

УДК 54:551.51:578.832:66-91.38

## Инсектицидная, антимикробная и противовирусная активность штаммов *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*, выделенных из атмосферных аэрозолей юга Западной Сибири

И.С. Андреева<sup>1</sup>, А.С. Сафатов<sup>1</sup>, О.С. Мокрушина<sup>1</sup>, Г.А. Буряк<sup>1</sup>,  
Л.И. Пучкова<sup>1</sup>, Н.А. Мазуркова<sup>1</sup>, Л.И. Бурцева<sup>2</sup>, Г.В. Калмыкова<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
633159, Новосибирская обл., пос. Кольцово

<sup>2</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН  
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11

<sup>3</sup>Сибирский научно-исследовательский институт переработки  
сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии  
630501, Новосибирская обл., пос. Краснообск

Поступила в редакцию 4.03.2014 г.

Представлены данные по инсектицидной, антимикробной и противовирусной активности штаммов *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), выделенных при микробиологическом исследовании высотных и наземных образцов атмосферного аэрозоля, взятых на юге Западной Сибири. Из числа 36 выделенных бактерий, определенных как относящиеся к виду *Bt*, по результатам внутривидового тестирования 15 штаммов отнесены к подвиду *Bt ssp. kurstaki* и исследованы на наличие антагонистических признаков. Несмотря на длительное витание в экстремальных условиях в составе атмосферных аэрозолей, включая высотные (до 7 км), выделенные штаммы *Bt ssp. kurstaki* сохранили высокую, свойственную для этого подвида, энтомопатогенную активность, обладали способностью ингибировать размножение таких патогенных микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans* и др., и проявили способность к эффективной нейтрализации размножения вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1) и вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (A/H3N2). Свойства выделенных из атмосферных аэрозолей штаммов *Bt* не только подтвердили их известную устойчивость к неблагоприятным факторам среды, энтомопатогенную и антимикробную активность, но и показали возможность их использования для разработки противовирусных препаратов.

**Ключевые слова:** атмосферные аэрозоли, *Bacillus thuringiensis*, активность инсектицидная, антимикробная, противовирусная; atmospheric aerosols, *Bacillus thuringiensis*, insecticidal, antimicrobial, antiviral activity.

### Введение

Микроорганизмы, обнаруживаемые в атмосферных аэрозолях, как биологические объекты имеют большое значение с точки зрения задач эпидемиологии и экологии, могут быть интересны для биотехнологии в качестве продуцентов биологически активных веществ. Особое значение имеют патогенные и условно патогенные микроорганизмы как потенциально опасный для человека компонент

атмосферного аэрозоля, способный оказывать влияние на здоровье населения, вызывать инфекционные заболевания [1–3]. Знание характеристик микробиологических компонентов атмосферного аэрозоля необходимо также для решения ряда проблем экологии и прикладной микробиологии.

Способность микроорганизмов аэрозолей к выживанию в экстремальных условиях, обусловленная наличием специфических свойств, вызывает к ним интерес ученых не только прикладных, но и фундаментальных областей науки. Бактерии вида *Bacillus thuringiensis*, также обнаруживаемые в аэрозолях воздуха, известны прежде всего как энтомопатогены. Антагонистическая активность бактерий этого вида обусловлена преимущественно присутствием кристаллических включений, состоящих из инсектицидных белков (Сгу-белков) или дельта-эндотоксинов. К настоящему времени описано несколько десятков

\* Ирина Сергеевна Андреева (andreeva\_is@vector.nsc.ru); Александр Сергеевич Сафатов (safatov@vector.nsc.ru); Ольга Сергеевна Мокрушина (karyachkina\_os@vector.nsc.ru); Галина Алексеевна Буряк (buryak@vector.nsc.ru); Лариса Ивановна Пучкова (puchkova@vector.nsc.ru); Наталья Алексеевна Мазуркова (mazurkova\_NA@vector.nsc.ru); Людмила Ивановна Бурцева (burtseva@ngs.ru); Галина Васильевна Калмыкова (gvkalmuk@mail.ru).

подвидов *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), продуцирующих большое разнообразие Cry-белков и других соединений, отличающихся между собой по специфичности действия на биологические объекты [4, 5]. Большинство энтомоцидных белков имеют молекулярную массу 130–145 кДа. Попадая в кишечник насекомых, они подвергаются действию присутствующих там протеиназ, образуя устойчивые к дальнейшему протеолизу фрагменты 60–70 кДа – так называемые «истинные токсины», взаимодействующие с мембранным белком – рецептором клеток эпителия кишечника пораженного насекомого. Молекулы токсина образуют в клеточной мембране поры или ионные каналы, работа пищеварительной системы насекомого нарушается, зараженные *Bt* насекомые прекращают питаться и погибают [6, 7].

