

ЗУБАШЕВА Маргарита Владимировна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *BREVIBACILLUS LATEROSPORUS*
И ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Специальность 03.02.03. – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2012

Работа выполнена в лаборатории биологически активных соединений ФГУП Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Руководитель лаборатории – доктор биологических наук, профессор Азизбеян Рудольф Рубенович.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **Азизбеян Рудольф Рубенович**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор **Цыганков Юрий Дмитриевич**
ФГУП ГосНИИ генетика, заведующий лабораторией метилотрофных бактерий

кандидат биологических наук
Данилова Ирина Валентиновна
МГУ имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет, кафедра
микробиологии, старший научный
сотрудник.

Ведущая организация – **Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН**

Защита диссертации состоится «29» мая 2012 г. в «15.30» часов на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, корп. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «_____» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д.501.001.21, к.б.н.



Пискункова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы в связи с бурным развитием биотехнологии и задачами обеспечения экологических условий жизни и производства усиливается интерес к спорообразующим бактериям. Главными объектами фундаментальных и прикладных исследований на протяжении многих лет были бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*. Штаммы *B. subtilis* используются как продуценты ферментов и как пробиотики, бактерии *B. thuringiensis* являются практически уникальными продуцентами биологических средств защиты растений. Между тем, исследования последних лет свидетельствуют, что имеются бациллы, обладающие рядом ценных в прикладном смысле характеристик. Среди них важное место занимают бактерии *Brevibacillus laterosporus* (прежнее название - *Bacillus laterosporus*). Показано, что бациллы *B. laterosporus* (BL) способны к синтезу инсектицидных факторов, ферментов, продуцируют целый спектр антагонистических факторов, в том числе, обладающих антибактериальным эффектом, фунгицидной и цианолитической активностями, их применяют в качестве эффективных пробиотиков.

Одной из актуальных задач биотехнологии и экологии является развитие эффективных и экологически безопасных биологических методов борьбы с вредными насекомыми отряда *Diptera*. Биологические методы борьбы включают использование в качестве промышленных продуцентов биоинсектицидов энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* и *Bacillus sphaericus*, характеризующихся избирательностью mosquitoцидного действия. Основными факторами патогенности этих бактерий являются кристаллические и не кристаллические токсины белковой природы. Однако, существующие в настоящее время препараты на основе *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* не полностью перекрывают спектр вредных насекомых. Отсутствие штаммов с более широким спектром энтомоцидного действия и развивающаяся устойчивость в популяциях целевых насекомых к действию некоторых бактериальных препаратов диктует поиск новых видов бактерий-продуцентов инсектицидных токсинов, отличающихся по структуре и способу действия от известных.

В отличие от хорошо изученных энтомопатогенных видов *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* и *B. sphaericus* энтомоцидные свойства и другие биологические особенности *B. laterosporus* изучены недостаточно. Это препятствует созданию инсектицидных препаратов на основе данного вида бактерий, а также широкому использованию *B. laterosporus* в различных областях биотехнологии. Вместе с тем, ограниченные сведения о наличии у *B. laterosporus* токсичности по отношению к личинкам комаров *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* и *Culex pipiens* и другим представителям *Diptera* позволяет считать вид *B. laterosporus* потенциальным кандидатом для биологической борьбы с двукрылыми насекомыми-вредителями.

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы являлось изучение инсектицидных и антагонистических свойств штаммов *B. laterosporus* и характеристика факторов их биоцидной активности. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести скрининг коллекции штаммов *B. laterosporus*, выделенных из различных географических областей с целью поиска кристаллоносных штаммов;
- дать физиолого-биохимическую характеристику исследуемых штаммов *B. laterosporus*;
- охарактеризовать морфологические особенности штаммов *B. laterosporus*;
- определить спектр и оценить уровень инсектицидной активности исследуемых штаммов *B. laterosporus* с использованием личинок насекомых, представителей отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera* и *Diptera*;
- подобрать условия для эффективного споро- и кристаллообразования штаммов *B. laterosporus*;
- выделить и охарактеризовать свойства ларвицидных кристаллов штаммов *B. laterosporus*: определить уровень активности, молекулярный вес белков;
- изучить возможность усиления ларвицидного действия эндотоксинов (спор и кристаллов) *B. laterosporus* с использованием простейших *Tetrahymena pyriformis* и *Entamoeba moshkovskii*
- оценить биоцидную активность (антибактериальную, фунгицидную, цианолитическую) штаммов *B. laterosporus* на микроорганизмах разных таксономических групп;
- оценить гемолитическую активность штаммов *B. laterosporus*.

Научная новизна работы:

- впервые выделены четыре кристаллообразующих штамма *B. laterosporus*, активные в отношении личинок комаров разных видов, охарактеризованы их физиолого-биохимические свойства и свойства кристаллов этих штаммов. Установлено, что кристаллические включения *B. laterosporus* различаются по форме и размерам;
- подобраны условия споро- и кристаллообразования штаммов *B. laterosporus*, обеспечивающие максимальный выход целевого продукта (продуктивность, образование спор, образование кристаллов, уровень ларвицидной активности);
- показано, что штаммы *B. laterosporus* специфически активны для личинок различных видов двукрылых. Установлено, что нативная культуральная жидкость кристаллообразующих штаммов *B. laterosporus*, а также осадок, содержащий споры и кристаллы, обладают ларвицидной активностью против комаров *An. stephensi* и *Ae. aegypti*;
- установлена белковая природа кристаллов. Показано, что кристаллы являются монокомпонентными системами, содержащими белки от 68 кДа до 130 кДа;
- разработаны оптимальные условия биоинкапсуляции эндотоксинов *B. laterosporus* с использованием простейших *T. pyriformis* и *E. moshkovskii*. Показано увеличение ларвицидного эффекта бактерий: снижение эффективных концентраций и сокращение времени гибели 50% личинок комаров *An. stephensi* по сравнению с не инкапсулированными факторами *B. laterosporus*. Установлено, что фракции очищенных спор и кристаллов, а также исходной спорокристаллической массы LAT 006 не оказывают токсического действия на клетки простейших;

- показано, что большинство исследованных штаммов *B. laterosporus* продуцируют вещества типа бактериоцинов, антибактериальное действие которых проявляется в отношении представителей этого же вида бактерий. Электронно-микроскопическое исследование очищенных препаратов бактериоцинов показало, что все они содержат частицы, напоминающие по морфологии структурные элементы бактериофагов;
- из культуры штамма *B. laterosporus* BL 16-52 выделен комплекс антибиотиков, определены спектр антагонистической активности и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) выделенных антибиотиков;
- установлено, что большинство исследованных штаммов *B. laterosporus* проявляет гемолитическую активность против эритроцитов разных видов (крысы и человека). Показано, что осмопротектанты с гидродинамическим радиусом молекул более 2 нм ингибируют лизис эритроцитов человека (5 %), вызываемый действием гемолизинов *B. laterosporus*. Это косвенно указывает на порообразующие свойства гемолизинов *B. laterosporus*.

Практическая значимость работы:

- выделены кристаллообразующие штаммы *B. laterosporus*, активные против личинок комаров;
- высокий уровень ларвицидной активности кристаллов штамма *B. laterosporus* LAT 006 для комаров *Ae. aegypti* и *An. stephensi* (LC_{50} 3,0 нг/мл и 5,0 нг/мл, соответственно), сопоставимый с активностью высокотоксичных штаммов *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*, позволяет рекомендовать *B. laterosporus* в качестве продуцента биологических инсектицидов;
- разработаны условия биоинкапсуляции эндотоксинов *B. laterosporus* простейшими *T. pyriformis* и *E. moshkovskii*, которые могут быть использованы для повышения эффективности инсектицидов, создаваемых на основе *B. laterosporus* и других видов бактерий;
- высокий биоцидный эффект (антибактериальный, фунгицидный, цианолитический) позволяет рекомендовать штаммы *B. laterosporus* в качестве продуцентов биологических средств защиты растений от болезней и борьбы с токсическими микроскопическими водорослями (сине-зелеными бактериями).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части (пяти глав собственных исследований и обсуждения результатов), заключения и выводов. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, включает 25 таблиц и 20 рисунков. Библиография состоит из 200 наименований.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены и доложены на IV-ой конференции молодых ученых «Новые направления биотехнологии» (Пушино-на-Оке, 1994), 9-ой конференции ГосНИИ генетика (Москва, 1995), 10-ой Международной конференции по глобальным аспектам прикладной микробиологии и биотехнологии (Эльсинор, Дания, 1995), 11-ой конференции ГосНИИ генетика (Москва, 1997), на 1-ой Международной школе-семинаре «Кровососущие насекомые-переносчики трансмиссивных заболеваний»

и проблемы генетической безопасности» (Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (Москва, 2002).

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.б.н., проф. Азизбеяну Р. Р. за внимание и помощь при проведении работы и подготовке рукописи диссертационной работы. Искреннюю признательность автор приносит всем сотрудникам лаборатории биологически активных соединений ФГУП ГосНИИ генетика за помощь в освоении методик, содействие в процессе работы и дружескую поддержку. Автор выражает особую признательность д.б.н. Смирновой Т. А (ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), д.б.н., проф. Ганушкиной Л. А. (ИМПитМ им. Е. И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова), д.б.н., проф. Овчинниковой Т.В. (ИБХ РАН), д.м.н. Диденко Л.В. (ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), к.б.н. Залунину И.А. (ФГУП ГосНИИ генетика) за помощь на отдельных этапах работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе исследовали пять штаммов *B. laterosporus* VL 16-92, VL 16-13, VL 16-931, VL 16-932, VL 16-52, выделенные в лаборатории биологически активных соединений ГосНИИ генетика из природных образцов (почвы, погибших насекомых) на селективных средах с полимиксином (100 мкг/мл) (Смирнова и др., 1993) и одиннадцать штаммов *B. laterosporus* LAT 001-011, полученные из коллекции энтомопатогенных бактерий ИЕВС (Институт Пастера, Париж).

