

## РАЗЛИЧИЯ В БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ШТАММОВ BACILLUS THURINGIENSIS VAR. GALLERIAE

Б. П. КАРАБЕКОВ, А. Г. ЧАХМАХЧЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Показано, что природные штаммы *Bac. thuringiensis*, принадлежащие к серотипу Н5а:5в (*var. galleriae*), неоднородны по своим биохимическим свойствам. Исследованные штаммы принадлежали к двум хорошо дифференцируемым биохимическим типам, отличающимся друг от друга по способности утилизировать сахарозу и по потребности в никотиновой кислоте. Выявлена корреляция между этими двумя признаками, характерная только для штаммов *var. galleriae*.

*Ключевые слова:* *Bac. thuringiensis*, биохимические свойства.

*Bac. thuringiensis v. galleriae* (серотип Н5а:5в) известен однородностью биохимических свойств [7]. Ему свойственна неспособность сбраживать сахарозу [6—9] и аукоотрофность по никотиновой кислоте [1, 2]. Наряду с этим, у ряда штаммов этого серотипа обнаружена способность ферментировать сахарозу [1]. Но несмотря на это, вопрос о наличии различных биохимических типов внутри серотипа Н5а:5в не обсуждался.

В настоящей работе приводятся результаты сравнительного изучения 37 природных штаммов *Bac. thuringiensis v. galleriae*, полученных из различных источников.

*Материал и методика.* В работе использовали 79 штаммов *Bac. thuringiensis*, 37 штаммов *v. galleriae* и 42—других серотипов (Н11—Н12). Большинство исследованных штаммов получено из Всесоюзного института защиты растений (ВИЗР, Ленинград). Ряд штаммов получен из института «ВНИИгенетика» (Москва), Института ядерных исследований (ИЯИ, Гатчина), Института микробиологии АН Армянской ССР (ИИМИ, г. Абовян, Армянская ССР), Биологического института СО АН СССР (БИСОАН, Новосибирск) и Среднеазиатского института фитопатологии (САНИИФ, Ташкент).

Лабораторное культивирование штаммов проводилось на мясо-пептонном бульоне и мясо-пептонном агаре. Способность сбраживать сахарозу исследовалась на среде следующего состава (%): пептон—1; сахароза (цда)—1; агар—2; бромкрезоловый индикатор—50 мкг/мл (рН 7,0). Цвет среды красно-фиолетовый. При сбраживании сахарозы среда окрашивается в желтый цвет. Жидкая среда с сахарозой готовилась по той же прописи без добавления агара. Для этих же целей использовалась сухая среда с сахарозой и индикатором ВР, выпускаемая Дагестанским институтом питательных сред.

Потребность в факторах роста определялась в минимальной среде (МС) следующего состава (на один литр среды, в граммах):  $K_2HPO_4$ —3,0;  $KH_2PO_4$ —1,0;  $Na_2SO_4$ —

0,1; MgSO<sub>4</sub>—0,246; CaCl<sub>2</sub>—0,112; MnCl<sub>2</sub>—0,125; NH<sub>4</sub>COOCH<sub>3</sub>—2,31; глюкоза—0,5; 1—глутаминовая кислота—1,47 (рН 7,3). Для приготовления агаризованной МС добавляли 1,1% агара «Дифко». В случае необходимости к МС добавлялась никотиновая кислота в конечной концентрации 10 мкг/мл. Изучалась лецитиназная [4], уреазная [5] и протеолитическая активность [3].

Серологические свойства исследовались в реакции агглютинации на стекле с эталонными Н—антисыворотками, полученными из Института им. Пастера. При идентификации серотипов Н5а:5в (*v. galleriae*) и Н5а:5с (*v. canadensis*) использован метод перекрестной адсорбции антител. Для этого антисыворотка Н5а:5в в разведении 1:100 насыщалась свежей культурой штамма 1122 ИНИИ *v. canadensis*, находящейся в конце экспоненциальной фазы роста. Точно так же антисыворотка Н5а:5с насыщалась культурой штамма 69—6 *v. galleriae*. Смеси ставились в термостат при 37° на 20 минут. За это время происходило выпадение обильного хлопьевидного осадка. Затем смеси центрифугировались при 4500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочная жидкость отбиралась и с нею ставилась реакция агглютинации на стекле.

Чувствительность исследованных штаммов к набору бактериофагов определялась качественно.