На основе кристаллов и спор *Bt* выпускается более 80% всех производимых в мире биоинсектицидов, в их числе такие препараты, разрешенные к применению в России, как лепидоцид, битоксициллин, новодор FC и форея 48 В. Препараты на основе *Bt* выпускаются в виде порошка, жидкости, суспензионного и суспензионно-масляного концентратов. Последние получили широкое распространение в практике защиты леса для проведения крупномасштабных авиационных обработок аэрозольным способом. Известна антимикробная активность штаммов *Bt* [8–10], тем не менее поиск новых токсинов *Bt* новой специфичности или более выраженной токсичности по отношению к микроорганизмам или насекомым является весьма актуальным, так как многие микробные патогены и насекомые-вредители не контролируются доступными в настоящее время средствами.

В то же время известны публикации о неблагоприятных последствиях аэрозольного применения биопрепаратов на основе *Bt* для здоровья человека, связанных с аллергическими реакциями и другими нарушениями здоровья (одышка, кашель, диарея и др.) [11, 12]. В обзоре А. Bravo с соавт. [11] приведены достоинства и недостатки применения биоинсектицидов на основе *Bt* в виде аэрозолей.

В [13–17] показано, что в приземном слое атмосферы на высоте до 7000 м присутствует большое разнообразие жизнеспособных микроорганизмов. В образцах атмосферных аэрозолей юга Западной Сибири, взятых в разное время и на разной высоте, в числе обнаруженных микроорганизмов выявлены спорообразующие бактерии, формирующие в клетках параспоральные кристаллы, идентифицированные как принадлежащие к энтомопатогенному виду *Bt*.

В настоящей статье приводятся данные по фенотипическим признакам выделенных из атмосферных аэрозолей штаммов *Bt*, определению их инсектицидной, антимикробной, ферментативной активности, а также способности исследуемых штаммов к нейтрализации размножения вирусов гриппа на чувствительной культуре клеток. Работа выполнена в рамках многолетнего мониторинга состава и разнообразия биологической компоненты атмосферных аэрозолей воздуха Западной Сибири.

## Материалы и методы

Для отбора проб атмосферных аэрозолей использовали импинджеры с расходом примерно 50 л/мин, в которые в качестве сорбирующей жидкости заливали 50 мл раствора Хенкса (ICN Biomedicals). Высотные пробы аэрозолей отбирали с помощью лаборатории «Оптик-Э», смонтированной на базе самолетов Ан-30 или Ту-154. Трасса полета протяженностью 50 км проходила над Караканским бором (Новосибирская область, правый берег р. Оби). В дневное время самолет последовательно пролетал над лесным массивом на высоте 7, 5,5, 4, 2, 1,5, 1 и 0,5 км. Наземные пробы воздуха отбирали на площадках, расположенных на территории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и в пос. Ключи Новосибирской области.

**Выделение и идентификация микроорганизмов.** Отобранные пробы из импинджеров высевали на селективные питательные среды, позволяющие выявить микроорганизмы, принадлежащие к различным таксономическим группам [18, 19]. Индивидуальные колонии бактерий, выросшие на агаризованных средах, использовали для получения чистых культур и последующего их анализа. Морфологию клеток микроорганизмов исследовали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа Axioskop 40 (фирма «Carl Zeiss», Германия). Изучение физиологических и биохимических свойств штаммов, проведение косвенных тестов на патогенность выполняли стандартными методами [18, 19]. Чувствительность к антибиотикам изучали с помощью дисков производства НИЦФ (Санкт-Петербург, Россия). Выделенные штаммы микроорганизмов хранили при низкотемпературном замораживании в коллекции природных изолятов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

**Определение инсектицидной активности** проводили на лабораторных линиях насекомых, поддерживаемых в ИСиЭЖ СО РАН, представителей трех отрядов: *Lepidoptera* (*Hyponomeuta evonymellus*), *Coleoptera* (*Leptinotarsa decemlineata*) и *Diptera* (*Aedes aegypti*) методом «быстрого скрининга» согласно [4].

