической микроскопии для спор *Bt* в ответ на изменения относительной влажности (Westphal et al., 2003). Гребни появляются при уменьшении объема спор во время обезвоживания при созревании и исчезают, когда споры набухают во время прорастания и гидратации (Chada et al., 2003; Sella et al., 2014). Гребни обеспечивают достаточную гибкость оболочки, чтобы приспособиться к изменениям объема (Plomp et al., 2005). Не все споры имеют избыточные размеры оболочки, которые позволяют вмещать увеличенную при прорастании спору (Driks, 2003; Westphal et al., 2003). В формировании гребней участвуют белки споровой оболочки CotA и CotB. Открытие того, что размеры спор в естественных условиях меняются, позволяет предположить, что гибкость оболочки, вероятно, широко распространена среди спорообразующих бактерий (Sahin et al., 2012). Некоторые мутации, влияющие на сборку оболочки и прорастание, могут быть результатом неспособности сердцевин полностью гидратироваться из-за того, что оболочка мутантов не может приспособливаться к изменениям объема спор.

С помощью СЭМ мы провели сравнительное исследование поверхности спор штаммов *Bt* 16-92 и LAT 006. На рис. 1а, 1б представлены изображения спор штаммов *Bt* 16-92 и LAT 006 со складчатой поверхностью. Собственно спора погружена в каноэ. Оболочка штамма *Bt* 16-92 имеет глубокие складки, напоминающие гребни *B. polymyxa*. Складчатая поверхность спор штаммов *Bt* 16-92 и LAT 006 аналогична поверхности спор штамма *Bt* NRS590, активного против мух (De Andrade Pereira et al., 2022). У штамма LAT 006 гребни ме-

нее выражены. На продольных и поперечных срезах гребни зрелых спор *Bt* выглядят как выступы оболочки. Гребни спор *Bt* появляются в процессе обезвоживания при созревании споры, когда она сжимается. Они сглаживаются при прорастании и увеличении объема споры в процессе поглощения воды, что показано на срезах. Это подтверждает гибкость оболочки, реагирующей на переход споры от дегидратированного состояния к обводненному. При прорастании оболочка разрывается, и вегетативная клетка выходит из каное, как мы наблюдали ранее с помощью ТЭМ (Григорьева и др., 2003). На рис. 16 видно каное, сохранившее свою форму, но без собственно споры, которая, превратившись в вегетативную клетку, из него вышла.

Важное свойство *Bt* — антагонистическая активность в отношении макроорганизмов и микроорганизмов, которая подробно обсуждалась в данном обзоре. С использованием штамма *Bt* получен антибиотик латероцидин (Азизбекян и др., 2002). Антибактериальной активности кристаллоносного штамма *Bt* 16-92 посвящена специальная работа, показавшая, что этот штамм подавляет рост грамположительных спорообразующих и грамотрицательных бактерий (Орлова и др., 1995). Изучение ингибирующего фактора штамма *Bt* 16-92 показывает, что он является бактериоцином, который назван нами латероцином. Электронная микроскопия культуральной жидкости штамма *Bt* 16-92 показывает наличие структур, подобных фаговым отросткам, что позволяет отнести их к тайлоцинам. Выявлены чехлы фаговых отростков, растянутые и сокращенные отростки, фаговые головки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре суммированы данные по *Brevibacillus laterosporus* — мало изученному, но перспективному виду бацилл. *Brevibacillus laterosporus* обладает способностью к продукции инсектицидов, антибиотиков, бактериоцинов, а также антагонистической активностью в отношении насекомых, микроорганизмов, ряда беспозвоночных. Особенно важной является mosquitoцидная активность *Bt*. В настоящее время для производства препаратов против насекомых отряда двукрылых используются энтомопатогенные бациллы *Bt* и *Bs*. Однако они имеют ряд недостатков. Обнаружение штаммов *Bt* с кристаллами, токсичными для комаров, делает их перспективными для производства инсектицидов, отличных от полученных на основе *Bt* и *Bs*.