*Результаты и обсуждение.* При изучении биологических свойств природных штаммов *Bac. thuringiensis v. galleriae*, поступивших в нашу лабораторию, было установлено, что они отличаются друг от друга по способности сбраживать сахарозу. Так, из 37 исследованных штаммов 18 (48,6%) сбраживали сахарозу с образованием кислоты без газа (Sac<sup>+</sup>), 19 штаммов этой способностью не обладали (Sac<sup>-</sup>). Характеристика исследованных штаммов по этому признаку, в зависимости от источника получения, приведена в табл. 1, из которой видно, что Sac<sup>+</sup>

Таблица 1  
Характеристика исследованных штаммов по источникам получения

Источник получения штаммов	Количество штаммов	В том числе	
		сбраживают сахарозу	не сбраживают сахарозу
ВИЗР	22	12	10
ИЯИ	4	2	2
ВНИИгенетика	6	2	4
БИСОАН	2	0	2
САНИИФ	3	2	1
Всего	37	18	19

штаммы поступали в нашу коллекцию почти из всех источников. Поскольку в классификационной схеме Де Баржак и Бонефи [7] этот вариант *Bac. thuringiensis* (серотип Н5а:5в) отмечен как не сбраживающий сахарозу, мы предположили, что поступившие к нам Sac<sup>+</sup> штаммы ошибочно отнесены к *v. galleriae*. Для проверки этого предположения были изучены серологические свойства как Sac<sup>+</sup>, так и Sac<sup>-</sup> штаммов. Было установлено, что все 37 исследованных штаммов, включая и Sac<sup>+</sup>, одинаково хорошо агглютинируют с эталонными Н-антисыворотками

Н5а:5в (*v. galleriae*) и Н5а:5с (*v. canadiensis*), при отрицательной реакции агглютинации со всеми остальными Н-антисыворотками (Н1—Н12). В связи с этим в опыт был взят также штамм 1122 ИИМИ *v. canadiensis*, серологическое изучение которого показало, что этот штамм также хорошо агглютинирует с Н5а:5в и Н5а:5с антисыворотками при отрицательной реакции агглютинации с прочими Н-антисыворотками. Эти результаты дали основание предположить, что Sac<sup>+</sup> штаммы, поступившие в нашу коллекцию, могут принадлежать к *v. canadiensis*, поскольку штаммы этого варианта по той же классификационной схеме отмечены как обладающие способностью сбраживать сахарозу. Для проверки этого предположения было проведено сравнительное изучение биохимических свойств исследуемых штаммов и штамма 1122 ИИМИ. Результаты этих исследований, а также результаты изучения серологических свойств этих штаммов с адсорбированными Н-антисыворотками приведены в табл. 2, из которой видно, что исследуемые нами Sac<sup>+</sup>

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения Sac<sup>+</sup> штаммов *v. galleriae* и штамма 1122 ИИМИ *v. canadiensis*

Штаммы	Сбражива- ние саха- розы	Лецитина- зная актив- ность	Уреазная активность	Протеоли- тическая активность	Агглютинация с адсорбиро- ванными антисыворотками	
					Н5в	Н5с
1122	+	++++	-	++++	-	++++
234-4	+	-	+	+	++++	-
254-4	+	-	+	+	++++	-
11-67 (2)	+	-	+	+	++++	-
71-3	+	-	+	+	++++	-
3-014	+	-	+	+	++++	-
3-16	+	-	+	+	++++	-
260-15	+	-	+	+	++++	-
260-12	+	-	+	+	++++	-
19-2	+	-	+	+	++++	-
78-1	+	-	+	+	++++	-
78-2	+	-	+	+	++++	-
И-77	+	-	+	+	++++	-
11-164	+	-	+	+	++++	-
42-2	+	-	+	+	++++	-
85-72	+	-	+	+	++++	-
11-670	+	-	+	+	++++	-
37-68 (12)	+	-	+	+	++++	-
260-12П	+	-	-	+	++++	-

Примечания: «+» — наличие признака, «-» — отсутствие признака, «++++» — ярко выраженная реакция.

штаммы четко отличаются по своим биохимическим и серологическим свойствам от штамма 1122 ИИМИ *v. canadiensis* и идентифицируются как штаммы, принадлежащие к серотипу Н5а:5в, т. е. к *v. galleriae*.

Таким образом, полученные результаты подтверждают данные Африкяна [1] о том, что среди штаммов *Bac. thuringiensis v. galleriae* встречаются штаммы, способные сбраживать сахарозу. Отсюда следует,

что штаммы серотипа Н5а:5в принадлежат к двум биохимическим типам, один из которых способен утилизировать сахарозу, другой же этой способностью не обладает.

Сравнительное изучение свойств штаммов этих двух типов показало, что Sac<sup>+</sup> и Sac<sup>-</sup> штаммы *v. gallerae* отличаются друг от друга по крайней мере еще по одному биохимическому признаку, а именно по потребности в никотиновой кислоте для роста. Sac<sup>+</sup> штаммы, как правило, не нуждаются в никотиновой кислоте, т. е. являются Nic<sup>+</sup>, в то время как Sac<sup>-</sup> штаммы не растут без нее, т. е. являются Nic<sup>-</sup>. По другим признакам (морфо-культуральным и остальным биохимическим свойствам), включая чувствительность к набору вирулентных и умеренных фагов, указанные штаммы мало чем отличались друг от друга. Эти данные подтверждают вывод о том, что серотип Н5а:5в *v. gallerae* должен быть представлен двумя биохимическими типами.