**Антимикробные свойства водорастворимых метаболитов штаммов *Bt*** определяли методом отсроченного антагонизма по Fredericq [20] с использованием патогенных тест-штаммов *Staphylococcus aureus* 6646, *Salmonella thyphimurium* 2606, *Shigella sonnei* 32, *Candida albicans* 620, *Bacillus subtilis* 6644, *Escherichia coli* 6645 и ряда других патогенов из «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»».

**Приготовление препарата для тестирования на противовирусную активность.** Культуральную жидкость (КЖ) штамма *Bt*, нарабатываемую в течение 18 ч на термостатированной качалке при температуре 30 °С, освобождали от клеток центрифугированием, стерилизовали ультрафильтрацией через фильтры Whatman и тестировали на противовирусную активность. Хранили фильтраты КЖ до использования при температуре минус 18–20 °С.

*Определение токсичности и противовирусной активности препарата.* Для тестирования токсичности и противовирусной активности препаратов использовали штаммы вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1) и вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (A/H3N2) из «Коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»» и чувствительную к ним перевиваемую культуру клеток МДСК, полученную из «Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»» с применением методики, описанной ранее [21].

## Результаты и обсуждение

В исследованных образцах аэрозолей воздуха, взятых на разных высотах (от 0,5 до 7 км), обнаружены микроорганизмы, относящиеся к широкому спектру родов и видов, таких как *Brevibacillus*, *Kocuria*, *Brevundimonas*, *Deinococcus*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Candida* и др. Число микроорганизмов в разных образцах составляло от <1 до  $5 \cdot 10^4$  кл/мл пробы. В пробах аэрозолей обнаружено также 36 бактериальных изолятов, формирующих при споруляции параспоральные включения разной формы: Ag 100-04, Ag 118-17, Ag 32-04, Ag 2-18, Ag 31-04, Ag 5-18, Ag 5-15, Ag 18-15, Ag 24-17, Ag 41-18, Ag 0901-40, Ag 0901-24, Ag 50-04, Ag 78-04, Ag 63-04, Ag-110-24, Az-513 и др. (рис. 1).

*Морфологические и биохимические признаки.* В табл. 1 и 2 приведены данные, полученные для штаммов бацилл, выделенных из атмосферных аэрозолей, по совокупности определенных внутривидовых характеристик, отнесенных к виду *Bacillus thuringiensis*, подвиду *Bt ssp. kurstaki*, широко используемому на практике в качестве основы инсектицидных препаратов.

Как характерно для подвида *Bt ssp. kurstaki*, исследуемые штаммы имели Н-антиген 3abc, образовывали ромбовидные кристаллы, преимущественно крупные и дополнительно — мелкие бесформенные включения. Клетки давали положительную лицевую реакцию и реакцию на уреазу, образовывали кислоту из салцидина, но не маннозы и сахарозы, восстанавливали нитраты, были положительны в реакциях VP и MR, секретировали в среду каталазу, оксидазу, амилазу (12 из 16 штаммов), казеиназу, желатиназу, уреазу. Из углеводов утилизировали глюкозу, мальтозу, но не арабинозу, ксилозу, манит, сахарозу и лактозу. Клетки этих штаммов не образовывали сероводород и индол и не утилизировали цитрат. Выделенные штаммы *Bt* обладали высокоактивной лецитиназой и, за исключением штаммов *Bt* Ag 5-18 и *Bt* Ag 18-15, липазной активностями, т.е. ферментами, наряду с протеазами и хитиназой, рассматриваемыми как факторы патогенности [4], облегчающие размножение микроорганизма-патогена в организме-хозяине (табл. 2).