Питательные среды. Для поддержания и выращивания чистых культур штаммов *B. laterosporus* использовали агаризованную среду NBY. Для исследования морфологических особенностей штаммы *B. laterosporus* выращивали на среде Хоттингера. Рост, споро- и кристаллообразование и уровень ларвицидной активности штаммов *B. laterosporus* оценивали на жидких и плотных (1,8% агар «Difco») средах: Хоттингера, ДПС, картофельно-сахарозной, J-среде для капризных энтомопатогенных бактерий, богатой органической среде Luria-Bertani (LB), среде NB, синтетической среде Никкерсона и Буллы с добавлением ростовых факторов тиамина (10 мкг/мл) и L-метионина (20 мкг/мл), среде NBYS, полноценной среде ВР для энтомопатогенных бактерий (Lecadet, 1980), питательных средах на основе NBY с добавлением различных солей, глюкозы (1%) и ростовых факторов: тиамина (10 мкг/мл) и метионина (20 мкг/мл).

В биохимических тестах использовали дифференциально-диагностические среды для представителей рода *Bacillus*.

Для оценки антибактериальной активности штаммы *B. laterosporus* культивировали в жидкой среде NBY. Для оценки фунгицидной активности штаммы *B. laterosporus* выращивали в жидкой среде ДПС. Фитопатогенные грибы выращивали на агаризованной картофельно-сахарозной среде (сахароза – 2,0%, картофельный отвар – до 1 л, pH 7,0). Дрожжи *C. albicans* и *S. cerevisiae* выращивали на богатой среде Сабуро (пептон – 1 %, мальтоза – 4 %, агар – 2 %, вода до 1 л, pH

5,6). Для качественной оценки гемолитической активности штаммов *B. laterosporus* использовали кровяной агар, приготовленный на основе кровяной агаровой среды ("Difco") с добавлением 5% (по объему) стерильной дефибринированной крови человека.

Условия культивирования. В жидких питательных средах культуры штаммов *B. laterosporus* и тест-микроорганизмов выращивали от 8 до 96 ч в зависимости от целей эксперимента. Температура инкубации составляла: для *B. laterosporus* – 30-37°C, для других видов бацилл – 28-30°C, для фитопатогенных бактерий родов *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* – 30°C, для бактерий родов *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* – 37°C. Фитопатогенные грибы родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* выращивали при 37°C. Дрожжи выращивали при 32°C. На плотных питательных средах штаммы *B. laterosporus* культивировали при 30°C или 37°C в течение 18-120 ч в зависимости от целей эксперимента.

Для приготовления препаратов спор культуры штаммов *B. laterosporus* засеивали на агар Хоттингера и инкубировали 5 суток при 37°C. Завершение споро- и кристаллообразования контролировали с помощью светового микроскопа. Материал смывали стерильной дистиллированной водой, отмывали три раза и после прогревания при 80°C 30 мин споры хранили в дистиллированной воде при 4°C.

В качестве посевного материала использовали споровые суспензии штаммов *B. laterosporus* (ОП₅₄₀ = 1,0 ед.), приготовленные в стерильной дистиллированной воде. Для получения синхронных культур *B. laterosporus* жидкие питательные среды засеивали посевным материалом, предварительно прогретым при температуре 75°C в течение 15 мин. Конечная концентрация посевного материала в среде составляла 0,1 ед. ОП₅₄₀.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) и жизнеспособных спор в 1 мл исследуемого образца определяли по стандартным методикам.

Фракции культурального супернатанта и клеток получали по стандартным методикам.

Антагонистическую активность образцов исследуемых штаммов определяли методом капель с нанесением верхнего агара и методом диффузии из лунок в агаре с использованием набора тест-организмов: родственных и таксономически отдаленных бактерий, фитопатогенных бактерий и грибов. Для анализа антагонистической активности использовали культуральную жидкость штаммов *B. laterosporus*, содержащую 1-4x10⁷ кл/мл. Эффективность антагонистического действия исследованных штаммов *B. laterosporus* определяли по диаметру зон отсутствия роста тест-микроорганизмов вокруг лунки в агаре или на газоне. В качестве единицы активности принимали диаметр зоны отсутствия роста бактерий вокруг лунки, равный 1 мм, и грибов, равный 4÷6 мм.

Выявление антагонистической активности *B. laterosporus* при совместном культивировании осуществляли, как описано (Gram et al., 1999) с использованием штаммов BL 16-52 и *B. cereus* 569 Str^f.

Очистка антибактериального фактора в градиенте плотности хлористого цезия. Выделение и очистку антибактериальных факторов *B. laterosporus* осуществляли из супернатантов 48-ч бульонных культур штаммов LAT 002, LAT 003, LAT 004, LAT 006, BL 16-92, BL 16-13, BL 16-932 и BL 16-52 в преформированном градиенте плотности хлористого цезия (ρ 1,33; 1,4; 1,5 и 1,6 г/см³) при 120000 g, 2,5 ч и 4°C на ультрацентрифуге High Speed-25 бакет-ротор SW-41. Образованные в градиенте плотности CsCl видимые полосы диализовали против фагового буфера (pH 7,2). В образцах полос определяли антибактериальную активность методом капель и проводили электронно-микроскопический анализ структурированных элементов.

Светооптическое и электронно-микроскопическое исследования. Для световой микроскопии образцы окрашивали по методу Смирнова (1962). Электронно-микроскопическое исследование проводили методами трансмиссивной и сканирующей микроскопии. Клетки, споры и кристаллы исследовали в ТЭМ методами негативного контрастирования и ультратонких срезов. Изучение структурированных элементов, очищенных в градиенте плотности CsCl проводили методом негативного контрастирования. Для негативного контрастирования образцы наносили на сетки, покрытые формваровой пленкой и окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата. Ультратонкие срезы готовили по стандартной методике, описанной Смирновой с соав. (1993). Микроскопию всех образцов проводили на электронном микроскопе JEM-100 B (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кV.

Нативные споры и кристаллы исследовали в электронно-ионном сканирующем микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company, USA). Образцы нативных спор и кристаллов помещали на кремниевую подложку, которую с помощью углеродного скотча фиксировали к алюминиевым столикам. Все препараты исследовали в режиме низкого и высокого вакуума, в отдельных случаях напыляли золотом (4 нм). Поверхность образцов сканировали при ускоряющем напряжении 5-30 кV.

Чувствительность антибактериальных факторов к протеолитическим ферментам и нагреванию. Сконцентрированные и очищенные антибактериальные факторы штаммов *B. laterosporus* инкубировали с трипсином (1 мг/мл) или проназой (1 мг/мл) при 37°C, pH 8,0 в течение 18 ч. Нагревание концентрата проводили при 100°C в течение 5 мин.

Выделение и очистка пептидных антибиотиков. Комплекс антибиотиков, состоящий из трех пептидов, был выделен из 48 ч бульонной культуры штамма *B. laterosporus* BL 16-52. **Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК)** выделенных антибиотиков определяли стандартным методом серийных двукратных разведений исходного раствора антибиотика.

Очистка кристаллических белков *B. laterosporus*. Очищение кристаллов *B. laterosporus* проводили путем центрифугирования споро-кристаллической суспензии в нелинейном градиенте плотности 20, 30, 40 и 50%-ного бромида натрия (150000 g, 2 ч, +4°C). Полученные фракции отмывали от бромида натрия трехкратным центрифугированием (15000 g, 15 мин) в дистиллированной воде, ресуспендировали в исходном объеме дистиллированной воды и

микроскопировали. Степень очистки кристаллов от спор контролировали фазово-контрастной микроскопией мазков, окрашенных по методу Смирнова (1962).

Для определения молекулярных масс белков, входящих в состав кристаллов очищенные кристаллы штаммов *B. laterosporus* анализировали с помощью различных дезагрегирующих агентов. Предварительно кристаллы отмывали от протеиназ в 1 М NaCl в течение 30 мин при 20⁰ С. Растворение кристаллов штаммов *B. laterosporus* проводили: 1) при одновременном воздействии на них денатурирующих и восстанавливающих агентов, в частности 8 М мочевины и 0,01 М дитиозритрита, рН 8,5 при нагревании до 100⁰ С в течение 5 мин; 2) в сильно щелочной среде (рН 12 и выше): в 0,01 М NaOH при рН 12,5 в течение 60 мин.

Концентрацию белка в образцах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Serva). **Электрофорез белков** в присутствии додецилсульфата натрия проводили в плоском слое полиакриламидного геля 7,5 % по Лэммли.

Инсектицидную активность исследованных образцов оценивали на личинках комаров видов *An. stephensi* (Liston), *Ae. aegypti* (L.) и *Cx. pipiens* (L.), непарного шелкопряда *Lymanthria dispar* и колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* по стандартным методикам биотестирования бактериальных штаммов на насекомых.

Антипротозойную активность образцов оценивали на клетках инфузории *T. pyriformis* и амебы *E. moshkovskii* по стандартным методикам биотестирования бактериальных штаммов на простейших.

Для биоинкапсуляции эндотоксинов (спор и кристаллов) *B. laterosporus* простейшими *T. pyriformis* и *E. moshkovskii* рассчитывали LC₅₀ (концентрацию образца, вызывающую гибель 50% личинок) и LT₅₀ (время, в течение которого гибель личинок достигает 50%). Величину LT₅₀ использовали для оценки скорости гибели личинок комаров до и после контакта с инкапсулированными и не инкапсулированными образцами *B. laterosporus*.

Для определения цианолитической активности использовали штаммы азотфиксирующих нитчатых микроскопических водорослей: *Anabaena* sp. 5781, *Nostoc* sp. A-10, штаммы нефиксирующих азот одноклеточных микроводорослей *Microcystis aeruginosa* 562 и 905. Цианолитическую активность оценивали по падению оптической плотности через 24 часа совместной инкубации жидких культур *B. laterosporus* с двухнедельными культурами различных микроводорослей.

Выявление гемолитической активности штаммов *B. laterosporus* и наблюдение феномена тепло-холодового гемолиза осуществляли на кровяном агаре с использованием стерильных дефибринированных эритроцитов человека (5%). Гемолитические штаммы выявляли по появлению характерных зон гемолиза вокруг штриха.

Недифибринированные эритроциты человека или крысы сохраняли в растворе Олсвера (цитрат натрия – 20 г/л, глюкоза – 30 г/л, рН 7,2). Перед использованием в опытах эритроциты несколько раз отмывали в буфере PBS (рН

7,2) для удаления лизированных клеток путем центрифугирования (1000 g, 10 мин, 4°C). 5%-ную суспензию недифибринированных эритроцитов человека использовали для количественной оценки степени гемолиза и в экспериментах по осмотическому ингибированию гемолиза, вызываемого *B. laterosporus*.

