

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.6.83

Характеристика штамма *Brevibacillus laterosporus* В-13186 с широким спектром антагонистической активности

© 2019 А.И. КУЗИН¹, Н.И. КУЗНЕЦОВА^{1,*}, М.А. НИКОЛАЕНКО¹, О.В. БУНИНА¹, Р.Р. АЗИЗБЕКЯН^{1,**}

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика), Москва, 117545, Россия

*e-mail: nikuzn@genetika.ru

**e-mail: raziz@genetika.ru

Поступила в редакцию 18.12.2018 г.

После доработки 15.03.2019 г.

Принята к публикации 13.05.2019 г.

В результате скрининга спорообразующих бактерий отобран штамм В-13186 с широким спектром антагонистической активности, который по результатам анализа последовательностей переменных участков 16S рРНК идентифицирован как *Brevibacillus laterosporus*. Изучены морфологические и культурально-биохимические признаки штамма. Отличительной особенностью штамма является наличие каноевидного включения, образованного в спорангии и прикрепленного к зрелой споре, а также способность синтезировать кристаллические включения округлой формы. Показано, что штамм обладает антибактериальной активностью в отношении различных видов грамположительных бактерий, в том числе *Staphylococcus aureus* (MRSA), фунгицидной активностью в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma solanicola*, *Rhizoctonia solani* и *Botrytis cinerea* и альгицидной активностью в отношении микроводорослей *Nostoc* spp, *Anabaena* spp, *Microcystis* spp, *Chlorella* spp, *Amorphonostoc* spp. и *Synechocystis* spp.

Ключевые слова: *Brevibacillus laterosporus*, спорообразующие бактерии, микроводоросли, фитопатогенные грибы, кристаллические включения.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-11

Антагонистические взаимоотношения среди микроорганизмов являются предметом фундаментальных и прикладных исследований. Поиск новых штаммов-антагонистов является одной из актуальных задач биотехнологии. Бактерии *Bacillus* spp. могут рассматриваться как один из объектов, имеющих наибольший потенциал в системах поиска новых биологически активных соединений с широким спектром антагонистической активности. Ингибирующий эффект бактерий может быть обусловлен широким кругом соединений: низкомолекулярными антибиотиками, продуктами метаболизма, литическими агентами, ферментами, бактериоцинами. В качестве штаммов-про-

дуцентов биологически активных соединений используются различные виды спорообразующих бактерий – *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. safensis* и др. [1]. Среди них важное место занимают бактерии *Brevibacillus laterosporus*. Показано, что бактерии *B. laterosporus* способны к синтезу ферментов, инсектицидных факторов [2–4], продуцируют целый спектр антагонистических факторов, в том числе, обладающих антибактериальной, фунгицидной и альгицидной активностью [5–8], активностью против фито-, зоономатод и моллюсков [9–12]. Штаммы *B. laterosporus* применяют в качестве эффективных пробиотиков [13, 14].

Список сокращений: КСА – картофельно-сахарозный агар, КЖ – культуральная жидкость, КОЕ – колониеобразующая единица.

Отличительной особенностью штаммов *B. laterosporus* является наличие у них канозвидного включения, образованного в спорангии и прикрепленного к зрелой споре [15] и которое отсутствует у других спорообразующих бактерий. Ареал природного распространения этих бактерий весьма широк – их обнаруживают в воде, почве, в организмах животных и насекомых. Штаммы *B. laterosporus* обладают рядом биотехнологических преимуществ: растут на относительно дешевых питательных средах, не требуют специальных условий для культивирования, способны поддерживаться в лабораторных условиях в течение длительного времени, сохраняя свои уникальные свойства, а также не токсичны для теплокровных животных.

Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые фитопатогенными грибами, наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. В среднем, потери могут составить до 20% урожая. Кроме того, заражая культурные растения, грибы не только снижают урожайность, но и загрязняют их продуктами своей жизнедеятельности – микотоксинами, что ухудшает потребительские качества сельскохозяйственного пищевого сырья, его биологическую полноценность и безопасность для теплокровных организмов [16].