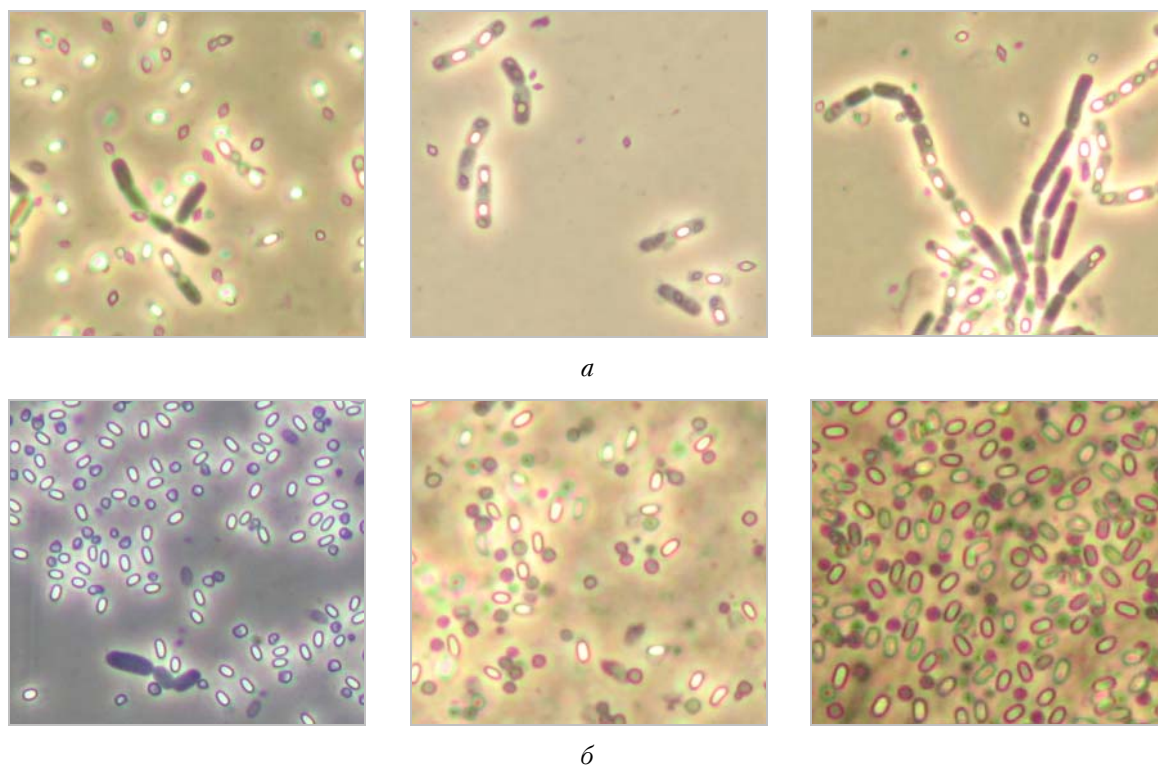


Рис. 1. Разнообразие кристаллов, формируемых штаммами *Bt*, выделенными из атмосферных аэрозолей, фазовый контраст,  $\times 2500$ . Штаммы *Bt ssp. kurstaki*, образующие бипирамидальные (ромбовидные) кристаллы токсина (а); штаммы *Bt*, образующие округлые и полиморфные кристаллы токсина (б)

Таблица 1

## Внутривидовая характеристика исследуемых спорообразующих штаммов, формирующих параспоральные кристаллы

Штамм	Н-антиген	<i>Bt</i> ssp.	Морфология кристаллов	<i>Micrococcus lysodekcticus</i>	ЛВР	Уреаза	Кислота из			Пигмент
							маннозы	салицина	сахарозы	
Ar 100-04	Zabc	<i>kurstaki</i>	КР + мелкие бесформенные	—	+	+	—	+	—	—
Ar 78-04	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 5-15	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 32-04	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 50-04	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 18-15	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 63-04	»	»	»	—	—	+	—	+	—	—
Ar 5-18	»	»	»	—	—	+	—	+	—	—
Ar 31-04	»	»	КР	—	+	+	—	+	—	—
Ar 118-17	»	»	»	—	+	+	—	+	—	—
Ar 2-18	»	»	ромбовидные	—	+	+	—	+	—	—
AK-5	»	»	ромбовидные	—	+	+	—	+	—	—

Примечание. «+» положительное проявление признака; «-» отрицательная реакция; КР – крупные ромбовидные (биширамидальные) кристаллы; ЛВР – лицетовицелазная реакция.

Таблица 2

## Биохимические признаки исследуемых спорообразующих штаммов, формирующих параспоральные кристаллы

Штамм	Восстановление нитратов	Реакция VP	Реакция MR	Фермент							Индол	H <sub>2</sub> S	Уреаза	Цитрат	Утилизация углеводов							
				каталаза	оксидаза	амилаза	лецитиназа	липаза	казеиназа	желатиназа					арабиноз	ксилоза	маннит	глюкоза	сахароза	лактоза	мальтоза	
Ar 100-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 118-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 32-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 2-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 31-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 5-18	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 5-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 18-15	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 24-17	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 41-18	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 0901-40	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 0901-24	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 50-04	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 78-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
Ar 63-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+
AK-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+

Примечание. «+» положительная реакция; «-» отрицательная реакция.

Следует отметить, что все штаммы *Bt*, выделенные из аэрозолей, были высокоустойчивы к ряду широко применяемых антибиотиков, таких как пенициллин, ампициллин, полимиксин и карбенициллин, чувствительны к 12 из 17 других антибиотиков, в том числе к олеандомицину, левомецитину, эритромицину и стрептомицину.

