

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Буканов Н. О., Фомштейн М. Ю., Евтушенков А. Н., Сааринский М. А., Стрельченко П. П., Янковский Н. К., Аликханян С. Н., Фомичев Ю. К., Дебабов В. Г. Генетика, 21, 1985.
2. Евтушенков А. Н., Прокулевич В. А., Белясова Н. А., Попова Л. Б., Фомичев Ю. К. Мол. генетика, микробиология и вирусология, 6, 11—15, 1984.
3. Birnholm H. C. Methods Enzymol., 100, 243—255, 1983.
4. Chatterjee A. K., Buchanan G. B., Behrens M. K., Starr M. P. Can. J. Microbiol., 25, 94—102, 1979.
5. Collmer A., Berman P., Mount M. S. In: Phytopathogenic prokaryotes. Mount M., Lacy G. (eds.), Academic Press, Inc NY., 1, 395—422, 1982.
6. Dente L., Cesareni G., Cortese R. Nucl. Acids Res., 11, 1645—1655, 1983.
7. Garlbaldt A., Bateman D. F. Physiol. Plant Pathol., 1, 25—40, 1971.
8. van Gijsegem F., Toussaint A., Schoonejans E. EMBO J., 4, 787—792, 1985.
9. Hohn B. Methods Enzymol., 68, 299—309, 1979.
10. Loenen W. A. M., Brammar W. J. Gene, 10, 249—259, 1980.
11. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 1184—1188, 1975.
12. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
13. Marmur J. J. Mol. Biol., 3, 208—218, 1961.
14. Morrison D. A. J. Bacteriol., 132, 349—351, 1977.
15. Pupillo P., Mazzucchi U., Pierini G. Physiol. Plant Pathol., 9, 113—120, 1976.
16. Rombouts F. M., Pilnik W. Microb. Enzymes and Biocovers, London, 5, 227—282, 1980.
17. Smitk G. E., Summers M. D. Anal. Biochem., 109, 123—129, 1980.
18. Vieira J., Messing J. Gene, 19, 259—268, 1982.
19. Keen N. T., Dahlbeck D., Staskawicz B., Belser W. Bacteriol., 159, 825—831, 1984.

«Биолог. Армения» т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 577.19:579.83

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЮРИЦИНОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММАМИ *BACILLUS THURINGIENSIS*

А. С. ОВСЕПЯН, Б. П. КАРАБЕКОВ

Показано, что 42 штамма *B. thuringiensis* (из 100 проверенных), относящихся к 10 вариантам, продуцируют тюринцины. 9 проверенных штаммов варианта *dentroline* не продуцируют и сами чувствительны ко всем тюринцинам. Синтезируемые бактерицины чувствительны к трипсину, но различаются по чувствительности к высокой температуре, способности проходить через целлофановую мембрану, морфологии зон торможения индикаторного штамма, спектру действия. Получены моно- и полирезистентные мутанты универсального индикаторного (чувствительного ко всем тюринцинам) штамма *B. thuringiensis* var. *galleriae* P10/14. Используя эти мутанты, тюринцины распределены на 4 типа.

Ключевые слова: бактерициногенная *B. thuringiensis*, тюринцины.

Представители различных серотипов вида *B. thuringiensis* продуцируют бактерицины, так называемые тюринцины [1, 6, 7, 9]. Имеются

данные об экстрахромосомальной природе детерминант, кодирующих синтез тюрининов у *morrisoni* и *darmstadiensis* [5]. О самой природе тюрининов, их свойствах известно очень мало [1, 6, 7]. Выяснение этих вопросов имеет важное значение для понимания биологии *B. thuringiensis*.

Настоящая работа посвящена изучению распространенности явления бактерициногенности у *B. thuringiensis*, предварительной характеристике и типированию синтезируемых тюрининов.

Материал и методика. В работе использованы природные и коллекционные штаммы различных вариантов *B. thuringiensis*, полученные из Всесоюзного института защиты растений (Ленинград), Института им. Пастера (Париж), Института микробиологии АН АрмССР (г. Абовян), Института ядерной физики им. Б. П. Константинова (Ленинград), Биологического института СО АН СССР (Новосибирск), Среднеазиатского института фитопатологии (Ташкент), Института ВНИИгенетика (Москва).

Для выращивания культур использовали 1,2%-ный мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), минимальную среду, состав которой описан в работе [2]. Составы сред, использованные для проявления бактерициногенности, описаны в соответствующем месте текста.