Микроскопические водоросли (фитопланктон) всегда присутствуют в открытой воде и в большой степени формируют ее качество. Фитопланктон является главным поставщиком первичного органического вещества большинства водоемов, обеспечивая все последующие пищевые цепи в водных экосистемах. В то же время, увеличение численности микроводорослей в водоеме может приводить к неблагоприятным последствиям, таким как «цветение» воды, накопление токсических продуктов, образованию многослойных структур – «матов». Разложение составляющих «мат» водорослей сопровождается выбросом в воду ряда токсических соединений (фенолы, индол, скатол). Высокая численность клеток микроводорослей при их отмирании может приводить к гипоксии и гибели всех аэробных организмов. Некоторые виды микроводорослей продуцируют специфические токсины, представляющие серьезную угрозу здоровью людей и животных [17, 18]. Снижение численности водорослей может быть достигнуто, в частности, путем использования биологических препаратов на основе различных видов спорообразующих бактерий [19].

Цель работы – проведение скрининга среди 12 штаммов *B. laterosporus* из лабораторной коллекции, обладающих широким спектром антагонистической активности в отношении фитопато-

генных грибов, бактерий и микроводорослей, и отбор штамма с выраженной фунгицидной, антибактериальной и альгицидной активностью, для создания на его основе биологического препарата. Планировалось изучить морфологические и культурально-биохимические признаки штамма, а также идентифицировать его на основе анализа последовательности 16S рРНК.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования

В работе использовали штаммы спорообразующих бактерий *Bacillus* spp., микроводорослей и фитопатогенных грибов из различных климато-географических регионов (коллекция Лаборатории биологически активных соединений, НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика). Штаммы бактерий из образцов клинического материала получены в Межклинической бактериологической лаборатории (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Штамм *Micrococcus luteus* NCIM B 13267 (Fleming strain 2665) получен в Лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха.

Среды и условия культивирования

Исследуемый штамм *B. laterosporus* В-13186 высевали на чашки Петри с агаризованной средой NB (HiMedia, Индия) следующего состава, г/л: пептон – 5,0, натрия хлорид – 5,0, мясной экстракт – 1,5, дрожжевой экстракт – 1,5, агар (Difco, США) – 17,0, дистиллированная вода – до 1 л; pH 7,4±0,2. Бациллы выращивали до появления отдельных колоний. Отсутствие посторонней микрофлоры оценивали визуально и с помощью световой микроскопии. Для приготовления посевого материала одну петлю исследуемого штамма стерильно вносили в стандартные микробиологические пробирки емкостью 50 см³ с 5 мл жидкой питательной среды (гидролизные дрожжи – 45,0 г (ЗАО Каннский биохимический завод); вода до 1 л; pH 7,2–7,4) и культивировали на качалке при 260 об/мин и температуре 30 °С в течение 14–16 ч. Затем содержимое пробирки стерильно вносили в стандартные стеклянные конические колбы Эрленмейера емкостью 750 см³ с 50 мл жидкой стерильной питательной среды на основе гидролизных дрожжей и культивировали в течение 72 ч на качалке (260 об/мин) при температуре 30 °С. Затем методом световой микроскопии устанавливали отсутствие посторонней микрофлоры в КЖ и определяли уровень спорообразования бацилл.

Культивирование тест-грибов и различных видов микроводорослей проводили как было описано ранее [20, 21].

Для культивирования тест-бактерий использовали бульон Мюллера-Хинтона (состав, г/л: вытяжка из говядины – 300; кислотный гидролизат казеина – 17,5; растворимый крахмал – 1,5; дистиллированная вода – до 1000 мл; pH 7,4±0,2) и агар Мюллера-Хинтона (состав, г/л: вытяжка из говядины – 300; кислотный гидролизат казеина – 17,5; растворимый крахмал – 1,5; агар – 17,0; дистиллированная вода – до 1000 мл; pH 7,3±0,2) (HiMedia).

Определение морфологических и культурально-биохимических свойств штамма *B. laterosporus* B-13186

Для исследования свойств штамма пользовались методами, описанными ранее [22, 23]. Световую микроскопию проводили с помощью микроскопа (Olympus CX-21, Япония).

Идентификация штамма *B. laterosporus* B-13186

Хромосомную ДНК выделяли с помощью набора реагентов «Проба-экспресс» («Синтол», Россия).

ПЦР проводили по стандартной методике [24] в следующем режиме: 95 °С – 3 мин; затем 35 циклов (95 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин. 30 с); затем 72 °С – 5 мин.

Для получения фрагментов, кодирующих 16S рРНК, использовали консервативные праймеры:

8f aga gtt tga tcc tgg ctc ag;

926g ccg tca att cct ttr agt tt.