*Наличие плазмидных ДНК.* Исследование выделенных штаммов *Bt* показало, что все они содержали плазмиды (от 3 до 7), что хорошо согла-

суется с данными литературы о наличии в кристаллообразующих штаммах *Bt* «плазмидных комплексов», включающих от 2 до 17 плазмид, отвечающих за реализацию множества функций клеток штаммов *Bt* (синтез токсинов, продукцию бактериоцинов, регуляцию споруляции и др.) [22, 23]. По данным электрофоретического анализа, состав плазмидных ДНК во всех штаммах варьировал незначительно, за исключением штамма Ar 22-15 (дорожка 8, рис. 2).

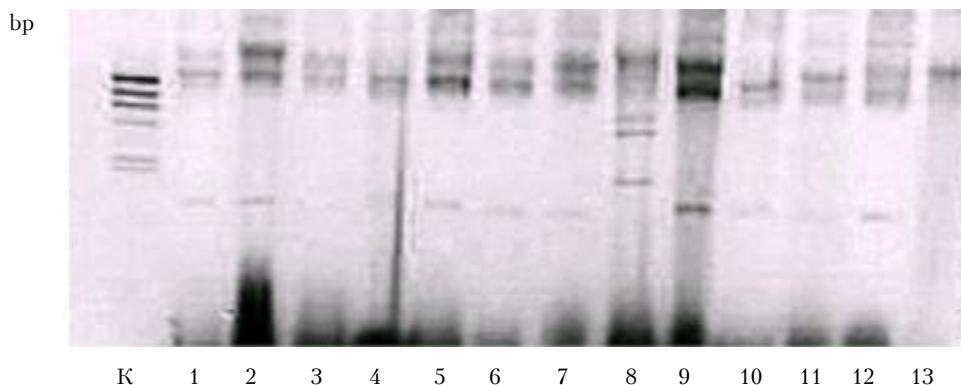


Рис. 2. Электрофореграмма плазмидных ДНК исследуемых штаммов *Bt*: 1 – Ar 32-04, 2 – Ar 78-04, 3 – Ar 2-18, 4 – Ar 63-04, 5 – Ar 18-15, 6 – Ar 100-04, 7 – Ar 22-15, 8 – Ar 118-17, 9 – Ar 5-18, 10 – Ar 31-04, 11 – Ar 5-15, 12 – Ar 41-18, 13 – Ar 41-18, К – контроль-HindIII/ $\lambda$  (фрагменты – 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 bp)

**Инсектицидная активность.** Все исследуемые штаммы, определенные как *Bt ssp. kurstaki*, принадлежали к морфовару R, продуцирующему крупные бипирамидальные кристаллы с дополнительными включениями, токсичные не только для чешуекрылых насекомых, но и для комаров. Штаммы *Bt ssp. kurstaki*, выделенные из атмосферных аэрозолей, по высокому уровню инсектицидной активности в отношении представителей отрядов *Lepidoptera* (*Hyponomeuta evonymellus*) и *Diptera* (*Aedes aegypti*) были сравнимы с производственным штаммом *Bt ssp. kurstaki* K-1 (табл. 3). Наиболее активные штаммы *Bt ssp. kurstaki* Ar 100-04, Ar 18-15 и Ar 2-18 и ряд других могут быть рекомендованы для разработки инсектицидных препаратов, контролируемых, в частности, численность *A. aegypti*.

**Антимикробная активность** штаммов *Bt ssp. kurstaki*, выделенных из аэрозолей, определена методом отсроченного антагонизма (табл. 4). Штаммы отличались как по наличию антимикробной активности к тому или иному патогену, так и по уровню ее проявления.

Наиболее ярко антагонизм у всех исследованных штаммов *Bt* был выражен относительно *Candida albicans*, ни один не подавлял рост штамма *Bacillus subtilis*, в разной степени штаммы *Bt* проявляли

антибиотическую активность относительно *S. aureus* и бактерий кишечной группы.

**Противовирусная активность** исследована с использованием препаратов на основе штамма *Bt ssp. kurstaki* АК-5. При проведении предварительных тестов на токсичность было выяснено, что препараты № 1, 2, 2/1, 2-10, 2/1-10 были слабо токсичны для клеток MDCK. В случае образца № 1 токсичность не обнаружена только при 10-кратном разбавлении препарата, в остальных – при разведении 1:2. В дальнейших опытах препарат № 1, как более токсичный, не применяли. Противовирусное действие препаратов проявлялось в разной степени в отношении вирусов гриппа птиц А/Н5N1 и гриппа человека А/Н3N2 (табл. 5 и 6).

