

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 595

Ս. Է. Թադևոսյան, Ն. Լ. Կազանչյան, Մ. Ա. Կինոսյան,
ակադեմիկ Է. Կ. Աֆրիկյան

Brevibacillus laterosporus как источник получения новых
биоинсектицидов и биологически активных веществ

(Представлено 20/X 2015)

Ключевые слова: микробиология, энтомопатогенные бактерии, инсектициды, параспорины, *B. laterosporus*.

Энтомопатогенные спорообразующие бактерии, продуцирующие кристаллоподобные белковые включения, представляют большой интерес в качестве источников получения эффективных биоинсектицидных препаратов. В СССР было организовано крупнотонажное производство инсектицидных препаратов БИП и БЛП, успешно использовавшихся в борьбе со многими вредоносными насекомыми, в основном чешуекрылыми и москитами – переносчиками опасных инфекций.

Научно-практический интерес к этим бактериям значительно возрос после установления в 2000-е гг. продуцирования кристаллоподобных белковых включений, обладающих канцеролитической активностью. Некоторые параспорины уже входят в клиническую практику для лечения раковых заболеваний. Интенсивно прорабатываются вопросы получения новых противораковых соединений на основе параспоринов и других противораковых препаратов белковой природы, продуцируемых другими микроорганизмами [1-4].

Среди бацилл особый интерес представляют энтомопатогенные бациллы, продуцирующие кристаллоподобные белковые включения, описанные в разные годы. Особый интерес проявляется к *Bacillus laterosporus*, описанным в 1912 г. Уайтом как *Bacillus Orpheus*. В последующем Макгрей и Уайт описали эту бациллу как патоген к пчелам, а Смит, Гордон и Кларк – как *Bacillus laterosporus* Laubach 1916 [5-8]. В настоящее время эта культура описывается как *Brevibacillus laterosporus* [9].

В СССР *B. laterosporus* был выделен и описан как компонент энтомогенной флоры медоносной пчелы и других насекомых с определенным интересом использования в качестве биоинсектицида против различных вредоносных насекомых [10-11]. К сожалению, инсектицидный спектр этих

культур, тем более канцеролитическая активность белковых включений не были изучены.

В Армении традиционно поддерживалось развитие микробиологии, что видно из описания основных этапов ее развития в республике. Для более детального представления потенциала Армении в этой области мы должны знать, что в тот период более 100 научных и конструкторских учреждений, многие отделения и лаборатории центральных институтов СССР были вовлечены в работы по фундаментальным и прикладным наукам.

Вехи развития микробиологии в Армении

- 1943. Создание сектора микробиологии, АН Арм. ССР.
- 1961. Организация Института микробиологии, АН Арм. ССР.
- 1972. - Ввод в эксплуатацию комплекса Института микробиологии, г. Абовян.
 - Ввод в эксплуатацию Завода лизина в Чаренцаване и
 - Завода биохимпрепаратов в Абовяне (*Главмикробиопрома СССР*).
 - Ввод в эксплуатацию Дрожжевого завода в г.Абовяне.
 - Организация производства витамина С на Витаминном заводе, Ереван/
- 1983. Создание Технологического института аминокислот, Ереван (*Главмикробиопрома СССР, в последующем – Институт биотехнологии*).
- 1988-1989. Спитакское землетрясение, распад СССР, экономический кризис.
- 1991. Завод по производству хлебопекарных дрожжей, Егвард.
- 1993. Организация Центра депонирования микробов НАН Армении.
- 2006. Организация Центра микробиологии и депонирования микробов НАН Армении (*на базе Института микробиологии и НАН Армении*).
- 2010. Организация н/п Центра “Армбиотехнология” НАН Армении (*на базе Института биотехнологии, Института микробиологии, Центра депонирования микробов*).
- 1976-1990. Космическая микробиология, Биодegradация полимеров.
- 1993-2011. Зарубежные гранты, контракты (Европа, США, Япония).
- 2002-2005. Проекты по космической микробиологии (НАСА, США и Европейское космическое агентство, ЕКА).

В данной работе использованы штаммы спорообразующих бактерий энтомогенного происхождения. В 2015 г. в различных районах Армении было обнаружено массовое поражение лиственных деревьев листоедом. В результате микробиологических анализов из разных образцов насекомых отрядов *Lepidoptera*, *Hemiptera*, *Mantodea*, *Dermaptera* были выделены и подробно охарактеризованы с молекулярным генотипированием 30 штаммов *B.laterosporus* (табл. 1).

Нами отобраны и испытаны на инсектицидную активность к листоеду 5 штаммов. Происхождение этих штаммов приведено в табл. 2. Все испытанные штаммы обладали выраженной активностью к листоеду и активно продуцировали кристаллоподобные белковые включения.