Вызывает интерес выявление неожиданной корреляции между Sac<sup>-</sup> и Nic<sup>-</sup> признаками у исследованных штаммов *v. gallerae*. Корреляция между ними может быть отражением особенностей обмена всей группы *Bac. thuringiensis*. Для выяснения этого была изучена коррелятивная связь между этими признаками у штаммов, представляющих другие варианты и серотипы *Bac. thuringiensis* (табл. 3). Как видно из табл. 3,

Таблица 3

Коррелятивная связь между способностью сбраживать сахарозу и потребностью в никотиновой кислоте у штаммов различных серотипов и вариантов *Bac. thuringiensis*

Варианты	Серотип	Количество штаммов	Сбраживание сахаразы	Рост при отсутствии никотиновой кислоты	Фенотип
berliner	1	3	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
finitimus	2	3	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
alesti	3a	2	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
kurstaki	3a : 3b	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
kenyae	4a : 4c	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
sotto	4a : 4b	3	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
dendrolimus	4a : 4b	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
canadensis	5a : 5b	2	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
subtoxicus	6	3	+	—	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>-</sup>
entomocidus	6	2	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
aizawai	7	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
morrisoni	8	2	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
tolworthi	9	2	+	+	Sac <sup>+</sup> Nic <sup>+</sup>
darmstadtensis	10	2	—	—	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>-</sup>
toumanoffi	11	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>
thompsoni	12	3	—	+	Sac <sup>-</sup> Nic <sup>+</sup>

у 8 из исследованных вариантов или серотипов изучаемые признаки не коррелируют, что не говорит в пользу предположения о связи этого явления с особенностями обмена у всех представителей *Bac. thuringiensis*. Природа корреляции этих признаков у штаммов *v. gallerae*, таким образом, пока не ясна.

Филиал ВНИИ генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов  
Главмикробиопрома СССР

Поступило 10. IX 1980 г.

Ուսումնասիրվել են *Bac. thuringiensis*-ի H5a:5b սերոտիպին պատկանող (*v. galleriae*) 37 բնական շտամներ: Պարզվել է, որ նրանցից 18-ը ընդունակ են սախարոզան քայքայել՝ առաջացնելով թթու, առանց զազի հատկության, որը բնորոշ չէ այդ սերոտիպին պատկանող միկրոօրգանիզմների համար: Հարկ է նշել, որ սախարոզան քայքայող բոլոր շտամներն էլ, առանց բացառության, ի տարբերություն սախարոզան չքայքայող շտամների, իրենց ածի համար նիկոտինաթթվի կարիք չեն դրոմ: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ *Bac. thuringiensis* H5a:5b սերոտիպին պատկանող *v. galleriae*-ն կազմված է իրարից բիոքիմիապես լավ տարբերվող երկու տիպի միկրոօրգանիզմներից, որոնցից առաջինն ընդունակ չէ յուրացնել սախարոզան և ածի համար նիկոտինաթթվի կարիք ունի, իսկ երկրորդը՝ յուրացնում է սախարոզան և նիկոտինաթթվի պահանջ չի դրում:

Ուշադրության արժանի է վերը նշված երկու բիոքիմիական հատկանիշների հայտնաբերված զուգակցությունը ուսումնասիրված շտամների մոտ, որի բնույթը դեռևս պարզ չէ:

## VARIAIONS OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *GALLERIAE* STRAINS

B. P. KARABECOV, A. G. TCHAKHMAKHCHYAN, M. G. OGANESSIAN

It has been shown that natural strains of *Bac. thuringiensis* which belong to serotype H5a:5b (*var. galleriae*) are not homogeneous by their biochemical properties. Studied strains belong to two well differentiated biochemical types which are strongly distinguished according to their reaction to sucrose and nicotinic acid. A correlation of these two signs characteristic only for *var. galleriae* strains has been revealed.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Микробиол. журн., Киев, 35, 1, 58, 1973.
2. Африкян Э. К. Успехи микробиологии, 10, 142, 1975.
3. Петрова И. С., Ванцюняйте М. М. Прикладная биохимия и микробиология, 2, 3, 322, 1966.
4. Полховский В. А. Микробиология, 39, 576, 1970.
5. Тимиков В. Д., Гольдфарб Д. М. Основы экспериментальной медицинской микробиологии, М., 1958.
6. de Barjac H., Bonnefol A. J. Invert. Pathol., 11, 335, 1968.
7. de Barjac H., Bonnefoi A. Entomophaga, 18, 5, 1973.
8. Norris J. R. J. Appl. Bact., 27, 3, 439, 1964.
9. Norris J. R., Burges H. D. Entomophaga, 10, 11, 1965.