Индекс нейтрализации (подавления) размножения вируса на чувствительных клетках для образцов, тестированных на вирусе гриппа птиц А/Н5N1, составил от 0,7 до 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Для аналогичных экспериментов с вирусом гриппа человека А/Н3N2 индекс нейтрализации составил от 1,7 до 4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Полученные данные говорят о высокой активности применяемых образцов против вируса гриппа человека А/Aichi/2/68 и вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005, а также позволяют считать их перспективными для

Таблица 3

Энтомопатогенная активность штаммов *Bt*, выделенных из аэрозолей воздуха, по отношению к личинкам комара *A. aegypti*

Штамм	Н-антиген	Гибель <i>A. aegypti</i> (%) / время экспозиции (ч)		Штамм	Н-антиген	Гибель <i>A. aegypti</i> (%) / время экспозиции (ч)	
		24	48			24	48
Ar 100-04	3abc	80	100	Ar 18-15	3abc	84	96
Ar 78-04	»	76	100	Ar 63-04	»	80	100
Ar 31-04	»	48	100	Ar 5-18	»	60	96
Ar 5-15	»	68	88	Ar 32-04	»	76	100
Ar 2-18	»	80	100	Ar 50-04	»	16	96
Ar 118-17	»	48	96	K-1	3abc	85	100
				Контроль личинок		0	10

Примечание. K-1 – контрольный производственный штамм *Bt ssp. kurstaki*.

Таблица 4

**Антимикробная активность штаммов *Bt ssp. kurstaki*  
относительно патогенных тест-штаммов**

Штамм	Тест-штаммы / зоны лизиса или угнетения роста штаммов (мм)					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. thyphi- murium</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ar 50-04	5	4	4	30	0	6
Ar 2-18	5	25	7	30	0	10
Ar 63-04	4	20	8	45	0	4
Ar 5-15	6	12	15	38	0	5
Ar 78-04	9	14	5	41	0	6
Ar 18-15	11	12	5	50	0	0
Ar 24-17	7	17	5	41	0	0
Ar 41-18	5	10	7	42	0	30
Ar 0901-40	7	11	4	46	0	17
Ar 0901-24	14	5	6	40	0	16
Ar 22-15	5	8	5	45	0	9
Ar 118-17	6	25	6	25	6	0
Ar 5-18	10	30	11	35	0	33
Ar 100-04	3	6	7	40	0	16
AK-5	28	65	66	58	0	6

Таблица 5

**Противовирусная активность образцов препаратов штамма *Bt ssp. kurstaki* АК-5  
относительно вируса гриппа птиц А/Н5N1 (профилактическая схема,  
разведение препаратов № 2 и 2/1 – в 5 раз, 2-10 и 2/1-10 – в 10 раз)**

№ образца	Титр вируса в lg ТЦД <sub>50</sub> /мл через 48 ч / повторы опыта					
	1		2		3	
	Титр вируса	ИН*	Титр вируса	ИН*	Титр вируса	ИН*
2	4,7	3,3	4,5	3,5	4,7	3,3
2/1	3,5	4,5	4,2	3,8	3,7	4,3
2-10	7,3	0,7	6,7	1,3	7,0	1,0
2/1-10	6,7	1,3	6,5	1,5	6,5	1,5
Контроль вируса	8,0	–	8,0	–	8,0	–

Примечание. ИН\* – индекс нейтрализации.

Таблица 6

**Противовирусная активность образцов штамма *Bt ssp. kurstaki* АК-5  
относительно вируса гриппа человека А/Н3N2 (профилактическая схема,  
разведение препаратов № 2 и 2/1 – в 5 раз, 2-10 и 2/1-10 – в 10 раз)**

№ образца	Титр вируса в lg ТЦД <sub>50</sub> /мл через 48 ч / повторы опыта					
	1		2		3	
	Титр вируса	ИН*	Титр вируса	ИН*	Титр вируса	ИН*
2	2,5	4,2	2,2	4,5	2,5	4,2
2/1	2,5	4,2	2,5	4,2	3,2	3,5
2-10	4,5	2,2	5,2	1,7	4,2	2,5
2/1-10	3,7	3,0	3,5	3,2	3,5	3,2
Контроль вируса	6,7	–	6,7	–	6,7	–

Примечание. ИН\* – индекс нейтрализации.