Таблица 1

Штаммы разных *Brevibacillus laterosporus*, систематизированные методом молекулярного генотипирования

Виды и подвиды по Euzеby *
<i>Bacillus foraminis</i> Tiago <i>et al.</i> 2006, sp. nov.
<i>Brevibacillus invocatus</i> Logan <i>et al.</i> 2002, sp. nov.
<i>Brevibacillus levickii</i> Allan <i>et al.</i> 2005, sp. nov.

* <http://www.bacterio.cict.fr> (J.P. Euzеby, *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2010)

Морфологические особенности. Вегетативные клетки *B.laterosporus* имеют палочковидную форму с закругленными концами, грамположительные. При споруляции раздувают спорангий (рис. 1). Параспоральные канозвидные включения прикреплены к одной стороне споры [12]. На агаризованной среде штаммы образуют плоские, гладкие колонии белого, бежевого цвета с ризоидными краями. Физиолого-биохимические особенности представлены в табл. 2, где подытожены данные ауксанографии по усвоению источников углеродного питания. Инсектицидная активность *B.laterosporus* была изучена на представителе отряда *Coleoptera*, семейство *Chrysomelidae*. У штамма 199-3 через 60 ч гибель была 100% (рис. 2).

При оценке антимикробной активности штаммов *B.laterosporus* у них был выявлен широкий спектр антимикробного действия, распространяющийся на другие виды *Bacillus* как грам(+), так и грам (-) бактерий [12-14].

Определение потребностей в источниках углерода проводили ауксанографическим методом. Испытаны 26 источников углерода. Опыт проводили на больших чашках Петри, на трех средах [15]. Суспензия культур бактерий из односуточного косяка с конечным титром около 100 тысяч клеток в 1 мл. Перед опытом среда растапливается и остужается до 40-45⁰. Затем добавляется готовая суспензия, тщательно перемешивается и разливается в чашки Петри. После остывания агара на поверхность его накладываются бумажные диски, пропитанные испытуемыми растворами. Учет результатов проводился спустя 24-48 ч при инкубации 28-30⁰ по наличию роста испытуемого штамма вокруг наложенных бумажных дисков, пропитанных растворами испытуемых источников углерода. По результатам опыта все 5 штаммов усваивают фруктозу, трегалозу, мальтозу (табл.2). Из них 4 штамма усваивают рибозу, глюкозу, маннозу. Из 26 источников углерода по результатам опыта испытуемыми штаммами *B.laterosporus* не усваиваются 11 источников углеродного питания. Концентрация вещества около 5 мг/мл.

Таблица 2.
Усвоение источников углеродного питания штаммами
Brevibacillus laterosporus

Источники углерода															
	L-,D-арабиноза, L-, D-ликоза, D-фукоза, L-рамноза, L-сорбоза	D-рибоза	D-глюкоза	D-фруктоза	D-манноза	Сахароза	D-целлобиоза	D-мелибиоза	D-трегалоза	D-мальтоза	D-раффиноза	D-меллезигоза, Инулин, D-сорбит	D-галактоза, L-лактоза, D-маннит, D-ксилит	Дульцит	DL-аргинин
Номера штаммов по ЦДМ и источник выделения															
194-1 <i>Lepidoptera</i> <i>Mimas tiliae</i> L. Липовый бражник, Польша	0	+15	+12	+25	+15	0	0	0	+12	+15	0	0	0	0	+8
199-3 <i>Heteroptera-Hemiptera</i> , Клоч, Бюракан, Армения	0	+5	+8	+5	+4	0	+4	0	+12	+10	0	0	0	0	0
105-1 <i>Mantodea</i> , Богомол, Армения	0	+20	0	+20	+20	0	0	0	+12	+25	0	0	0	0	0
209-3 <i>Dermaptera</i> <i>Forficula auricularia</i> L., Уховертка, Армения	0	+25	+15	+25	+20	0	+10	0	+12	+15	0	0	0	+9	0
186-1 <i>Lepidoptera</i> <i>Deilephila hippophaeis</i> Esp., Облепиховый бражник, Чехия	0	0	+15	+20	0	+5	+20	+10	+10	+15	+10	+5	0	0	0