Особенность *Bt* — наличие каноевидного включения, прикрепленного к споре. Это включение связано со споровой оболочкой. В каное сосредоточены инсектицидные факторы (Marche et al., 2017). Поглощение насекомыми одновременно спор и токсинов, локализованных на поверхности споры в каное, рассматривается как преимущество

Bt, по сравнению с *Bt*, так как полное инсектицидное действие *Bt* зависит от случайного совместного проглатывания спор и свободных кристаллов токсина (Ruiu et al., 2014). Споры *Bt*, обеспечивающие свойства вида, несут на себе и инсектицид. У кристаллоносных штаммов *Bt* их инсектицидный эффект за счет каное усиливается благодаря кристаллам, подобным *Bt*. *Bt* обладают также активностью против микроорганизмов. Показано антибактериальное действие *Bt* в отношении лекарственно-устойчивых бактерий. *Bt* подавляет рост как спорообразующих, так и грамотрицательных бактерий. Изучение ингибирующих факторов показывает, что в их состав входит бактериоцин, названный нами латероцином. Установлено также, что *Bt* подавляет рост различных фитопатогенных грибов и воздействует на синезеленые водоросли. Эти свойства делают *Bt* ценным источником бактерицидных препаратов. Высокий биоцидный эффект (антибактериальный, фунгицидный, цианолитический) позволяет использовать эти штаммы в качестве продуцентов препаратов с множественной биологической активностью. С использованием штамма *Bt* получен антибиотик латероцидин (Азизбекян и др., 2002). Штамм *Bt* нашел применение как фунгицид для защиты картофеля от фитопатогенов (Азизбекян и др., 2003). Антагонистические свойства *Bt* позволили использовать его в качестве пробиотика. На основе *Bt* производится коммерческий препарат Flora-Balance, BOD (NOW Foods, USA) (Hong et al., 2005).

Таким образом, бациллы *Bt* с их широким спектром биологической активности могут использоваться в качестве средства биологической борьбы с различными вредителями. Одно из важнейших свойств *Bt* — отсутствие патогенности по отношению к нецелевым объектам. Применению *Bt* в различных областях биотехнологии препятствует недостаточная изученность и трудность работы с бактериальными препаратами, по сравнению с химическими.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТРАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Азизбекян Р.Р., Овчинникова Т.В., Шамшина Т.Н. и др. Циклодекапептидный антибиотик широкого спектра антагонистического действия латероци-