дальнейшей разработки противовирусных препаратов. На фоне незначительного числа сообщений о противовирусной активности штаммов *Bt* полученные данные можно считать приоритетными и заслуживающими особого внимания.

### Заключение

Штаммы *Bacillus thuringiensis*, выделенные из исследуемых образцов, проявили высокую устойчивость к экстремальным условиям существования в составе атмосферных аэрозолей, неблагоприятных для проявления жизнеспособности микроорганизмов (высокая солнечная радиация, высушивание, низкие температуры, недостаточная влажность и недостаток питания, др.). Кроме того, что они проявили высокую энтомопатогенную, антимикробную и ферментативную активность, имеющую биотехнологическое значение, они показали также возможность их использования для разработки препаратов противовирусного назначения. Факт длительного сохранения в «боевой готовности» штаммов *Bacillus thuringiensis*, сходных по своим свойствам с производственными штаммами этого вида, используемыми в составе инсектицидных средств, применяемых для аэрозольного распыления на больших территориях, еще раз подтверждает необходимость осторожного, обоснованного, нормированного применения этих препаратов.

Работа выполнена при частичной поддержке междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 35.

1. Pillai S.D., Widmer K.W., Dowd S.E., Ricke S.C. Occurrence of airborne bacteria and pathogen indicators during land application of sewage sludge // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62, N 1. P. 296–299.
2. Davidson C.I., Phalen R.F., Solomon P.A. Airborne particulate matter and human health: A review // Aerosol Science and Technol. 2005. V. 39, N 8. P. 737–749.
3. O’Gorman C.M., Fuller H.T. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air // Atmos. Environ. 2008. V. 42, N 18. P. 4355–4368.
4. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. 716 с.
5. Boonserm P., Davis P., Ellar D.J., Li J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications // J. Mol. Biol. 2005. V. 348, N 2. P. 363–382.
6. Hofmann C., Luthy P., Hutter R., Pliska V. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*) // Eur. J. Biochem. 1988. V. 173, N 1. P. 85–91.
7. Bravo A., Gill S., Soberyn M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control // Toxicon. 2007. V. 49, N 4. P. 423–435.
8. Каменек Л.К., Климентова Е.Г., Тюльпинева А.А. Действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* на некоторые аэробные бактерии-фитопатогены // Уч. зап. УлГУ. Ульяновск, 2000. Вып. 1(2). С. 78–82.
9. Юдина Т.Г., Залунин И.А., Курсанова Л.А., Го Даньян, Булушова Н.В., Нетрусов А.И. Сравнение анти-