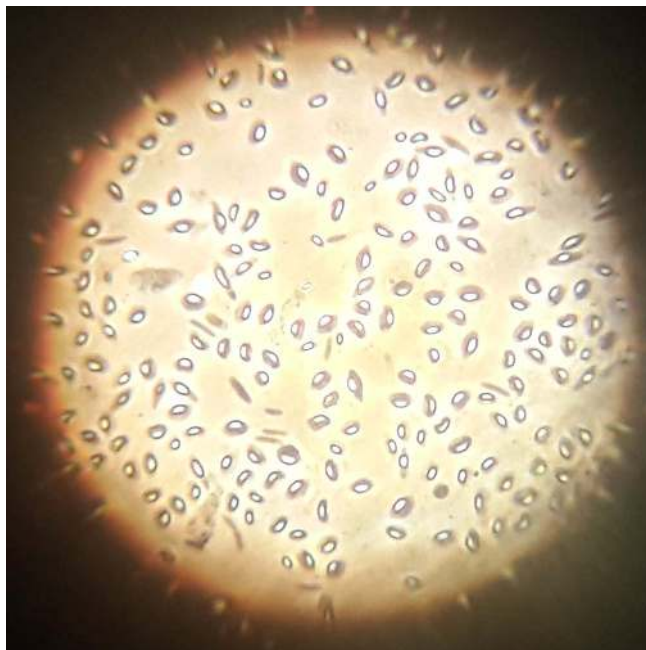


Рис. 1. 2-суточная культура *B.laterosporus* в оптическом микроскопе x 1000.



Рис. 2. Погибшие листоеды, сем. *Chrysomelidae*, натуральная величина

В результате проводимых работ выделено 30 штаммов, которые по морфо-физиологическим особенностям идентифицированы как *Brevibacillus laterosporus*. Спектр энтомопатогенного действия этих штаммов откры-

вает возможности для получения новых инсектицидных препаратов для борьбы с вредоносными насекомыми.

Центр депонирования микробов н/п центра “Армбиотехнология” НАН РА
e-mail: microbio@sci.am

**П. Е. Тадевосян, Н. Л. Казанчян, М. А. Киносян,
академик Э. К. Африкян**

***Brevibacillus laterosporus* как источник получения новых
биоинсектицидов и биологически активных веществ**

Обобщено развитие взглядов на таксономию и приведены основные особенности культур вида *Brevibacillus laterosporus* для практического применения в качестве биоинсектицидов, а также получения канцеролитических препаратов.

**Պ. Ե. Թադևոսյան, Ն. Լ. Ղազանչյան, Մ. Հ. Կինոսյան,
ակադեմիկոս Է. Գ. Աֆրիկյան**

***Brevibacillus laterosporus* -ը որպես նոր կենսաինսեկտիցիդների և
կենսաբանական ակտիվ նյութերի աղբյուր**

Ամփոփված են *Brevibacillus laterosporus* տեսակի կուլտուրաների դասակարգման և հիմնական առանձնահատկությունների զարգացման տվյալները՝ ինչպես նաև հակաքաղցկեղային պատրաստուկների ստացման համար:

**P. E. Tadevosyan, N. L. Ghazanchyan, M. H. Kinosyan,
academician E. G. Afrikian**

***Brevibacillus laterosporus* as the Source of Novel Bioinsecticides and
Biologically Active Substances**

The data concerning the study and use of *Brevibacillus laterosporus* bacilli as bioinsecticides for pest control and obtaining of cancerolytic substances are summarized.

Литература

1. Ohba M., Mizuki E., Uemori A. – Anticancer Research. 2009. V. 29. P. 427-434.
2. Ekino K., Okumura S., Ishikawa T., Kitada S., Saitoh H., Akao T., Oka T., Nomura Y., Ohba M., Shin T., Mizuki E. – Toxins. 2014. N 6. P. 1882-1895.
3. Okumura S., Koga H., Inouye K., Mizuki E. – Toxins. 2014. N 6. P. 2115-2126.
4. Xu Ch., Wang B-Ch., Yu Z., Sun M. – Toxins. 2014. N 6. P. 2732-2770.
5. White G. F. – United States Bur.Entomol.,Circ. 1912. N 157.
6. McCray A. H. – J. Agric. Research. 1917. 8. 399.
7. White G. F. – United States Dept. Agric., Bull. 1920. N 810.
8. Laubach C. A. – J. Bact. 1916. 1. P. 511.

9. *Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Komagaya K.* – Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 939-946.
10. *Яловицын М. В.* Энтомопатогенные микроорганизмы и применение их в борьбе с вредителями. Саранск. 1977. 160 с.
11. *Африкян Э.Г.* Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван. 1973. 420 с.
12. *Зубашева М. В.* Характеристика штаммов *Brevibacillus laterosporus* и продуцируемых ими биологически активных соединений. Автореф. канд. дис. Москва, 2012.
13. *Орлова М. В., Смирнова Т.А., Шамшина Т. Н., Коваленко Н.А., Азизбекян Р. Р.* – Биотехнология. 1995. N 12. С. 22-26.
14. *Orlova M. V., Smirnova T. A., Ganyshkina L. A., Yacubovich V. Y., Azizbekyan R. R.* – Appl. Environ. Microbiol. 1998. T. 64. С. 2723-2725.
15. *Pridham T. G., Gottlieb D.* – J. Bacteriol. 1948.V. 56. N 1. P. 107.