Электрофоретическое разделение фрагментов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряжении 5 В/см в течение 40 мин («ДНК технология», Россия).

Секвенирование, сравнение секвенсов и построение деревьев родства

Секвенирование осуществлялось на автоматическом секвенаторе АЕ3000 (Applied Biosystems, США). Для анализа последовательностей использовали специализированную филогенетическую компьютерную программу Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Определение фунгицидной активности штамма *B. laterosporus* B-13186

Фунгицидную активность определяли по изменению линейной скорости роста гриба. В пробирке с 20 мл КСА, охлажденного до 55 °С, вно-

сили 20 мкл КЖ с титром $8,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, тщательно перемешивали и содержимое пробирки переносили в пластиковые чашки Петри диаметром 85 мм. После застывания агара агаровый блок диаметром 5 мм с 7-суточной культурой исследуемого гриба помещали в центр чашки. Засеянные чашки инкубировали в термостате при 24 °С. Диаметр выросших колоний гриба измеряли на вторые и пятые сутки (D_2 и D_5 , соответственно, мм) и рассчитывали среднюю двух перпендикулярных измерений, которую принимали за показатель роста гриба. В контроле гриб выращивали на КСА без внесения КЖ. Скорость линейного роста колоний гриба (A , %) определяли по формуле:

$$A = (D_5 - D_2) \cdot 100\%. \quad (1)$$

Определение антибактериальной активности штамма *B. laterosporus* B-13186

Для определения антибактериальной активности штамма методом диффузии в агар готовили суспензию тест-бактерий [25]. Тест-бактерии вносили в чашки Петри с 20 мл агара Мюллера-Хинтона и растирали шпателем по всей поверхности чашки. В вырезанные в агаре металлическим пробойником лунки диаметром 8 мм вносили по 150 мкл КЖ штамма. В качестве контрольных использовали лунки с питательной средой или стерильной дистиллированной водой. Чашки инкубировали 24 ч в термостате при 37 °С. Эффективность антибактериального действия штамма определяли по диаметру зоны торможения роста тест-культуры вокруг лунки.

Определение альгицидной активности штамма *B. laterosporus* B-13186

Для определения альгицидной активности штамма в опыте к тест-культурам микроводорослей добавляли КЖ (в контроле воду) в соотношении 1:5 и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность смеси на спектрофотометре (Spectronic Unicam, США) при длине волны 590 нм в нулевой момент времени и после совместной инкубации и определяли остаточную оптическую плотность по формуле:

$$ОП_0 = (ОП_T / ОП_Н) \cdot 100\%, \quad (2)$$

где $ОП_Н$ – начальная ОП, $ОП_T$ – ОП после инкубации в течение T ч.

Эффективность альгицидного действия штамма оценивали по снижению оптической

плотности, а также по изменению морфологии клеток микроводорослей, выявляемой при световой микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор штамма, обладающего фунгицидной, антибактериальной и альгицидной активностью

Известно, что спорообразующие бактерии рода *Bacillus* являются антагонистами различных микроорганизмов – грибов, бактерий, микроводорослей. Ингибирующее действие бацилл может осуществляться за счет образования комплекса ферментов, осуществляющих лизис клеточных стенок микроорганизмов, а также синтеза антибиотических веществ различной природы.

В результате скрининга спорообразующих бактерий был отобран штамм В-13186 с широким спектром антагонистической активности в отношении различных тест-микроорганизмов, который по культурально-морфологическим и биохимическим характеристикам отнесен к *Brevibacillus laterosporus* [22].

Культурально-морфологические и биохимические характеристики штамма *B. laterosporus* В-13186

При культивировании на агаризованной среде NB через 48 ч при температуре 30 °С штамм образует округлые колонии диаметром 3–5 мм светло-кремового цвета с гладкой поверхностью и неровными краями. Исследование морфологических особенностей штамма *B. laterosporus* В-13186 с помощью светового микроскопа выявило у них признаки, характерные для данного вида бактерий. Вегета-