Количественную оценку гемолитической активности бактериальных фракций штаммов *B. laterosporus* проводили микрометодом с помощью спектрофотометрической регистрации гемоглобина, высвобождающегося при лизисе эритроцитов (Bernheimer, 1988). Эксперименты по **осмотическому ингибированию гемолиза** выполняли, как описано у Beecher и Wong (1997).

При изучении динамики накопления антагонистических факторов культуральную жидкость *B. laterosporus* на разных сроках инкубации испытывали соответствующими методами биотестирования. За динамикой роста культур следили по изменению оптической плотности среды при длине волны 590 нм, по динамике накопления продуктов культивирования и снижению pH среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе отсутствуют сведения о комплексной оценке представительной коллекции штаммов *B. laterosporus*, выделенных из различных географических областей, продуцировать биологически активные соединения. У 16 природных изолятов *B. laterosporus* были исследованы инсектицидная активность, антагонистическая активность, способность вызывать гемолиз, а также свойства отдельных факторов биологической активности. В качестве индикаторных объектов были использованы насекомые различных отрядов, грам (+) и грам (-) бактерии, грибы, водоросли и разные виды эритроцитов.

Характеристика штаммов *B. laterosporus*. Изучаемые штаммы *B. laterosporus* были выделены из природных образцов (почва, погибшие насекомые) в различных климато-географических районах. Исследование морфологических особенностей штаммов *B. laterosporus* с помощью светового микроскопа выявило у них признаки, характерные для данного вида бактерий. Вегетативные клетки *B. laterosporus* имеют палочковидную форму. Размер клеток составляет $(0,7 \div 0,9 \text{ мкм}) \times (3,0 \div 5,0 \text{ мкм})$. При споруляции наблюдается раздувание спорангия. Споры *B. laterosporus* имеют канозвидное включение (каноз). Параспоральные канозвидные включения прикреплены к одной стороне споры. По данным световой микроскопии споры исследованных штаммов *B. laterosporus* различаются по форме и размерам, по толщине и общему виду каноз. При высеве на агаризованную среду Хоттингера исследованные штаммы *B. laterosporus* образуют плоские, гладкие, ровные колонии белого, бежевого или коричневого цвета. Со временем гладкие колонии видоизменяются в морщинистые.

Впервые выделены штаммы *B. laterosporus*, способные образовывать параспоральные кристаллы. У четырех исследованных штаммов *B. laterosporus* (BL 16-92, BL 16-13, LAT 006 и LAT 011), помимо канозвидных включений, обнаружены кристаллические включения, различающиеся по форме и размерам,

подобные тем, что описаны для энтомопатогенных бактерий *B. thuringiensis* и *B. sphaericus*. Кристаллы штаммов BL 16-92, BL 16-13, LAT 006 и LAT 011 при лизисе спорангия высвобождаются раздельно от споры. Способность к кристаллообразованию у бактерий вида *B. laterosporus* до настоящего момента не была установлена.

Инсектицидная активность *B. laterosporus*. В связи с немногочисленными данными об энтомопатогенной активности *B. laterosporus* представляло интерес исследовать токсичность этих бактерий для насекомых разных видов. Мы проанализировали инсектицидную активность 16 штаммов *B. laterosporus* в отношении личинок насекомых отрядов *Lepidoptera*, *Coleoptera* и *Diptera*. Для тестирования энтомоцидной активности *B. laterosporus* использовали клетки штаммов, полученные после 72-х ч культивирования в жидкой среде NBY. Уровень спорообразования культур исследованных штаммов *B. laterosporus* в данной среде составлял от 80 до 90 %.

Установлено, что исследованные штаммы *B. laterosporus* были наиболее токсичны для личинок комаров *An. stephensi* (*Diptera*), менее токсичны для личинок колорадского жука *L. decemlineata* (*Coleoptera*) и вообще не токсичны для личинок непарного шелкопряда *L. dispar* (*Lepidoptera*). Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, подтверждающими наличие у штаммов *B. laterosporus* выраженной активности в отношении представителей *Diptera* и *Coleoptera* и отсутствие активности в отношении представителей *Lepidoptera* (Favret and Yousten (1985), Rivers et al. (1991), Singer (1981), Chang et al. (1984)). Все исследованные ранее штаммы были некристаллообразующими.

Ларвицидный эффект *B. laterosporus*. Сравнительный анализ активности 16 штаммов *B. laterosporus* в отношении двукрылых насекомых показал, что почти все они были токсичны для личинок II-ой стадии комаров трех видов: *An. stephensi* (Liston), *Ae. aegypti* (L.) и *Cx. pipiens* (L.). Для большинства исследованных бактериальных культур *B. laterosporus* в зависимости от штамма и вида мишеней LC₅₀ составляла от 10⁻² до 10⁻³, или в пересчете на клетки - от 10⁶ до 10⁴ КОЕ/мл. По уровню токсичности штаммы *B. laterosporus* напоминали слабоактивные штаммы *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* (de Barjac, H. 1990). Токсичность всех штаммов *B. laterosporus* для личинок *An. stephensi* и *Ae. aegypti* была несколько выше, чем для *Cx. pipiens*. Спектр ларвицидной активности штаммов *B. laterosporus* отличался от спектра активности, проявляемого штаммами *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* (табл. 1).

Таблица 1

Спектр ларвицидной активности штаммов *B. laterosporus*

	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i>	<i>Bacillus</i> <i>Sphaericus</i>	<i>Brevibacillus</i> <i>laterosporus</i>
<i>Aedes aegypti</i>	+++	-/+	++
<i>Anopheles stephensi</i>	++	++	++
<i>Culex pipiens</i>	+++	+++	+

Однако, после соответствующей работы по подбору оптимальных условий для споро- и кристаллообразования, ларвицидная активность кристаллообразующего штамма LAT 006 достигла уровня, сравнимого с *Vti* на личинках комаров *An. stephensi* и *Ae. aegypti*. Для других кристаллообразующих штаммов эти показатели улучшились, но незначительно.

Ларвицидная активность кристаллообразующих штаммов *B. laterosporus*. Наибольший интерес среди взятых в работу штаммов *B. laterosporus* представляли четыре Cry^+ -штаммы LAT 006, LAT 011, BL 16-92 и BL 16-13. До настоящего времени при исследовании ларвицидной активности *B. laterosporus* авторы использовали только α -кристаллические штаммы. Ранее способность к кристаллообразованию у бактерий вида *B. laterosporus* не была установлена. До недавнего времени *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* считались единственными видами *Bacillus*, продуцирующими кристаллические белковые токсины.

В настоящей работе кристаллообразующие штаммы *B. laterosporus* были изучены детально – дана морфологическая характеристика штаммов, проведен анализ влияния различных факторов культивирования на способность к споро- и кристаллообразованию, определены динамика синтеза и локализация ларвицидных факторов, оценена токсичность параспоральных кристаллов штаммов *B. laterosporus* для комаров разных видов, установлены молекулярные массы белков, входящих в состав кристаллов.

Морфологическая характеристика кристаллообразующих штаммов. Споры и параспоральные включения. Штаммы *B. laterosporus* BL 16-92, BL 16-13, LAT 006 и LAT 011 образуют эллипсоидные споры с прикрепленным к споре канозвидным включением (рис. 1, 2). Исследованные нами штаммы *B. laterosporus* помимо каноз образуют параспоральные кристаллические включения (рис. 3). Во время лизиса спорангия каноз остается обычно связанным со спорой (рис. 4), а кристаллы освобождаются отдельно от споры (рис. 5). Размеры и форма кристаллов у штаммов различаются. Штамм BL 16-92 образует мелкие ромбические кристаллы с четко очерченными углами размером 0,4 x 0,3 мкм (рис. 6). Электронно-микроскопический анализ показал, что свободные кристаллы 16-92 и кристаллы внутри спорангиев окружены оболочкой, как правило, равномерной толщины (рис. 7, 8). Оболочка имеет сетчатую структуру, сходную с оболочкой кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*. Штамм LAT 006 образует прямоугольные кристаллические включения размером 0,2 x 0,7 мкм или квадратные со сглаженными углами кристаллы размером 0,4 x 0,4 мкм и меньше (рис. 9, 10). Кристаллы штамма BL 16-13 крупные (0,7 x 0,5 мкм), ромбоидной формы (рис. 3, 8, 11). Кристаллы штамма LAT 006 отличаются от кристаллов *B. laterosporus* BL 16-92 формой и большей электронной плотностью, но сходны с кристаллами BL 16-92 наличием оболочки, изолирующей их от воздействия факторов внешней среды. Штамм LAT 011 образует мелкие ромбические с четко очерченными углами кристаллы размером 0,5 x 0,2 мкм (рис. 12, 13).