- дин, штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, обладающий широким спектром антагонистического действия, — продуцент антибиотика латероцидина. Патент на изобретение RU 2229520. 05.11.2002.
- Азизбекян Р.Р., Смирнова Т.А., Николаенко М.А. и др. Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, обладающий широким спектром фунгицидного действия, и биологический препарат для защиты клубней картофеля от грибных заболеваний в период хранения на основе биомассы этого штамма. Патент на изобретение RU 2242125. 12.03.2003.
- Григорьева Т.М., Смирнова Т.А., Николаенко М.А., Азизбекян Р.Р. Факторы прорастания спор штамма *Brevibacillus laterosporus* // Биотехнология. 2003. Т. 6. С. 30–37.
- Зубашева М., Сагитова А., Смирнов Ю. и др. Ультраструктурный анализ *Brevibacillus laterosporus* методами электронной и атомно-силовой микроскопии // Наноиндустрия. 2017. Т. 72 (2). С. 74–78.
- Зубашева М.В., Смирнов Ю.А., Смирнова Т.А. и др. Наноструктура белковых кристаллов бактерий *Brevibacillus laterosporus* // Наноиндустрия. 2020. Т. 13 (2). С. 126–131.
- Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Николаенко М.А. и др. Альгицидная активность штамма *Brevibacillus laterosporus* // Биотехнология. 2006. Т. 4. С. 45–49.
- Орлова М.В., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н. и др. Антибактериальная активность *Bacillus laterosporus* // Биотехнология. 1995. № 1–2. С. 22–26.
- Смирнова Т.А., Азизбекян Р.Р. Спорообразование и кристаллообразование у *Brevibacillus laterosporus* // Биотехнология. 2002. Т. 5. С. 8–13.
- Смирнова Т.А., Михайлов А.М., Тюрин В.С., Азизбекян Р.Р. Ультраструктура спор и кристаллов бактерии различных серотипов *Bac. thuringiensis* // Микробиология. 1984. Т. 53 (3). С. 455–462.
- Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus* // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 129. P. 17–20.
- Barbieri G., Ferrari C., Mamberti S. et al. Identification of a novel *Brevibacillus laterosporus* strain with insecticidal activity against *Aedes albopictus* Larvae // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 624014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.624014>
- Baumann P., Clark M.A., Baumann L., Broadwell A.H. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins // Microbiol. Rev. 1991. V. 55 (3). P. 425–436.
- Benedict M.Q., Levine R.S., Hawley W.A., Lounibos L.P. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus* // Vect. Borne Zoon. Dis. 2007. V. 7. P. 76–85.
- Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins // Toxins (Basel). 2014. V. 6. P. 1222–1243.
- Bradley D.E., Williams D.J. An electron microscope study of the spores of some species of the genus *Bacillus* using carbon replicas // J. Gen. Microbiol. 1957. V. 17. P. 75–79.
- Bravo A., Gill S.S., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control // Toxicon. 2007. V. 49 (4). P. 423–435.
- Bulla L.A., Costilow R.N. Jr., Sharpe E.S. Biology of *Bacillus popilliae* // Adv. Appl. Microbiol. 1978. V. 23. P. 1–18.
- Chada V.G.R., Sanstad E.A., Wang R., Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces // J. Bacteriol. 2003. V. 185 (21). P. 6255–6261.
- Claus D., Berkeley R.C.W. Genus *Bacillus* Cohn. 1872 // Bergey's Manual of systematic bacteriology. V. 2 / Eds P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. Baltimore: Will. Wilk. Co., 1986. P. 1105–1139.
- De Andrade Pereira L., De Carvalho Queiroz M.M., Côrte-Real Faria S., Zahner V. Ultrastructural and pathogenicity of *Brevibacillus laterosporus* against synanthropic muscoid dipterans // Microsc. Res. Tech. 2022. V. 85 (1). P. 149–155. <https://doi.org/10.1002/jemt.23891>
- De Oliveira E.J., Rabinovitch L., Monnerat R.G. et al. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 6657–6664.
- Driks A. The dynamic spore // PNAS USA. 2003. V. 100 (6). P. 3007–3009.
- Du J., Knowles B.H., Li J., Ellar D.J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid's bilayer // Biochem. J. 1999. V. 338. P. 185–193.
- Favret M.E., Yousten A.A. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus* // J. Invertebr. Pathol. 1985. V. 45. P. 195–203.
- Favret M.E., Yousten A.A. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* // J. Invertebr. Pathol. 1989. V. 53. P. 206–216.
- Federici B.A., Park H.-W., Bideshi D.K. et al. Recombinant bacteria for mosquito control // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. P. 3877–3885.
- Fitz-James P.C., Young I.E. Morphological and chemical studies of the spores and parasporal bodies of *Bacillus laterosporus* // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958. V. 4 (5). P. 639–649.
- Fitz-James P.C., Gillespie J.B., Loewy D. A surface net on parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* // J. Invertebr. Pathol. 1984. V. 43 (1). P. 47–58.
- Garcia-Ramon D.C., Molina C.A., Osuna A., Vilchez S. An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100 (8). P. 3637–3654. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7259>
- Goldberg L., Margalit J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* // Mosq. News. 1977. V. 37. P. 355–358.
- Goldman I.F., Arnold J., Carlton B.C. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti* // J. Invertebr. Pathol. 1986. V. 47. P. 317–324.
- Guo G., Zhang L., Zhou Z. et al. A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of *Bacillus thuringiensis* // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 282 (1). P. 1–7.
- Hannay C.L. The parasporal body of *Bacillus laterosporus* Laubach // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957. V. 3. P. 1001–1010.