тивные клетки имеют палочковидную форму размером (0,4–0,7) × (3,2–5,0) мкм, цепочек не образуют. Титр клеток штамма после культивирования в жидкой питательной среде на основе гидролизных дрожжей в течение 72 ч на качалке (260 об/мин) при температуре 30 °С составил 8,4·10⁸ КОЕ/мл. Штамм хорошо спорулирует в жидкой и на твердой питательной среде NB. В процессе споруляции штамм образует характерную канозвидную структуру (каноз), примыкающую к споре с одной из сторон. Свободные споры имеют эллиптическую форму. Размер спор (0,7–1,2) × (2,5–4,7) мкм. Помимо канозвидных включений в КЖ штамма обнаружены кристаллические включения округлой формы. Кристаллы штамма при лизисе спорангия высвобождаются отдельно от споры. Впервые способность к кристаллообразованию у бактерий вида *B. laterosporus* описана в 1996 г. [26, 27]. При изучении в данной работе биохимических признаков штамма *B. laterosporus* В-13186 было показано, что штамм образует каталазу, гидролизует эскулин, казеин и желатин. Не гидролизует крахмал и твин 80. Мочевину не расщепляет. Не образует кислоты из арабинозы, сахарозы, D-галактозы, D-ксилозы, D-лактозы. Образует кислоту из D-глюкозы, D-мальтозы, D-маннита, D-маннозы, фруктозы и салицина. Глюкозу сбраживает без газа. Образует лецитиназу и твин-эстеразу.

Идентификация штамма В-13186 с помощью анализа 16S рРНК

При секвенировании переменных участков 16S рРНК получена следующая собранная нуклеотидная последовательность для исследуемого штамма:

```

CCACGCGGATGCTTATTGCGTTAGCTGCGGCACTAAGGGTATTGAAACCCCTAA
CACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGGCCAGAAAGTCGCCTTTCG
CCTGTTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATAC
CACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGCTACACAGTTTCCAATGCGAACCGAGGTTGAG
CCTCGGGCTTTAACATCAGACTTACATAGCCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATA
ATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGTGGCTTTCCTCGTTAGGTACCGTCAAGGTGCTACCTTATTAAATAGCACT
GTTTCTTCCSTAACAACAAGAACTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCGTTACGCGG
CGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCG
TAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCAACCTCTCAGGTCG
GCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCG
CAGGCCCATCTGTAAGTGATAGCTTGCGCCATCTTCCGTTTCGCTTCAGGCGAAG
CAAACTCTATCCGGTATTAGCATAAGTTTCCCTATGTTATCCCAGTCTTACAGG
CAGGTTGCCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAGGGTCCGAAGACCCTCGCTC
GACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGATCCAACT

```

Степень гомологии нуклеотидной последовательности генов исследуемого штамма, кодирующих 16S рРНК, с последовательностью генов типовых штаммов близкородственных бактерий

The degree of homology of the nucleotide sequence of genes encoding 16S rRNA investigated strain with a sequence of typical strains of closely related bacteria

Штамм микроорганизма	Близкородственные бактерии	Степень гомологии
<i>Brevibacillus agri</i> (T)	DSM 6348T; AB112716	0,950
<i>B. reuszeri</i> (T)	DSM 9887T; AB112715	0,948
<i>B. parabrevis</i> (T)	IFO 12334T; AB112714	0,946
<i>B. invocatus</i> (T)	LMG 18962; AF378232	0,951
<i>B. levickii</i> (T)	type strain: LMG 22481T; AJ715378T	0,946
<i>B. ginsengisoli</i> (T)	Gsoil 3088; AB245376	0,962
<i>B. brevis</i> (T)	NBRC 15304; AB271756	0,952
<i>B. laterosporus</i> (T)	IAM 12465; D16271	0,996
<i>B. panacihumi</i> (T)	DCY35; EU383033	0,951
<i>B. fluminis</i> (T)	CJ71; EU375457	0,968

В табл. 1 приведены данные о степени гомологии нуклеотидной последовательности генов, кодирующих 16S рРНК, исследуемого штамма с последовательностью типовых штаммов близкородственных бактерий из коллекции ВКПИМ, полученные при помощи программы Ribosomal Database Project II.

На основании полученных данных было построено филогенетическое дерево с гомологичными штаммами (рис. 1).

По результатам молекулярно-генетической идентификации на основе анализа нуклеотидной последовательности генов, кодирующих 16S рРНК, исследуемый штамм отнесен к виду *Brevibacillus laterosporus*.