Влияние условий культивирования на способность *B. laterosporus* к росту, споро- и кристаллообразованию и величину ларвицидной активности. Для выяснения условий, влияющих на способность штаммов *B. laterosporus* к

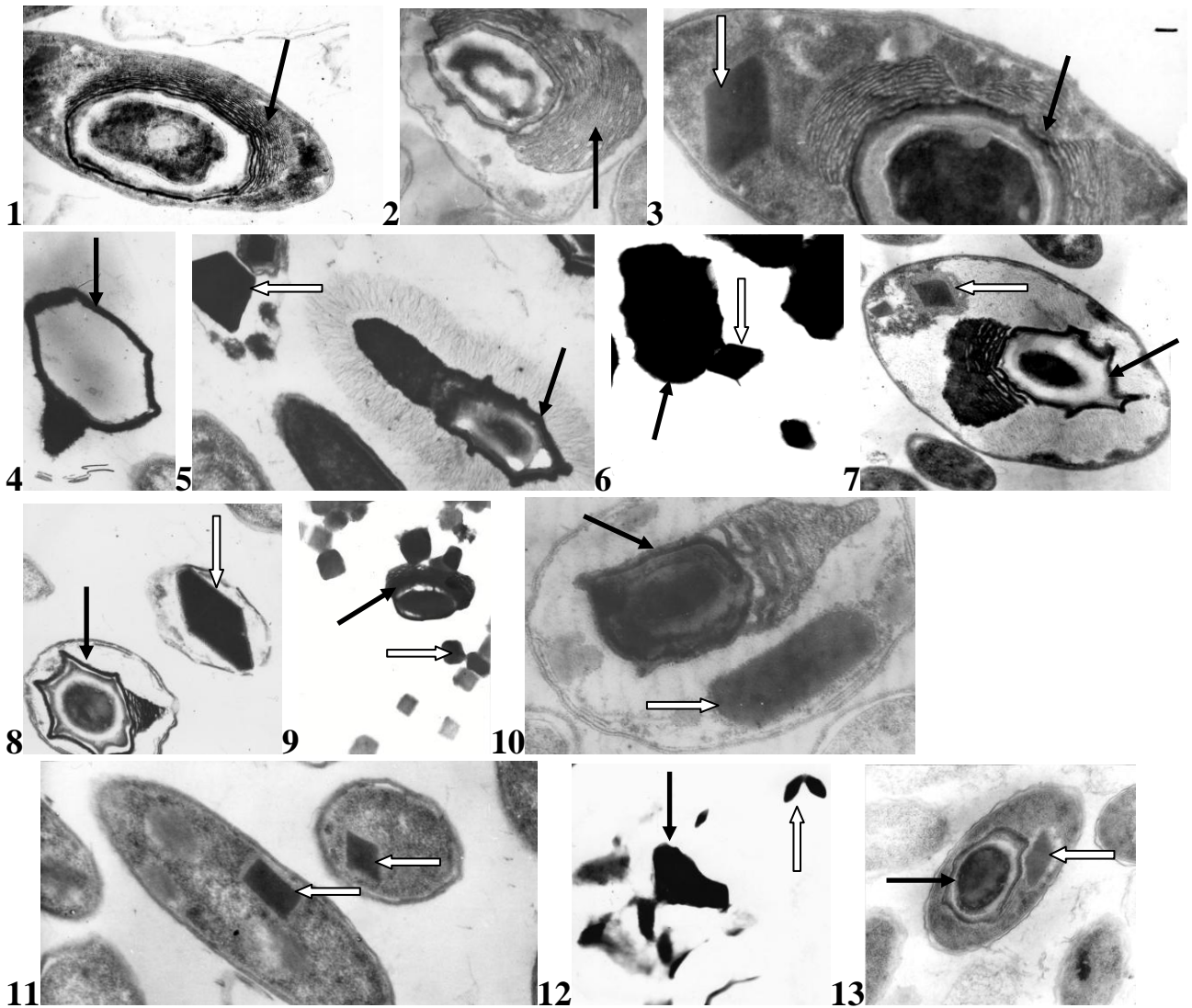


Рис. 1. Спора с каное (→). Штамм *B. laterosporus* BL 16-92. Ультратонкий срез.

Рис. 2. Спора с каное (→). Штамм *B. laterosporus* LAT 006. Ультратонкий срез.

Рис. 3. Спора с каное (→) и кристаллом (⇐) в спорангии. Штамм *B. laterosporus* BL 16-13. Ультратонкий срез.

Рис. 4. Споровая оболочка с прикрепленным каное (→). Штамм *B. laterosporus* BL 16-13. Ультратонкий срез.

Рис. 5. Свободные кристаллы (⇐) и спора (←) после лизиса спорангия. Штамм *B. laterosporus* BL 16-13. Ультратонкий срез.

Рис. 6. Спора и кристаллы штамма *B. laterosporus* 16-92. Негативное контрастирование.

Рис. 7. Спора (←) и кристаллы (⇐) в спорангии. Штамм *B. laterosporus* BL 16-92. Ультратонкий срез.

Рис. 8. Спора (←) и кристалл (⇐) штамма *B. laterosporus* 16-13. Ультратонкий срез.

Рис. 9. Спора (←) и кристаллы (⇐) штамма *B. laterosporus* LAT 006. Негативное контрастирование.

Рис. 10. Спора (←) и кристалл (⇐) в спорангии. Штамм *B. laterosporus* LAT 006. Ультратонкий срез.

Рис. 11. Кристаллические включения. штамма *B. laterosporus* 16-13. Ультратонкий срез.

Рис. 12. Спора (←), кристаллы (⇐) штамма LAT 011. Негативное контрастирование.

Рис. 13. Спора (←) и кристалл (⇐) в спорангии. Штамм *B. laterosporus* LAT 011. Ультратонкий срез.

споро- и кристаллообразованию в качестве модельного штамма использовали штамм LAT 006. Известно, что уровень споро- и кристаллообразования *B. thuringiensis* и *B. sphaericus* в значительной мере зависит от состава используемой для культивирования среды.

Для определения оптимальных условий споро- и кристаллообразования *B. laterosporus* использовали ряд питательных сред. Штамм LAT 006 выращивали в средах, содержащих в различных сочетаниях пептон, триптон, мясной экстракт, глюкозу, дрожжевой экстракт, минеральные соли, варьировали температуру культивирования (30°C и 37°C). В некоторые среды вносили тиамин и L-метионин, поскольку бактерии *B. laterosporus* являются ауксотрофами по этим факторам роста.

По анализированным показателям – продуктивность, образование спор, образование кристаллов и ларвицидная активность – оптимальными оказались следующие условия культивирования штамма LAT 006 – среды Nickerson и ВР, продолжительность инкубации - 96 часов, температура инкубации – 37°C. Отметим, однако, что продуктивность (титр спор/мл) для некоторых штаммов оказалась выше при культивировании при 30°C, но токсичность для личинок комаров снизилась (табл. 3). Метод культивирования - жидкая среда или плотная не имели значения. В таблице 2 представлены показатели изученных характеристик штамма LAT 006 в оптимальных условиях культивирования.

Таблица 2

Показатели роста LAT 006 в оптимальных условиях культивирования

Характеристика	Показатель	
Условия культивирования	Питательная среда	Среда ВР, Nickerson
	Время инкубации	96 час
	Температура инкубации	37°C
Показатели роста	Титр	$> 10^8$ КОЕ/мл
	Частота спорообразования	90-95%
	Образование кристаллов	Соотношение спора: кристалл – 1,0-1,5
	Содержание общего белка	400 мкг/мл
	Ларвицидная активность	$LC_{50} \leq 1 \times 10^4$ КОЕ/мл или $\leq 9,0 \times 10^{-5}$ ($8,0 \times 10^{-5}$ - $2,4 \times 10^{-4}$) 0,006-0,045 мкг общего белка/мл

Как известно, отношение спора/кристалл позволяет судить о стадии культивирования. Так, для *B. thuringiensis* ssp. на заключительном этапе культивирования эта величина составляет < 1 .

Таким образом, питательная среды ВР и Nickerson обеспечивают достижение культурой штамма LAT 006 наибольшей ларвицидной активности против личинок *A. aegypti*. Оптимизация условий культивирования позволила увеличить выход спор и кристаллов и уровень токсичности исследуемых штаммов *B. laterosporus* LAT 006 и BL 16-92 для комаров. Эти показатели для штамма LAT 006 (титр спор и LC_{50} для личинок *Ae. aegypti*) составили, соответственно,

2×10^8 спор/мл и 0,025 мкг общего белка/мл, а для штамма BL 16-92 – 1×10^8 спор/мл и 0,94 мкг общего белка/мл.

Таблица 3

Влияние температуры культивирования на рост и ларвицидную активность штаммов *B. laterosporus* LAT 006 и BL 16-92

Показатели роста и активности	LAT 006		BL 16-92	
	30°C	37°C	30°C	37°C
Споры/мл	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
LC ₅₀ (споры/мл и разведение)	$6,0 \times 10^4$ ($3,0 \times 10^{-3}$) ($1,2 \times 10^{-3}$ - $6,8 \times 10^{-3}$)	$1,6 \times 10^4$ ($8,0 \times 10^{-5}$) ($8,0 \times 10^{-5}$ - $3,6 \times 10^{-4}$)	$2,0 \times 10^6$ ($5,0 \times 10^{-3}$) ($4,0 \times 10^{-3}$ - $1,3 \times 10^{-2}$)	$2,35 \times 10^5$ ($2,35 \times 10^{-3}$) ($2,35 \times 10^{-3}$ - $4,2 \times 10^{-3}$)
Общий белок, мкг/мл	150	320	340	400
LC ₅₀ , (общ. бел, мкг/мл)	0,45	0,045	1,7	0,94

Изучение динамики синтеза и локализации ларвицидного фактора кристаллообразующих штаммов *B. laterosporus*. Для выявления связи между ларвицидной активностью и циклом бактериального роста кристаллообразующих штаммов *B. laterosporus* сравнивали токсичность штамма LAT 006 для личинок комаров *An. stephensi* на разных стадиях роста (вегетативная, спорообразования, стадия синтеза кристаллического токсина). Для расчета величины, характеризующей токсичность штамма, принимали минимальную концентрацию образца (КОЕ/спор в мл), вызывающую 50% гибели личинок тест-насекомых через 48 ч. Результаты представлены на рис. 14.

Изучение динамики роста штамма LAT 006 в жидкой среде ВР показало, что экспоненциальная фаза изучаемой культуры наблюдается между 8 и 20 ч после посева (рис. 14). Однако, во время ранней экспоненциальной фазы роста (8 ч) культура не обладала никакой детектируемой токсичностью для насекомых. Вегетативная (18 ч) культура LAT 006 с титром более 10^7 КОЕ/мл и количеством спор менее 0,3 % обладала наименьшей токсичностью для комаров *An. stephensi*. Величина LC₅₀ 18-часовой культуры составляла $2,0 \times 10^5$ КОЕ/мл. Ларвицидная активность 96-часовой культуры была примерно на два порядка выше, чем у 18-часовой культуры LAT 006, что могло быть обусловлено увеличением количества спор и кристаллов. Так, через 96 ч культивирования титр культуры LAT 006 составлял $\geq 10^8$ КОЕ/мл, а уровень спорообразования достигал 80%, значение LC₅₀ составляло $< 1,0 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Таким образом, в результате исследования динамики ларвицидной активности у кристаллообразующего штамма LAT 006 установлено, что наибольшей токсичностью обладала культура на стадии спорообразования (96 ч), продуцирующая термостабильные споры и кристаллы.