- Holt S.C., Gauthier J.J., Tipper D.J. Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus* // J. Bacteriol. 1975. V. 122 (3). P. 1322–1338.
- Hong H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29 (4). P. 813–835.
- Insell J.P., Fitz-James P.C. Composition and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 50 (1). P. 56–62. <https://doi.org/10.1128/aem.50.1.56-62.1985>
- Kalfon A., Charles J.F., Bourgouin C., De Barjac H. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae // J. Gen. Microbiol. 1984. V. 130. P. 893–900.
- Laubach A.C. Spore-bearing bacteria in water // J. Bacteriol. 1916. V. 1. P. 505–512.
- Leadbetter E.R., Holt S.C. The fine structure of *Bacillus fastidious* // J. Gen. Microbiol. 1968. V. 52. P. 299–307.
- Leggett M.J., McDonnell G., Denyer S.P. et al. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 113. P. 485–498.
- Lertcanawanichakul M., Chawawisit K. Bacteriocin-like protein produced *Brevibacillus laterosporus* that can inhibit the growth of drug resistant bacteria // Int. J. Pharm. Sci. Dev. Res. 2020. V. 6 (1). P. 012–015.
- Li Y., Jiao Y., Shi J. et al. BLB8, an antiviral protein from *Brevibacillus laterosporus* strain B8, inhibits Tobacco mosaic virus infection by triggering immune response in tobacco // Pest Manag. Sci. 2021. V. 77 (10). P. 4383–4392. <https://doi.org/10.1002/ps.6472>
- Maghsoudi S., Jalali E. Noble UV protective agent for *Bacillus thuringiensis* based on a combination of graphene oxide and olive oil // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 11019. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11080-9>
- Marche M.G., Mura M.E., Falchi G., Rui L. Spore surface proteins of *Brevibacillus laterosporus* are involved in insect pathogenesis // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 43805. <https://doi.org/10.1038/srep43805>
- Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S. et al. The arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals // PNAS USA. 1998. V. 95 (3). P. 1236–1241.
- McCray A.H. Spore-forming bacteria in the apiary // J. Agric. Res. 1917. V. 8. P. 399–420.
- Mei X., Xu K., Yang L. et al. The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon Tncs in emetic *Bacillus weihenstephanensis* // BMC Microbiol. 2014. V. 14. P. 2–11.
- Miljkovic M., Jovanovic S., O'Connor P.M. et al. *Brevibacillus laterosporus* strains BGSP7, BGSP9 and BGSP11 isolated from silage produce broad spectrum multi-antimicrobials // PLoS One. 2019. V. 14 (5). P. e0216773.
- Montaldi F.A., Roth I.L. Parasporal bodies of *Bacillus laterosporus* Sporangia // J. Bacteriol. 1990. V. 172 (4). P. 2168–2171.
- Murphy J.A., Campbell L.L. Surface features of *Bacillus polymyxa* spores as revealed by scanning electron microscopy // J. Bacteriol. 1969. V. 98 (2). P. 737–743.
- Orlova M.V., Smirnova T.A., Ganushkina L.A. et al. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64 (7). P. 2723–2725.
- Palma L., Muñoz D., Berry C. et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity // Toxins (Basel). 2014. V. 6. P. 3296–3325.
- Park H.-W., Bideshi D.K., Federici B.A. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus* // J. Asia Pac. Entomol. 2010. V. 13 (3). P. 159–168.
- Plomp M., Leighton T.J., Wheeler K.E., Malkin A.J. The high-resolution architecture and structural dynamics of *Bacillus* spores // Biophys. J. 2005. V. 88 (1). P. 603–608.
- Prasanna L., Eijsink V.G.H., Meadow R., Gåseidnes S. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97 (4). P. 1601–1611.
- Rameshkumar N., Govindarajan R.K., Krishnan M., Kayalvizhi N. Scope of bacteriocins as a viable alternative to the traditional antibiotics // Adv. Plants Agric. Res. 2016. V. 5 (2). P. 504–506.
- Rivers D.B., Vann C.N., Zimmack H.L., Dean D.H. Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus* // J. Invertebr. Pathol. 1991. V. 58. P. 444–447.
- Rubikas J., Androsiuniene D., Chestukhina G. et al. Crystal protein formed by *Bacillus subtilis* cells // J. Bacteriol. 1987. V. 169 (11). P. 5258–5262.
- Rui L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species // Insects. 2013. V. 4 (3). P. 476–492.
- Rui L., Floris I., Satta A., Ellar D.J. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti* // Biol. Contr. 2007. V. 43 (1). P. 136–143.
- Rui L., Satta A., Floris I. Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion // J. Invertebr. Pathol. 2012. V. 111. P. 211–216.
- Rui L., Satta A., Floris I. Administration of *Brevibacillus laterosporus* spores as a poultry feed additive to inhibit house fly development in feces: a new eco-sustainable concept // Poult. Sci. 2014. V. 93 (3). P. 519–526.
- Sahin O., Yong E.H., Driks A., Mahadevan L. Physical basis for the adaptive flexibility of *Bacillus* spore coats // J. R. Soc. Interface. 2012. V. 9 (76). P. 3156–3160.
- Salazar-Marroquín E.L., Galán-Wong L.J., Moreno-Medina V.R. et al. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications // Rev. Med. Microbiol. 2016. V. 27 (3). P. 95–101.
- Schnepf E., Crickmore N., van Rie J. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62 (3). P. 775–806.
- Scholl D. Phage tail-like bacteriocins // Annu. Rev. Virol. 2017. V. 4. P. 453–467.
- Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinobacillus* gen. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 939–946.
- Shoji J., Sakazaki R., Wakisaka Y. et al. Isolation of a new antibiotic, Laterosporamine. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XIV // J. Antibiot. 1976. V. 29 (4). P. 390–393.
- Sella S.R.B.R., Vandenberghe L.P.S., Soccol C.R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus* // Microbiol. Res. 2014. V. 169. P. 931–939.
- Singer S. Potential of *Bacillus sphaericus* and related spore-forming bacteria for pest control // Microbial control of pests and plant diseases / Ed. M.D. Burges. N.Y.: Acad. Press, 1981. P. 283–292.