- микробного действия Cry, Cyt белков *Bacillus thuringiensis* и их фрагментов // Бюлл. МОИП. Отдел. Биолог. 2009. Т. 114, вып. 3. Прил. 1. Ч. 2. С. 516–522.
10. Васильев В.П. Вредители сельскохозяйственных культур и лесных насаждений: В 3-х т. / Под общ. ред. В.П. Васильева. Т. 3. Методы и средства борьбы с вредителями, системы мероприятий по защите растений / Под ред. В.П. Васильева, В.П. Омелюты. Киев: Урожай, 1989. 408 с.
  11. Bravo A., Likitvatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide // Insect Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 41, N 7. P. 423–431. URL: www.bcn.ca/stop/part4.html
  12. Damgaard P.H., Larsen H.D., Hansen B.M., Bresciani J., Jørgensen K. Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food // Lett. Appl. Microbiol. 2008. V. 23, N 3. P. 146–150.
  13. Андреева И.С., Белан Б.Д., Бородулин А.И., Буряк Г.А., Марченко Ю.В., Олькин С.Е., Панченко М.В., Петриченко В.А., Пьянков О.В., Резникова И.К., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Степанова Е.В. Изучение изменчивости биогенной компоненты атмосферного аэрозоля над лесными массивами Западной Сибири // Оптика атмосф. и океана. 2000. Т. 13, № 6–7. С. 639–644.
  14. Андреева И.С., Бородулин А.И., Буряк Г.А., Жуков В.А., Зыков С.В., Марченко Ю.В., Марченко В.В., Олькин С.Е., Петриченко В.А., Пьянков О.В., Резникова И.К., Репин В.Е., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Рапуста В.Ф., Пененко В.В., Цветова Е.А., Аршинов М.Ю., Белан Б.Д., Панченко М.В., Анкилов А.Н., Бакланов А.М., Власенко А.Л., Куценогий К.П., Макаров В.И., Чуркина Т.В. Биогенная компонента атмосферного аэрозоля на юге Западной Сибири // Химия в интересах устойчивого развития. 2002. № 10. С. 547–561.
  15. Safatov A., Buryak G., Andreeva I., Olkin S., Reznikova I., Sergeev A., Belan B., Panchenko M., Simonenkov D., Tolmachev G. Altitude profiles of biogenic components of atmospheric aerosols in southwestern Siberia // Chem. Eng. Transact. 2008. V. 16. P. 225–232.
  16. Сергеев А.Н., Сафатов А.С., Агафонов А.П., Андреева И.С., Аршинов М.Ю., Белан Б.Д., Буряк Г.А., Генералов В.М., Захарова Ю.Р., Лаптева Н.А., Олькин С.Е., Панченко М.В., Парфенова В.В., Резникова И.К., Симоненков Д.В., Теплякова Т.В., Терновой В.А. Сравнение присутствия химических и биологических маркеров в поверхностном микрослое воды акваторий курортных зон оз. Байкал и в атмосферном аэрозоле этого региона // Оптика атмосф. и океана. 2009. Т. 22, № 6. С. 585–594.
  17. Сафатов А.С., Буряк Г.А., Олькин С.Е., Резникова И.К., Марченко Ю.В., Десятков Б.М., Лаптева Н.А., Андреева И.С., Козлов А.С., Малышкин С.Б., Суторихин И.А., Букатый В.И., Литвиненко С.А., Смоляков Б.С., Шинкоренко М.П. Результаты комплексного экологического исследования проб воды и воздуха прибрежной территории горько-соленых озер Алтайского края летом 2011 г. // Оптика атмосф. и океана. 2012. Т. 25, № 6. С. 550–558.
  18. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда, Э. Мюррея, Э. Костилоу, Ю. Несстера, В. Вуда, Н. Крига, Г. Филипса. М.: Мир, 1983. Т. 1. 536 с.; 1984. Т. 3. 264 с.
  19. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology / Ed. J.G. Holt. Baltimore; London: Williams and Wilkins, 1986. V. 1–2. 1105 p.
  20. Fredericq P. Actions antibiotiques reciproques chez les Enterobacteriaceae. Duculot, 1948. 107 p.

21. Андреева И.С., Мазуркова Н.А., Мокрушина О.С., Пучкова Л.И., Закабунин А.И. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, секретирующие метаболиты, подавляющие размножение вируса гриппа человека А/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005 // Междунар. научно-исслед. ж. Ч. 1. Екатеринбург, 2013. № 7 (14). С. 70–71.
22. Саканян В.А., Селиванова Г.Н., Буканов Н.О., Крупенко М.А., Алиханян С.И. Распространенность, гомология и клонирование крипточеских плазмид *Bacillus thuringiensis* // Генетика. 1982. Т. 18, № 2. С. 181–190.
23. Галушка Ф.П., Азизбеян Р.Р. Исследования плазмид штаммов различных вариантов *Bacillus thuringiensis* // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236, № 5. С. 1233–1235.

*I.S. Andreeva, A.S. Safatov, O.S. Mokrushina, G.A. Buryak, L.I. Puchkova, N.A. Mazurkova, L.I. Burtseva, G.V. Kalmykova. Insecticidal, antimicrobial, and antiviral activities of **Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki** strains isolated from atmospheric aerosols of Southwestern Siberia.*

The article presents data on insecticidal, antimicrobial, and antiviral activities of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains, isolated during microbiological analysis of high-altitude and ground-based samples of atmospheric aerosol collected in Southwestern Siberia. According to the results of intraspecies tests, among 36 isolated bacteria identified as belonging to *Bt* species, 15 strains were classified as *Bt ssp. kurstaki* subspecies and tested for the presence of antagonistic characteristics. Despite their long-term soaring under extreme conditions as a part of atmospheric aerosols, including high-altitude ones (up to 7000 m), the isolated *Bt ssp. kurstaki* strains preserved high levels of entomopathogenic activity characteristic for this subspecies, were able to inhibit the reproduction of pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, etc. and to effectively neutralize the replication of avian influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1) and human influenza virus A/Aichi/2/68 (A/H3N2). The properties of *Bt* strains isolated from atmospheric aerosols not only confirmed their well-known resistance to adverse environmental factors, entomopathogenic and antimicrobial activities, but also demonstrated the possibility of their use for antiviral drugs development.