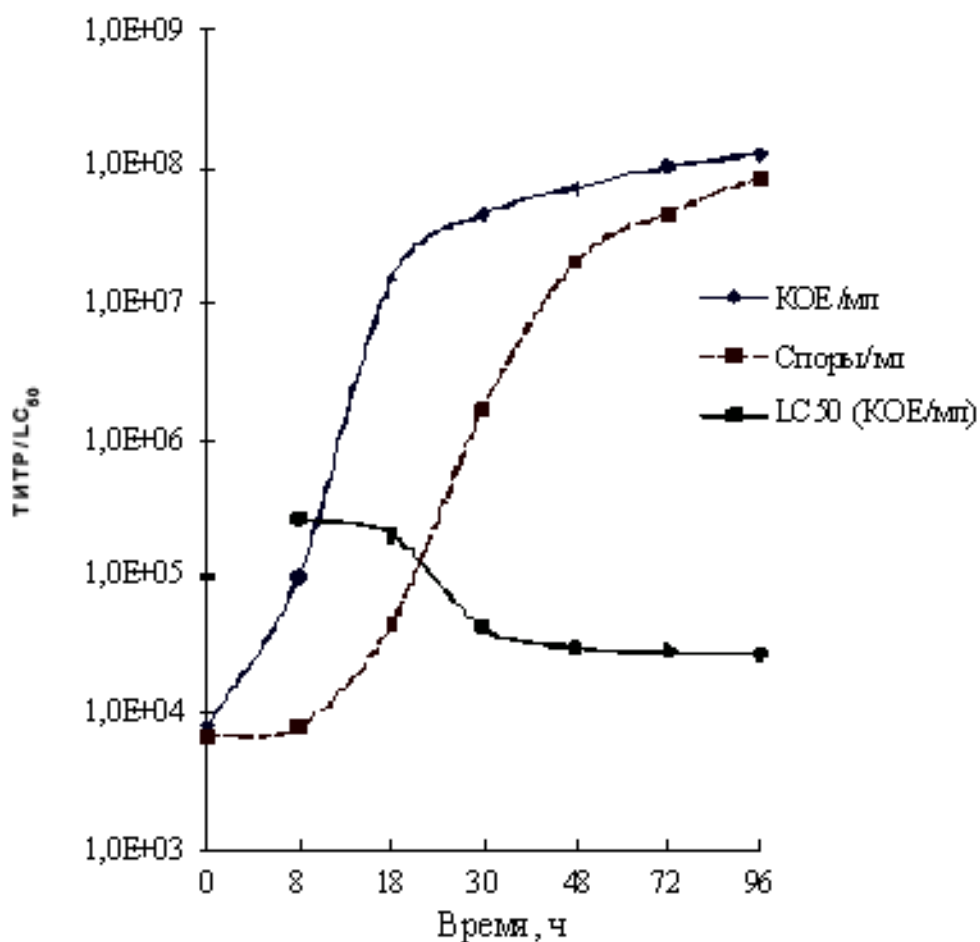


Рис. 14. Рост и ларвицидная активность штамма *B. laterosporus* LAT 006 в отношении личинок комаров *An. stephensi*.

Показано, что почти вся ларвицидная активность штамма *B. laterosporus* LAT 006 против *An. stephensi* на стадии оптимума – на стадии спорообразования – была связана с фракцией осадка, т. е. кристаллами и спорами (табл. 4).

Таблица 4

Ларвицидная активность фракций споровой культуры *B. laterosporus* для личинок *Anopheles stephensi*

Образец	LAT 006		BL 16-13	
	КОЕ/мл	LC ₅₀ , КОЕ/мл	КОЕ/мл	LC ₅₀ , КОЕ/мл
Культуральная жидкость	2,2 x 10 ⁸	8,0 x 10 ³ (4,0 x 10 ⁻⁵)	1,0 x 10 ⁸	2,35 x 10 ⁵ (4,7 x 10 ⁻³)
Супернатант ^a	н.о.	1,0x10 ⁻²	н.о.	4,0 x 10 ⁻²
Осадок	2,2 x 10 ⁸	8,0 x 10 ³ (4,2 x 10 ⁻⁵)	9,8 x 10 ⁷	2,4x 10 ⁵ (4,7 x 10 ⁻³)

^a н.о. – спор не обнаружено.

Аналогичный результат был получен при анализе штамма BL 16-13. Культуральная жидкость и осадок споровых культур штаммов BL 16-13 и LAT 006 имели одинаковый уровень токсичности для личинок *An. stephensi*. Значения LC₅₀ культурального супернатанта были приблизительно в 10 раз меньше, чем значения LC₅₀ для культуральной жидкости и осадка (табл. 4).





Ларвицидная активность кристаллов *B. laterosporus*. Споры и кристаллические включения штамма *B. laterosporus* LAT 006 были разделены при центрифугировании в нелинейном градиенте плотности бромида натрия. В результате была получена фракция, содержащая только кристаллы. Фракция очищенных кристаллов обладала токсичностью для личинок комаров *Ae. aegypti* и *An. stephensi* (табл. 5).

Молекулярный вес белков, входящих в состав кристаллов штаммов *B. laterosporus*. Определение молекулярной массы белков, входящих в состав очищенных кристаллов штаммов *B. laterosporus* в условиях, исключающих протеолиз, выявило наличие в кристаллах штаммов *B. laterosporus* BL 16-92 и LAT 006 одного мажорного пептида с молекулярной массой 68 кДа, а в кристаллах штамма LAT 011 одного белка 128 кДа.

Суммарные данные о физико-химических и ларвицидных свойствах кристаллов *B. laterosporus* представлены в таблице 5.

Таблица 5

Характеристика кристаллов *Brevibacillus laterosporus*^a

Штамм	Вид кристаллов на плоскости	Размер кристаллов, мкм x мкм	LC ₅₀ очищенных кристаллов, мкг/мл		Молекулярный вес белков, кДа
			<i>Anopheles stephensi</i>	<i>Aedes aegypti</i>	
LAT 006		0,2 x 0,7 0,4 x 0,4	0,005	0,003	68
BL 16-92		0,4 x 0,3	2,0	4,0	68
BL 16-13		0,7 x 0,5	Н.д. ^б	Н.д.	Н.д.
LAT 011		0,5 x 0,2	0,5	Н.д.	130

^a – штаммы культивировали: LAT 006 – среда Nickerson, 37°C, 96 ч; BL 16-92, BL 16-13 – среда ВР, 30°C, 96 ч; LAT 011 – среда ВР, 37°C, 96 ч; ^б - нет данных.

Представленные данные свидетельствуют, что удельная ларвицидная активность кристаллов штамма *B. laterosporus* (3-5 нг/мл) сравнима с активностью кристаллов *B.thuringiensis* и *B. sphaericus*, что позволяет рекомендовать *B. laterosporus* в качестве потенциальных продуцентов биологических средств борьбы с комарами.

Биоинкапсуляция кристаллов и спор *B. laterosporus* в простейшие организмы. Одним из недостатков биологических средств борьбы с комарами является их относительно непродолжительное остаточное действие вследствие

оседания активных компонентов на дно водоёма, адсорбцией частицами ила, органическими веществами и рядом других факторов. Ранее было показано, что инкапсуляция инфузорией *T. pyriformis* бактерий *B. thuringiensis* (Bti) и *B. sphaericus* усиливает их ларвицидный эффект. Исходя из этого, в настоящей работе было изучено взаимодействие простейших *T. pyriformis* и *E. moshkovskii* с бактериями *B. laterosporus*.

Для выполнения работы был выбран кристаллообразующий штамм *B. laterosporus* LAT 006. Фракции очищенных спор и кристаллов, а также исходную споро-кристаллическую массу LAT 006 (среда ВР, 37°C, 96 ч) использовали для экспериментов. Предварительно было установлено, что фракции очищенных спор и кристаллов, а также исходной споро-кристаллической массы LAT 006 не оказывали токсического действия на клетки *T. pyriformis* и *E. moshkovskii* (табл. 6).

Таблица 6

Действие фракций культуры штамма LAT 006 на клетки простейших

Время, часы	Выживаемость простейших, %							
	Контроль		Водная суспензия спор и кристаллов		Очищенные кристаллы		Очищенные споры	
	T*	E**	T*	E**	T*	E**	T*	E**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
2	110	104	103	107	97	103	93	106
24	150	112	163	111	195	107	117	113
48	160	121	130	118	200	125	113	120

T. pyriformis*; *E. moshkovskii*.

Далее мы использовали метод биоинкапсуляции для оценки ларвицидного действия *B. laterosporus* (табл. 7). Споро-кристаллическая масса *B. laterosporus* для биоинкапсуляции содержала в 1 мл $1-3 \times 10^6$ спор LAT 006 (1,0-1,2 мкг общего белка) и $1,5-2,0 \times 10^4$ клеток *T. pyriformis*. Смесь для биоинкапсуляции очищенных спор *B. laterosporus* содержала в 1 мл $1-3 \times 10^7$ спор LAT 006 и $1,3-1,5 \times 10^4$ клеток *T. pyriformis*. Смесь для биоинкапсуляции очищенных кристаллов LAT 006 содержала в 1 мл 0,9-1,0 мкг общего белка и $1,5-2,0 \times 10^4$ клеток *T. pyriformis*. В опытах по биоинкапсуляции смеси споро-кристаллической массы, очищенных спор и кристаллов LAT 006 с инфузорией инкубировали в течение 2 ч при температуре 25°C и перемешивании. После этого смеси *B. laterosporus* – *T. pyriformis* добавляли в тест-сосуды с личинками III возраста комаров *An. stephensi*. В контрольные сосуды с личинками *An. stephensi* добавляли не инкапсулированные образцы *B. laterosporus*. Гибель личинок *An. stephensi* подсчитывали через 2 ч, 5 ч, 18 ч, 24 ч и 48 ч после обработки образцами *B. laterosporus*.

Как следует из табл. 7, биоинкапсуляция споро-кристаллической суспензии LAT 006 в клетки *T. pyriformis* значительно повышала ее ларвицидную активность по сравнению с не инкапсулированным образцом (LC₅₀ – 0,012 мкг общего белка/мл и 0,040 мкг общего белка/мл, соответственно, после 48 ч

контакта с личинками комаров). Аналогичное усиление наблюдалось при биоинкапсуляции очищенных кристаллов по сравнению с не инкапсулированным образцом (LC_{50} - 0,003 мкг общего белка/мл и 0,022 мкг общего белка/мл, соответственно). Очищенные споры штамма LAT 006 как в отдельности, так и после инкапсуляции не оказывали ларвицидного эффекта на *An. stephensi*.