Большинство антагонистических факторов спорообразующих бактерий секретируются из клеток в процессе роста культуры. В работах [28, 29] показано, что антагонистическая активность обнаруживается в КЖ уже через 12 ч роста культуры и достигает максимума на стадии спорообразования. Для тестирования антагонистической активности использовали 72 ч КЖ штамма B-13186 с титром $8,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Фунгицидная активность КЖ штамма

Фунгицидную активность КЖ штамма *B. laterosporus* B-13186 определяли по изменению линейной скорости роста тест-грибов. Из табл. 2 и

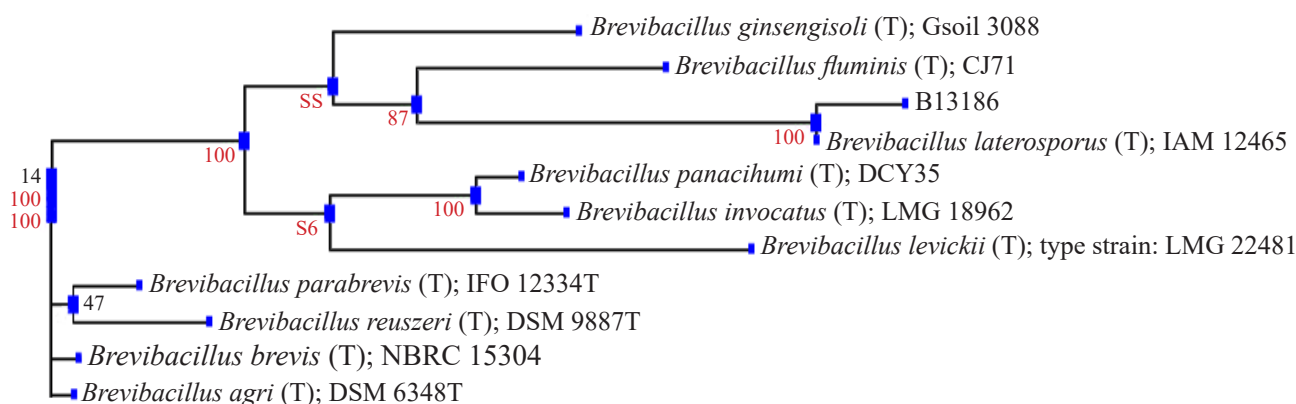


Рис. 1. Филогенетическое дерево, составленное на основе сравнения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих рибосомную РНК

Fig. 1. Phylogenetic tree based on analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA

Фунгицидная активность культуральной жидкости штамма *B. laterosporus* В-13186Fungicidal activity of cultural broth of the strain of *B. laterosporus* В-13186

Тест-грибы	$(D_5 - D_2)$, мм		V^* , % контроля
	контроль	опыт	
<i>Fusarium solani</i>	54,5±0,02	8,0±0,02	14,7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	64,3±0,15	32,1±0,15	51,0
<i>Phoma solanicola</i>	54,5±0,25	2,7±0,07	4,8
<i>Rhizoctonia solani</i>	34,4±0,30	3,6±0,03	10,5
<i>Botrytis cinerea</i>	65,2±0,59	16,5±0,02	25,3

Примечание: $(D_5 - D_2)$ – разница диаметра колоний гриба на 5-е и 2-е сутки.

*Контроль – 100%

Note: $D_5 - D_2$ – difference between the diameter of colonies of the fungi on the fifth and second day. V – growth rate of the fungi colony.

*Control – 100%

рис. 2, следует, что КЖ штамма В-13186 обладает выраженной активностью на исследуемых тест-грибах.

Антибактериальная активность КЖ штамма

Как следует из табл. 3, культуральная жидкость штамма В-13186 обладает широким спек-

тром антибактериальной активности. Эффективность фунгицидного действия определяют по диаметру зоны торможения роста фитопатогенного гриба вокруг лунки (мм). Контроль – отсутствие зоны роста гриба вокруг контрольной лунки.

Следует отметить активность КЖ в отношении бактерий, выделенных из клинического материала – *Acinetobacter baumannii* и