- Smirnov W.A. A staining method for differentiating spores, crystals, and cells of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) // J. Insect Pathol. 1962. V. 4 (3). P. 384–386.
- Smirnova T.A., Minenkova I.B., Orlova M.V. et al. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus* // Res. Microbiol. 1996. V. 147 (5). P. 343–350.
- Somsap O., Lertcanawanichakul M. Characteristic, and the mode of action of bacteriocin produced by *Brevibacillus laterosporus* SA14 which isolated from the air // Int. J. Agricult. Technol. 2013. V. 9 (5). P. 1319–1331.
- Steinhaus E.A. An orientation with respect to members of the genus *Bacillus* pathogenic for insects // Bacteriol. Rev. 1946. V. 10. P. 51–61.
- Takeuchi T. Spargualin a novel antitumor antibiotic produced by *Bacillus laterosporus* // Gan to Kagaku Ryoho. 1984. V. 11. P. 2633–2639.
- Tian B., Yang J., Lian L. et al. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 372–380.
- Umezawa K., Takeuchi T. Spargualin: a new antitumor antibiotic // Biomed. Pharmacother. 1987. V. 41 (5). P. 227–232.
- Westphal A.J., Price P.B., Leighton T.J., Wheeler K.E. Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity // PNAS USA. 2003. V. 100 (6). P. 3461–3466.
- Wirth M.C., Yang Y., Walton W.E. et al. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73 (19). P. 6066–6071.
- White G.F. The cause of European foul brood. Washington: Depart. Agricult., 1912. P. 1–15.
- White G.F. European foulbrood // US Depart. Agricult. Bull. 1920. V. 810. P. 1–39.
- Yan M., Roehrl M.H., Wang J.Y. Discovery of crystalline inclusions in *Bacillus licheniformis* that resemble parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* // Can. J. Microbiol. 2007. V. 53 (9). P. 1111–1115.
- Zhao X., Wang X., Shukla R. et al. Brevibacillin 2V, a novel antimicrobial lipopeptide with an exceptionally low hemolytic activity // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.693725>
- Zimina M., Babich O., Prosekov A. et al. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins // Antibiotics. 2020. V. 9. P. 553. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553>
- Zubasheva M.V., Ganushkina L.A., Smirnova T.A., Azizbekyan R.R. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 755–762.
- Zubasheva M.V., Ganushkina L.A., Smirnova T.A., Azizbekyan R.R. Enhancement of larvicidal activity of *Brevibacillus laterosporus* by bioencapsulation in Protozoa *Tetrahymena pyriformis* and *Entamoeba moshkovskii* // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 762–766.

Brevibacillus laterosporus as a Biological Control Agent

T. A. Smirnova^a, M. V. Zubasheva^{a, *}, N. V. Shevlyagina^a, Y. A. Smirnov^a, and V. G. Zhukhovitsky^{a, b}

^aGamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

^bRussian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia

*e-mail: mzubasheva@mail.ru

The article analyzes and summarizes the literary and own results of studies of the properties of *Brevibacillus laterosporus* (*Bl*) as an agent of biocontrol of insects, microorganisms, invertebrates. The review provides data on the morphology and characteristics of the biological properties of *Bl*. New crystal-bearing strains were reported. The structural features of spores and *Bl* crystals identified by electron microscopy are discussed. Data on crystal formation in different bacilli are analyzed. *Bl* crystals have mosquitocidal activity. Data on the antimicrobial properties of *Bl*, including the activity of *Bl* against drug-resistant bacteria, are presented. The antimicrobial, fungicidal and cyanolytic activities of *Bl* strains make it possible to use them as producers of insecticides, antibiotics, bacteriocins and as environmentally friendly bacterial agents of biocontrol.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*, biological activity, bacterial biocontrol agents, insecticides, antibiotics, bacteriocins