Таблица 7

Действие разных фракций LAT 006, инкапсулированных в *T.pyriformis*

Образец	LC_{50}^a			
	24 ч		48 ч	
	Разведение исследуемого образца LAT 006	Белок в образце LAT 006, мкг/мл	Разведение исследуемого образца LAT 006	Белок в образце LAT 006, мкг/мл
Споро-кристаллическая суспензия (СКС) СКС+ инфузория	$3,1 \times 10^{-2}$ ($1,8 \times 10^{-2}$ - $6,0 \times 10^{-2}$)	3,090	$4,3 \times 10^{-4}$ ($2,3 \times 10^{-4}$ - $9,0 \times 10^{-4}$)	0,040
	$2,4 \times 10^{-3}$ ($1,8 \times 10^{-3}$ - $4,9 \times 10^{-3}$)	0,237	$1,0 \times 10^{-4}$ ($1,5 \times 10^{-5}$ - $2,9 \times 10^{-4}$)	0,012
Очищенные кристаллы Очищенные кристаллы + инфузория	$1,2 \times 10^{-2}$ ($4,4 \times 10^{-3}$ - $8,1 \times 10^{-2}$)	1,163	$2,4 \times 10^{-4}$ ($1,3 \times 10^{-4}$ - $5,6 \times 10^{-4}$)	0,024
	$2,4 \times 10^{-4}$ ($1,3 \times 10^{-4}$ - $1,6 \times 10^{-4}$)	0,024	$1,9 \times 10^{-5}$ ($1,4 \times 10^{-5}$ - $2,6 \times 10^{-5}$)	0,003
Очищенные споры	^b	-	-	-
Очищенные споры + инфузория	-	-	-	-

^a – значения LC_{50} рассчитаны с помощью программы Probit (в скобках указаны значения 95%-ного доверительного интервала); ^b – нет гибели.

Аналогичные эксперименты были поставлены с клетками *E. moshkovskii* (табл. 8). Смесь для биоинкапсуляции споро-кристаллической массы *B. laterosporus* содержала в 1 мл $1-3 \times 10^6$ спор LAT 006 (1,0-1,2 мкг общего белка) и $1,0-1,3 \times 10^4$ клеток *E. moshkovskii*. Смесь для биоинкапсуляции очищенных спор *B. laterosporus* содержала в 1 мл $1-3 \times 10^7$ спор LAT 006 и $1,0-1,3 \times 10^4$ клеток *E. moshkovskii*. Смесь для биоинкапсуляции очищенных кристаллов LAT 006 содержала в 1 мл 0,9-1,0 мкг общего белка и $1,0-1,3 \times 10^4$ клеток *E. moshkovskii*. инкубацию споро-кристаллической массы, очищенных спор и кристаллов LAT 006 с амебой проводили так же, как с *T. pyriformis*.

Как следует из табл. 8, биоинкапсуляция в клетки *E. moshkovskii* споро-кристаллической суспензии и очищенных кристаллов усиливала ларвицидное действие на личинки комаров. Очищенные споры штамма LAT 006 как до, так и после инкапсуляции в клетки *T. pyriformis* и *E. moshkovskii* не обладали ларвицидной активностью против личинок комаров *An. stephensi*.

Таблица 8

Действие разных фракций LAT 006, инкапсулированных в *E.moshkovskii*

Образец	LC ₅₀ ^a			
	24 ч		48 ч	
	Разведение исследуемого образца LAT 006	Белок в образце LAT 006, мкг/мл	Разведение исследуемого образца LAT 006	Белок в образце LAT 006, мкг/мл
Споро-кристаллическая суспензия (СКС)	2,6x10 ⁻² (1,1x10 ⁻² -5,2x10 ⁻²)	2,560	3,8x10 ⁻⁴ (2,5x10 ⁻⁴ -5,0x10 ⁻⁴)	0,045
СКС + Амеба	6,3x10 ⁻³ (1,5x10 ⁻³ -1,0x10 ⁻²)	0,626	2,6x10 ⁻⁴ (1,6x10 ⁻⁴ -3,9x10 ⁻⁴)	0,026
Очищенные кристаллы	1,1x10 ⁻³ (8,5x10 ⁻⁵ -1,8x10 ⁻⁴)	1,130	2,9x10 ⁻⁴ (8,8x10 ⁻⁵ -3,7x10 ⁻⁴)	0,028
Очищенные кристаллы + амеба	1,8x10 ⁻⁴ (8,6x10 ⁻⁵ -4,7x10 ⁻⁴)	0,018	5,1x10 ⁻⁵ (1,6x10 ⁻⁵ -2,4x10 ⁻⁵)	0,005
Очищенные споры	- ^b	-	-	-
Очищенные споры + амеба	-	-	-	-

^a – значения LC₅₀ рассчитаны с помощью программы Probit (в скобках указаны значения 95%-ного доверительного интервала); ^b – нет гибели.

Время, необходимое для гибели 50 % личинок до и после инкапсуляции образцов *B. laterosporus* амебой *E. moshkovskii* и инфузорией *T. pyriformis* составляло для споро-кристаллической смеси – 18, 7 и 5 часов; для суспензии очищенных кристаллов также 18, 7 и 5 часов, соответственно (табл. 9).

Таблица 9

Время, необходимое для 50%-ной гибели (LT₅₀) личинок *An. stephensi*

Простейшие	LT ₅₀ , ч			
	споро-кристаллическая суспензия LAT 006		очищенные кристаллы LAT 006	
	без инкапсуляции	инкапсуляция	без инкапсуляции	инкапсуляция
<i>T. pyriformis</i>	18	5	18	5
<i>E. moshkovskii</i>	18	7	18	7

Таким образом, показано, что при инкапсуляции токсинов *B. laterosporus* в простейшие - инфузории и амёбы – помимо сокращения времени гибели личинок комаров в 2,5-3,5 раза, происходит снижение летальных концентраций споро-кристаллической массы и кристаллов *B. laterosporus* для личинок комаров (в 2-3 раза и 6-8 раз, соответственно). По всей вероятности, в инфузориях скапливается

значительное количество спор и кристаллов *B. laterosporus*, что приводит к усилению ларвицидного эффекта этих бактерий. Метод биоинкапсуляции может использоваться для повышения эффективности инсектицидов, создаваемых на основе *B. laterosporus* и других видов энтомопатогенных бактерий.

Антимикробная активность *B. laterosporus*. Известно, что наличие антагонистических свойств обеспечивает микроорганизмам селективные преимущества во взаимоотношениях с другими представителями окружающей микрофлоры. Учитывая экологическую нишу *B. laterosporus* (почва, вода, насекомые), возможно проявление антагонизма этих бактерий в отношении других бактерий, занимающих ту же самую нишу. Сведения об антагонистических свойствах штаммов *B. laterosporus* в отношении представителей своего вида в литературе отсутствуют, а в отношении других видов микроорганизмов немногочисленны. В связи с этим представляло интерес исследовать антимикробную активность 16 природных изолятов *B. laterosporus* в отношении представителей своего вида бактерий, других видов *Bacillus*, ряда грамположительных и грамотрицательных фитопатогенных бактерий, цианобактерий и эукариотических организмов (грибов).

Были использованы 48-ч жидкие культуры штаммов *B. laterosporus*, полученные на среде NBY. Активность исследованных штаммов *B. laterosporus* определяли методом капель и методом диффузии из лунок в агаре. При оценке антимикробной активности штаммов *B. laterosporus* у них был выявлен широкий спектр действия, распространяющийся на бактерии своего вида, другие виды *Bacillus*, таксономически отдаленные грам (+) и грам (-) бактерии (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Sarcina*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*), грам (-) фитопатогенные бактерии *Xanthomonas* ssp. и *Erwinia herbicola*, грам (-) бактерии *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*; цианобактерии (*Anabena*, *Nostoc*, *Microcystis aeruginosa*), эукариотические микроорганизмы (дрожжи *C. albicans*, *S. cerevisiae*), фитопатогенные грибы. Шесть штаммов *B. laterosporus* – LAT 002, 003, 004, 006, 16-92 и 16-52 – обладали наиболее широким спектром антагонистического действия в отношении как родственных, так и не родственных микроорганизмов.

Антагонистическая активность *B. laterosporus* в смешанной культуре. Антагонистическая активность сообщает клеткам селективное преимущество, которое может проявиться и иметь биологическое значение при совместном культивировании микроорганизмов, например, при колонизации кишечника. Так, некоторые штаммы *B. laterosporus* используют для получения препаратов пробиотиков, которые применяют при лечении заболеваний, связанных с нарушением микрофлоры кишечника человека (U.S.Pat.No. 5,455,021;1995). В связи с этим представляло интерес определить антагонистическую активность штамма *B. laterosporus* BL 16-52 по отношению условно-патогенным бактериям *B. cereus* Str^f при смешанном культивировании в жидкой среде. С этой целью обе культуры смешивали в различных соотношениях и культивировали в жидкой среде. На разных сроках совместной инкубации определяли соотношение бактерий путем высева разведений смешанной культуры на агар без антибиотика и агар с антибиотиком. Результаты совместного культивирования штаммов *B. laterosporus* BL16-52 и *B. cereus* 569 Str^f представлены в табл. 10.

Селективное преимущество штамма BL 16-52
при смешанном культивировании в жидкой среде

Соотношение <i>BL:B.cereus</i>	<i>B. cereus</i> , КОЕ/мл				
	0 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч
0:1	1.6×10^5	1.0×10^8	8.0×10^7	7.5×10^7	6.0×10^7
200:1	1.6×10^5	5.0×10^7	5.8×10^7	2.7×10^7	8.0×10^6
20:1	1.6×10^5	2.0×10^4	1.0×10^3	-	-
2:1	1.6×10^5	-	-	-	-

Показана способность штамма *B. laterosporus* BL 16-52 ингибировать рост бактерий *B.cereus* 569 Str^r при смешанном культивировании. Максимальное ингибирующее действие *B. laterosporus* BL 16-52 против бактерий *B.cereus* 569 Str^r во время совместного культивирования наблюдается при соотношении антагонист: патоген, равном 1:2. В этом случае происходит полное подавление роста бактерий *B. cereus* штаммом BL 16-52 через 24 ч совместной инкубации и в смеси присутствуют только клетки *B. laterosporus* (1×10^7 КОЕ/мл). То есть, обнаружено селективное вытеснение из смеси бактерий культуры *B. cereus* 569 штаммом BL 16-52 в ходе совместного культивирования, обусловленное антагонистическим действием *B. laterosporus*. При соотношении BL16-52:*B.cereus* 569 20:1 наблюдается постоянное с начала инкубации снижение титра *B. cereus*, а через 72 ч со-культивирования происходит полное ингибирование роста. Более низкое соотношение BL16-52:*B.cereus* 569 (1:200) незначительно снижает рост *B. cereus*, но количество клеток 569 не достигает уровня контроля в процессе культивирования (с 24 по 96 ч). Бактерии *B. cereus* не оказывают подавления роста BL 16-52 при совместном культивировании.