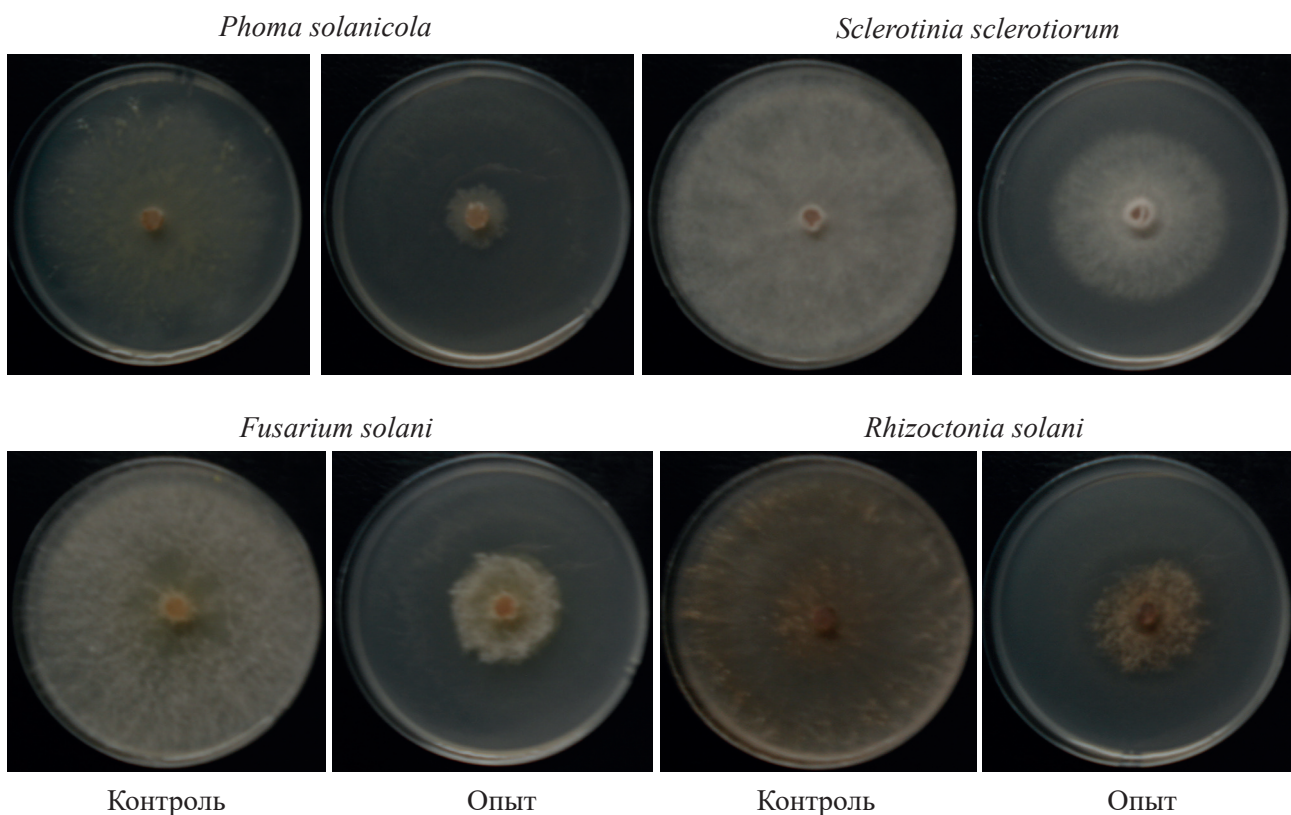


Рис. 2. Влияние культуральной жидкости штамма *B. laterosporus* В-13186 на скорость линейного роста фитопатогенных грибов.

Fig. 2. The influence of the cultural broth of the strain of *B. laterosporus* В-13186 on the rate of linear growth of phytopathogenic fungi

Таблица 3

Антибактериальная активность культуральной жидкости штамма *Brevibacillus laterosporus* B-13186

Antibacterial activity of cultural broth of the strain *Brevibacillus laterosporus* B-13186

Тест-бактерии	Диаметр зоны торможения роста тест-бактерии вокруг лунки, мм
<i>Enterococcus faecalis</i> 765*	16,3±0,03
<i>Acinetobacter baumannii</i> 445*	15,1±0,04
<i>Escherichia coli</i> 107*	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 547*	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 505*	–
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 918*	17,6±0,05
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 13267	19,3±0,04
<i>Brevibacillus cereus</i> 569	14,2±0,03
<i>B. amyloliquefaciens</i> 1842	15,3±0,04
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> 69-6	15,5±0,02
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> 98	15,1±0,01
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> 1-T	15,0±0,01
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> 79-31	15,4±0,04
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1-5	15,3±0,04
<i>B. pumilus</i> B-13176	14,7±0,01
<i>R. rhodochrous</i> B3043	15,5±0,02
<i>B. laterosporus</i> 525	14,4±0,01

Примечание: (–) – отсутствие зоны торможения роста (no growth inhibition zone).