Характеристика антагонистических факторов *B. laterosporus*. Широкий спектр антимикробной активности, выявленный у исследованных штаммов *B. laterosporus*, может быть обусловлен действием факторов различной природы. Ингибирующая активность *B. laterosporus* против своего вида бактерий может быть связана с продукцией веществ типа бактериоцинов, умеренными фагами, индуцируемыми спонтанно из лизогенной культуры, дефектными фагами. Антагонистическая активность штаммов *B. laterosporus* в отношении таксономически отдаленных грам (+) бактерий, грам (-) бактерий и эукариотических микроорганизмов может быть связана с синтезом антибиотика. Таким образом, наблюдаемый спектр антагонистической активности штаммов *B. laterosporus* может быть результатом суммарного эффекта бактериоцина(ов) или бактериоциноподобных веществ и антибиотика(ов).

Бактериоциногенный фактор *B. laterosporus*. При выявлении природы ингибирующих факторов штаммов *B. laterosporus* было показано, что материал, экстрагированный из зон подавления чувствительных культур, не перевивается на этих культурах и при конечных разведениях отдельные негативные колонии, характерные для фагов, не выявляются. Эти данные свидетельствовали против возможности действия вирулентного фага(ов) в качестве антагонистического фактора исследованных штаммов *B. laterosporus*. Электронно-микроскопический

анализ материала из зон лизиса нескольких штаммов *B. laterosporus* показал наличие фагоподобных структурированных элементов различной морфологии.

В результате очистки и концентрирования структурированных элементов штамма 16-92 в градиенте плотности хлористого цезия была получена одна видимая полоса. При электронно-микроскопическом исследовании в образце обнаружены структурные элементы фагов. Проверка антагонистической активности концентрированного препарата показала, что он образует зоны ингибирования только на газонах индикаторных культур *B. laterosporus* и других видов *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. thuringiensis* ssp. *tolworthi*, *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* 1-5, *B. thuringiensis* ssp. *galleriae* 69-6, *B. sphaericus*).

Под действием трипсина (1 мг/мл) или проназы (1 мг/мл) в течение 18 ч при 37°C, ингибирующий фактор BL 16-92 инактивировался на 50% и 70%, а при прогревании при 100°C в течение 5 мин полностью утратил активность в отношении индикаторной культуры LAT 011 (была выбрана как наиболее чувствительная) (табл. 11). Полученные данные позволяют предположить белковую природу антибактериального фактора.

Таблица 11

Чувствительность антибактериального фактора штамма BL 16-92
к обработке протеазами и нагреванию

Образец	Ингибирующая активность		
	Общая, ед	Выход	Инактивация
Сконцентрированный и очищенный препарат	15000	100 %	-
Обработка протеолитическими ферментами:			
трипсин (1 мг/мл, 18 ч, 37°C)	5000	50 %	50 %
проназа (1 мг/мл, 18 ч, 37°C)	7000	30 %	70 %
Термическая обработка (100°C, 5 мин)	0	0 %	100 %

Электронно-микроскопическое исследование семи других очищенных препаратов антагонистических факторов, продуцируемых штаммами LAT 001, LAT 002, LAT 003, LAT 006, LAT 011, BL 16-13 и BL 16-932 показали, что все они содержат морфологические частицы, напоминающие какие-либо структурные элементы фагов. Факторы этих штаммов образуют зоны ингибирования на газонах индикаторных культур *B. laterosporus*. Вероятнее всего, обнаруженные структуры являются продуктами морфогенеза дефектных фагов, проявляющими свойства бактериоцинов. Это, однако, не исключает продуцирование штаммами *B. laterosporus* простых полипептидных бактериоцинов.

Антибиотический комплекс *B. laterosporus*, выделенный из штамма BL 16-52 обладал антагонистической активностью в отношении представителей видов *Bacillus* и грам (+) бактерий *S. aureus*, *E. faecium* и *Streptococcus* ssp. в концентрации 15 мкг/мл и не был активен в отношении грам (-) бактерий *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *E. coli*. Антибиотический комплекс не обладал активностью в отношении указанных грам (-) бактерий даже в концентрации 400 мкг/мл.

В выделенном комплексе присутствуют три антибиотика, из которых два идентифицированы. Первый представляет собой ранее запатентованный антибиотик лолоатин А (U.S.Patent No. 5,962,407; 1999), второй – новый антибиотик. Латероцидин представляет собой белое аморфное твердое вещество, имеющее формулу [цикло-(L-вал-L-орн-L-лей-D-тир-L-про-L-фен-D-фен-L-асн-L-асп-L-лей)] и молекулярную массу 1224,4 Д. Латероцидин растворяется в метаноле, этаноле, других высших спиртах, не растворяется в воде. Природа третьего антибиотика не установлена. Минимальные ингибирующие концентрации латероцидина и лолоатина для некоторых грам (+) и грам (-) бактерий представлены в табл. 12.

Таблица 12

Минимальные ингибирующие концентрации латероцидина и лолоатина		
Тест-микроорганизмы	Латероцидин	Лолоатин А (12)
Грам (+) бактерии:		
<i>Staphylococcus</i> ssp.	4	2-4
<i>Staphylococcus aureus</i>	13-15	2-4
<i>Streptococcus</i> ssp.	0,2	<1
<i>Enterococcus</i> ssp.	2	2-4
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2-4
Грам (-) бактерии:		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas mendocina</i>	>100	>100
<i>Xanthomonas</i> ssp.	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100

Данные, приведенные в таблице 12, показывают, что латероцидин обладает высокой антагонистической активностью по отношению к бактериям групп стрептококков, стафилококков и энтерококков. Величины МИК латероцидина близки значениям МИК лолоатина А. Значения МИК выделенного нами лолоатина А полностью совпадают со значениями, определенными ранее для этого антибиотика (U.S.Patent No.5,962,407, 1999).

Таким образом, штамм *B. laterosporus* BL 16-52 продуцирует комплекс из трех пептидных антибиотиков, один из которых - латероцидин - является новым циклодекапептидом, обладающим высокой активностью в отношении грам (+) бактерий *S. aureus*, *E. faecium* и *Streptococcus* ssp.

Оценка гемолитической активности *B. laterosporus*. Для бацилл характерна способность к синтезу гемолизина. Гемолизин обнаружен у ряда бацилл *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* (Alouf, 1980; Billington et al., 2000). Гемолизин *B. thuringiensis* может действовать как факторы, усиливающие энтомоцидный эффект этих бактерий. У *B. laterosporus* обнаружен тиолактивируемый цитолизин (гемолизин) - латероспоролизин, который образует поры в мембранах эукариотических клеток и приводит их к лизису (Billington et al., 2000). Иногда наличие гемолитической активности может лимитировать использование штаммов в прикладных целях. Для полной характеристики энтомопатогенных

штаммов *B. laterosporus*, наряду с другими свойствами, представлялось необходимым определить их гемолитическую активность.

Показано, что все исследованные штаммы *B. laterosporus* при росте на кровяном агаре, содержащем эритроциты человека (5 %) образуют зоны лизиса зеленоватого цвета (табл. 13). Такая окраска при гемолизе характерна для действия гемолизина α -типа у *B. cereus*, *S. aureus* и других видов микроорганизмов. Удалось наблюдать феномен тепло-холодового гемолиза, т.е. зоны стали четче и стала более явной зеленая окраска. Возможно, что гемолизин BL напоминает сфингомиелиназу.

Таблица 13

Гемолитическая активность штаммов *B. laterosporus*

Штамм	Окрашивание агара	Тип гемолиза ^а	Гемолитическая активность ^{б,в} , ГЕ/мл	
			Эритроциты человека (5%)	Эритроциты крысы (5%)
LAT 001	Зелено-коричневое	α	4	6
LAT 002	Зелено-коричневое	α	3	6
LAT 003	Зелено-коричневое	α	20	48
LAT 004	Окрашивания нет	β	3	32
LAT 005	Зелено-коричневое	α	12	5
LAT 006	Зелено-коричневое	α	2	2
LAT 007	Окрашивания нет	β	-	2
LAT 008	Зелено-коричневое	α	1	4
LAT 009	Окрашивания нет	β	6	40
LAT 010	Зелено-коричневое	α	-	1
LAT 011	Зелено-коричневое	α	30	32
BL 16-92	Зелено-коричневое	α	24	16
BL 16-13	Зелено-коричневое	α	24	8
BL 16-52	Зелено-коричневое	α	32	64
BL 16-931	Зелено-коричневое	α	12	24
BL 16-932	Зелено-коричневое	α	16	32

^аОпределяли на кровяном агаре, содержащем эритроциты человека (5%);

^бШтаммы культивировали в жидкой среде NBY 72 ч при 30 °С;

^вИспользовали метод спектрофотометрической регистрации гемоглобина.

Штаммы различались по гемолитической активности (оценивалась по титрам гемолизина) и были разделены на 3 группы – высокая гемолитическая активность 64-32 ГЕ (LAT 003, LAT 004, LAT 009, LAT 011, BL 16-52, BL 16-932), средняя 16-24 ГЕ (BL 16-92, BL 16-13, BL 16-931) и низкая 1-12 ГЕ (LAT 001, LAT 002, LAT 005, LAT 008, LAT 007, LAT 010) (табл. 12). Наиболее многочисленная группа штаммов с низкой активностью.