*Штамм из клинического материала (strain from clinical material).

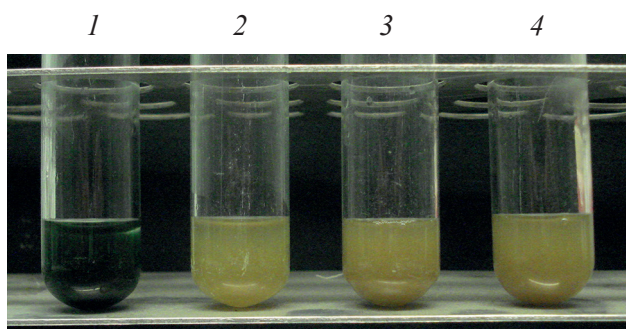


Рис.3. Альгицидная активность культуральной жидкости штамма *B. laterosporus* B-13186 на тест-культурах микроводорослей: 1 – контроль (*Anabaena* spp. + питательная среда); 2 – *Anabaena* spp. + КЖ; 3 – *Nostoc* spp. + КЖ; 4 – *Cosmarium* spp. + КЖ

Fig. 3. Algicidal activity of cultural broth of the strain *B. laterosporus* B-13186 on microalgae cultures: (1) control (*Anabaena* spp.+ culture medium); (2) *Anabaena* spp.+ cultural broth; (3) *Nostoc* spp.+ cultural broth; (4) *Cosmarium* spp.+ cultural broth.

Staphylococcus aureus (MRSA), которые входят в число наиболее опасных для здоровья человека бактерий в связи с их высокой устойчивостью к антибиотикам [30].

Определение альгицидной активности КЖ штамма *B. laterosporus* B-13186

Для определения альгицидного действия КЖ штамма B-13186 использовали различные виды микроводорослей. Из полученных данных следует, что штамм обладает широким спектром альгицидного действия. Критерием альгицидного эффекта было снижение величины остаточной оптической плотности (ОП₀) смеси культур микроводорослей и культуральной жидкости через 24 ч инкубации, по сравнению с контролем (100%):

	%
<i>Nostoc</i>	12,3
<i>Anabaena</i>	11,5
<i>Microcystis</i>	50,0
<i>Cosmarium</i>	50,3
<i>Chlorella</i>	35,5
<i>Amorphonostoc</i>	58,3
<i>Synechocystis</i>	60,1

а также изменение окраски (рис. 3) и морфологии клеток микроводорослей, регистрируемое в оптическом микроскопе. КЖ штамма B-13186 блокирует работу фотосинтетического аппарата микроводорослей, что приводит к прекращению деления клеток и их лизису.

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что КЖ штамма *B. laterosporus* B-13186 обладает выраженной антибактериальной, фунгицидной и альгицидной активностью в отношении различных тест-микроорганизмов. Штамм *B. laterosporus* B-13186 может быть использован для создания на его основе биологического препарата с широким спектром антагонистической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азизбекий Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений. *Биотехнология*, 2013, 1, 69–77. doi: 10.21519/0234-2758-2013-1-69-77
2. Favret E.M., Yousten A.A. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1985, 45, 195–203.
3. Rivers, D.B., Vann C.N., Zimmack H.L., et al. Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991, 58, 444–447.