Было показано, что эритроциты крысы (5%) обладают большей чувствительностью к гемолизу, чем эритроциты человека (5%). Различия в гемолизе

эритроцитов крысы и человека могут быть обусловлены различиями (качественными или количественными) в химическом составе мембран (Кагава, 1985; Финенан с соав., 1977). Известно, что в мембранах эритроцитов крысы содержится больше фосфотидилхолина, чем в мембранах эритроцитов человека. В то же время в мембранах эритроцитов человека имеется больше сфингомиелина, чем в мембранах эритроцитов крысы. Таким образом, различная чувствительность эритроцитов двух видов может косвенно свидетельствовать о различном наборе гемолизинов в исследованных штаммах *B. laterosporus*.

Осмотическая протекция гемолитической активности. Для выявления механизма действия гемолизинов, продуцируемых штаммами *B. laterosporus* BL 16-52 и LAT 003, было проведено исследование зависимости гемолиза, вызываемого этими штаммами, от присутствия в среде осмопротектантов с различными гидродинамическими радиусами молекул (r_G). Были использованы два вида осмопротектантов: углеводороды (r_G от 0,31 до 0,48 нм) и гликоли и полигликоли (r_G от 0,46 до 2,83 нм). Установлено, что добавление осмопротектантов с r_G от 0,31 до 1,2 нм к смеси эритроцитов человека (5 %) и 96-ч культур BL 16-52 или LAT 003 (16 усл. ед. ГА) не ингибирует гемолитическую активность исследованных штаммов *B. laterosporus*. Добавление ПЭГ-4000 и ПЭГ-6000 к смеси эритроцитов человека (5%) и 96-ч культур BL 16-52 или LAT 003 (16 усл.ед ГА) ингибирует гемолитическую активность этих штаммов (рис. 15).

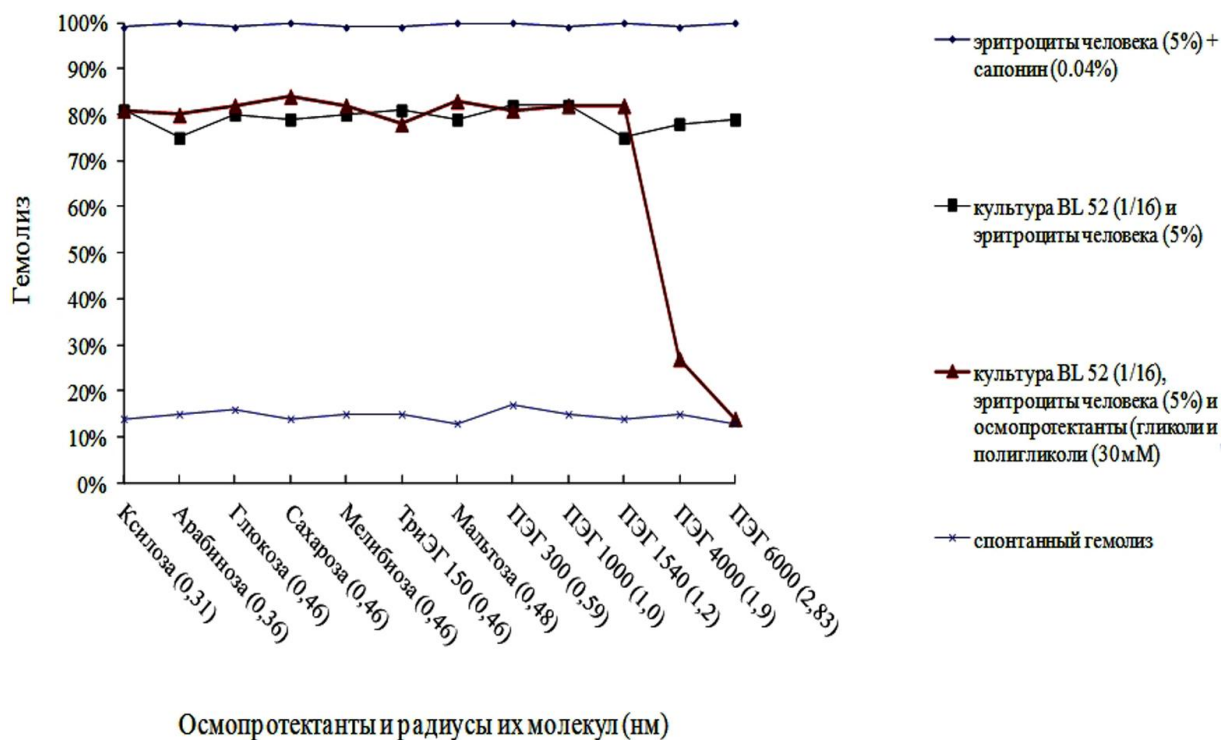


Рис. 15. Зависимость гемолиза эритроцитов человека, вызываемого действием штамма *B. laterosporus* BL 16-52 от действия осмопротектантов.

Таким образом, исследованные штаммы *B. laterosporus* обладают гемолитической активностью *in vitro* в разной степени. Гемолиз эритроцитов, вызываемый *B. laterosporus in vitro* может быть ингибирован действием осмопротектантов с гидродинамическими радиусами молекул более 2 нм.

Исследованные штаммы *B. laterosporus* имеют широкий спектр антагонистического действия. Чувствительность к *B. laterosporus* различных тест-объектов указывает на высокую биоцидную активность этой группы бактерий. Антагонистическое действие *B. laterosporus* является многофакторным и включает участие антибиотиков, бактериоцинов, ферментов.

ВЫВОДЫ

1. Исследованные штаммы *B. laterosporus* по своим культурально-биохимическим свойствам соответствуют группе *Bacillus*, относящихся к *Brevibacillus laterosporus*.
2. Впервые показана способность некоторых из исследованных штаммов *B. laterosporus* к синтезу кристаллов.
3. Впервые дана морфологическая характеристика кристаллообразующих штаммов *B. laterosporus*.
4. Очищенные кристаллы *B. laterosporus* обладают москитоцидной активностью.
5. Впервые определены молекулярные массы белков, входящих в состав кристаллов *B. laterosporus*.
6. Исследованные штаммы *B. laterosporus* обладают широким спектром антагонистического действия за счет синтеза антибиотиков и бактериоцинов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Орлова М.В., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н., Константинова Г.Е., Азизбекян Р.Р. Антибактериальная активность *Bacillus laterosporus*. - IV Конференция Российской Федерации. Новые направления биотехнологии. - Пущино. -1994. - С.35.
2. Орлова М.В., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н., Коваленко Н.А., Азизбекян Р.Р. Антибактериальная активность *Bacillus laterosporus*. Биотехнология. -1995. - N. 1-2, с. 22-26.
3. Орлова М.В., Смирнова Т.А., Григорьева Т. М., Шамшина Т.Н., Николаенко М. А., Азизбекян Р.Р. Антагонистические факторы *Bacillus laterosporus*. Конференция ГНИИГенетика. 1995.
4. Orlova M.V., Smirnova T.A., T. N. Shamshina, N. A. Kovalenko, Azizbekyan R.R. Plural biological activity of *Bacillus laterosporus*. 10-th International Conference on Global Impacts of Applied Microbiology and Biotechnology. Elsinore, Denmark. 1995.
5. Smirnova T.A., Minkova I.B., Orlova M.V., Lecadet M.-M. and Azizbekyan R.R. The crystalforming strains of *Bacillus laterosporus*. 1996. Res. microbiol. 147, 343-350.

6. Смирнова Т.А., Поглазова М.Н., **Орлова М.В.**, Азизбекян Р.Р. Ультраструктура спор и кристаллов *Bacillus laterosporus*. 1997. Биотехнология. - № 1, с. 29-36.
 7. **Орлова М. В.**, Смирнова Т. А., Ганушкина Л. А., Азизбекян Р. Р. Инсектицидная активность кристаллообразующих штаммов *Bacillus laterosporus*. Конференция ГНИИгенетика. 1997.
 8. **Orlova M. V.**, T. A. Smirnova, L. A. Ganushkina, V. Y. Yacubovich, R. R. Azizbekyan. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64:2723-2725.
 9. Azizbekyan R. R., **Orlova M. V.**, Ganushkina L. A., Lebedeva N. N. Larvicidal activity of non-crystalforming strains of *Bacillus laterosporus*. The 10th International Conference on Bacilli. Baveno, Italy. 1999.
 10. Азизбекян Р.Р., Смирнова Т.А., Николаенко М.А., Кузин А.И., Шамшина Т.Н., **Орлова М.В.**, Глез В.М., Деревягина М.К., Свентицкий Е.Н., Дронова Н.В. Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, обладающий широким спектром фунгицидного действия и биологический препарат для защиты клубней картофеля от грибных заболеваний в период хранения. Патент РФ №2242125, 2001.
 11. **Орлова М.В.**, Смирнова Т.А., Азизбекян Р.Р. Штаммы *Bacillus*, обладающие антагонистической активностью в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Успехи медицинской микологии, Москва, 2003, том 1, с. 104-105
 12. Азизбекян Р.Р., Овчинникова Т.В., Шамшина Т.Н., Тагаев А.А., Смирнова Т.А., Якименко З.А., Кузнецова Н.И., Арсеньев А.С., Кузин А.И., Соболев А.Г., ***Орлова М.В.** Циклодекапептидный антибиотик широкого спектра антагонистического действия латероцидин, штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, обладающий широким спектром антагонистического действия – продуцент латероцидина. Патент РФ № 2229520 (2004.05.27).
 13. M. V. **Zubasheva**, L. A. Ganushkina, T. A. Smirnova, and R. R. Azizbekyan. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, Vol. 46, No. 8, pp. 755–762.
 14. M. V. **Zubasheva**, L. A. Ganushkina, T. A. Smirnova, and R. R. Azizbekyan. Enhancement of larvicidal activity of *Brevibacillus laterosporus* by bioencapsulation in protozoa *Tetrahymena pyriformis* and *Entamoeba moshkovskii*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, Vol. 47, No. 8, pp. 762–766.
 15. Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Николаенко М.А., Сорокин В.В., **Зубашева М.В.**, Ганушкина Л.А., Азизбекян Р.Р. Характеристика спор и кристаллов *Brevibacillus laterosporus*. Биотехнология, 2011, № 6, с. 29-37.
- * - 12.11.2003 года сменила фамилию на Зубашеву в связи с регистрацией брака.