4. Ruiu L., Delrio G., Ellar D.J., et al. Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomol. Exp. Appl.*, 2006, 118, 137–144.
5. Gerard J.M., Haden P., Kelly M.T., et al. Loloatins A–D, cyclic decapeptide antibiotics produced in culture by a tropical marine bacterium. *J. Nat. Prod.*, 1999, 62, 80–85.
6. Barsby T., Kelly M.T., Andersen R.J. Tupuseleiamides and basiliskamides, new acyl dipeptides and antifungal polyketides produced in culture by a *Bacillus laterosporus* isolate obtained from a tropical marine habitat. *J. Nat. Prod.*, 2002, 65(10), 1447–1451.
7. Chandel S., Allan E.J., Woodward S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. *J. Phytopathol.*, 2010, 158, 470–478.
8. Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Николаенко М.А., Смирнова Т.А., и др. Альгицидная активность штамма *Brevibacillus laterosporus*. *Биотехнология*, 2006, 4, 45–49.
9. Singer S., Van Fleet L., Viel J.J., Genevese E.E. Biological control of the zebra mussle *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 18, 226–231.
10. 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, 70, 6657–6664.
11. Huang X., Tian B., Niu Q., et al. An extracellular protease from *Bacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res. Microbiol.*, 2005, 156(5–6), 719–727.
12. Baoyu T., Jinki Y., Lihui L., et al. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2007, 74(2), 372–380.
13. Sanders M.E., Morelly L., Tompkins T.A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2002, 2, 101–110.
14. Desjardine K., Pereira A., Wright H., et al. Tauramide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *J. Nat. Prod.*, 2007, 70(12), 1850–1853.
15. Hannay C.L. The parasporal body of *Bacillus laterosporus* Laubach. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1957, 3, 1001–1010.
16. Монастырский О.А. Опасные грибы. Сельскохозяйственные аспекты исследований фитопатогенных токсинобразующих грибов. *Агро XXI*, 1998, 10, 18–19.
17. Collins M. Algal toxins. *Microbiol.Rev.*, 1978, 42, 725–746.
18. Carmichael W.W. The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.*, 1997, 27, 211–256.
19. Lee T.J., Nakano K., Matsumura M. A novel strategy for cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation. *Water Sci. Technol.*, 2002, 46, 207–215.
20. Кузин А.И., Тагаев А.А., Овчинникова Т.В., и др. Изучение штамма *Bacillus pumilus* В-13176, метаболиты которого обладают фунгицидной и антибактериальной активностью в отношении *Aspergillus niger* и *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Биотехнология*, 2018, 34(3), 23–32. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-23-32
21. Кузнецова Н.И., Азизбекян Р.Р., Колюхов И.В., и др. Подавление процессов фотосинтеза цианобактерий и планктонных водорослей метаболитами бактерий *Brevibacillus laterosporus*. *ДАН*, 2008, 421(2), 262–266.
22. Определитель бактерий Берджи. Под редакцией Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Изд-во Мир, 1997, Т.2, 368.
23. Методы общей бактериологии. Под редакцией Ф. Герхардта. М.: Изд-во Мир, 1984, Т.1., 536.
24. Innis M., Gelfand D., Sninsky J. *PCR Protocols. A Guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, Inc., 1990, 14–15.
25. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2001, 3(4), 348–354.
26. Smirnova, T.A., Minenkova, I.B., Orlova, M.V., et al. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Res. Microbiol.*, 1996, 147, 343–350. 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, 46, 755–762.
27. Усманов В.И., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И. и др. Особенности биосинтеза антимикотических соединений штаммом *Bacillus subtilis* ИБ-54 – антагонистом грибов-дерматофитов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, 2010, 1, 231.
28. Awais M., Pervez A., Qayyum S., Saleem M. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. *African J. Microbiol. Res.*, 2008, 2, 114–119.
29. Ефименко Т.А., Ефременкова О.В., Демкина Е.В., и др. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики – эффективные продуценты антибиотиков. *Микробиология*, 2018, 87(5), 573–580.

Characteristics of *Brevibacillus laterosporus* B-13186 Strain with Wide Spectrum of Antagonistic Activity

A.I. KUZIN¹, N.I. KUZNETSOVA^{1,*}, M.A. NIKOLAENKO¹, O.V. BUNINA¹, R.R. AZIZBEKYAN^{1,**}

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

*e-mail: nikuzn@genetika.ru

**e-mail: raziz@genetika.ru

Received December 18, 2018

Revised March 15, 2019

Accepted May 13, 2019

Abstract—As a result of screening of spore-forming bacteria, a B-13186 strain with a wide spectrum of antagonistic activity identified as *Brevibacillus laterosporus* by the analysis of sequences of variable sites of 16S rRNA was selected. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the strain were studied. A distinctive feature of the strain is the presence of a canoe-like inclusion formed in sporangia and attached to the mature spore, as well as the ability to synthesize round-shaped crystalline inclusions. The strain was shown to be active against various species of gram-positive bacteria including *S. aureus* (MRSA), against phytopathogenic fungi *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma solanicola*, *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea* and against microalgae *Nostoc* spp., *Anabaena* spp., *Microcystis* spp., *Chlorella* spp., *Amorphonostoc* spp. and *Synechocystis* spp.

Key words: *Brevibacillus laterosporus*, spore-forming bacteria, microalgae, phytopathogenic fungi, crystalline inclusions.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-3-11