Принадлежность штаммов к тому или иному серотипу определяли в реакции агглютинации с помощью Н-антисывороток, полученных из Института им. Пастера.

Для определения тюрининогенности клетки исследованных штаммов, выращенные в течение 48 ч при 30° на МПА, убивали парами хлороформа и заливали 0,7%-ным МПА с индикаторным штаммом. О тюрининогенности судили через 24 ч по появлению на газоне индикаторного штамма зоны подавления роста клеток.

Для определения термустойчивости тюрининов чашки с убитыми клетками *B. thuringiensis* прогревали при 60° и 80° в течение 60 мин и при 100° в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры чашки заливали 0,7%-ным МПА с индикаторным штаммом и через 24 ч учитывали результаты.

Способность тюрининов проходить через целлофановую мембрану и диффундировать в агар определяли по описанным методам [4, 8]. Чувствительность их к протеолитическому ферменту трипсину и типирование проводили по описанному методу [3].

Результаты и обсуждение. Установлено, что из 100 исследованных штаммов 42 штамма, принадлежащие к 10-ти из 18-ти проанализированных вариантов, являются тюрининогенными (табл. 1). Тюрининогенность не обнаружена у штаммов, принадлежащих к вариантам *kurstaki*, *dendrolimus*, *kenyae*, *canadiensis*, *aizawai*, *morrisoni*, *toxinanoffi*, *israelensis*.

Для отбора индикаторных штаммов (чувствительных к тюрининам) использовали всю коллекцию, а также мутанты штамма *B. thuringiensis* var. *galleriae* 69-6, продуцирующие темно-коричневый пигмент. Наиболее чувствительными к тюрининам оказались все штаммы варианта *dendrolimus*, некоторые пигментирующие мутанты варианта *galleriae*, а также 2 штамма несеротипированных вариантов. Среди них отобраны универсальные индикаторные штаммы, чувствительные ко всем продуцируемым тюрининам. Таковыми являются все штаммы варианта *dendrolimus*, пигментирующий мутант P 10/14 штамма *B. thuringiensis* var. *galleriae* 69-9 и штаммы, обозначенные 11-50 и 17-2, из несеротипированных вариантов. Отобранные индикаторные штаммы использовались в последующих экспериментах.

Таблица 1
Тюринциногенность различных серотипов *Bacillus thuringiensis*

Вариант	Серотип	Исследовано штаммов	Выявлена тюринциногенность
<i>thuringiensis</i>	H 1	11	9
<i>finlayanus</i>	H 2	2	1
<i>alesii</i>	H 3a	1	2
<i>kurstaki</i>	H 3a : 3a	3	—
<i>dendrolimus</i>	H 4a : 4a	9	—
<i>kenyae</i>	H 4a : 4c	1	—
<i>galleriae</i>	H 5a : 5b	10	19
<i>canadiensis</i>	H 5a : 5c	1	—
<i>subtoxicus</i>	H 6	1	1
<i>entomocidus</i>	H 6	2	1
<i>atizawai</i>	H 7	1	—
<i>morrisoni</i>	H 8	2	—
<i>totworthi</i>	H 9	2	1
<i>darmstadtensis</i>	H 10	1	1
<i>caucasicus</i>	H 10	3	3
<i>thompsoni</i>	H 11	1	1
<i>toumanoffi</i>	H 12	1	—
<i>israelensis</i>	H 14	1	—
—	не серотипированы	11	3
Всего:		100	42

Изучали влияние состава сред на продукцию тюринцинов. Как видно из табл. 2, наиболее эффективно тюринцины продуцируются при росте клеток на МПА. Присутствие в среде 0,5%-ной глюкозы и 0,5—1%-ного NaCl приводит к уменьшению зоны торможения индикаторного штамма, возможно, из-за ослабления синтеза тюринцинов. В связи с этим в дальнейшем в качестве питательной среды использовали МПА.

В табл. 3 представлены результаты сравнительного анализа некоторых тюринцинов. Из 42-х исследованных тюринцинов только 9 способны проходить через целлофановую мембрану, что говорит об их низком молекулярном весе.

Все исследованные тюринцины чувствительны к трипсину, хотя необходимо отметить, что тюринцины, синтезируемые вариантами *thuringiensis*, *thompsoni*, штаммом 44-1 из несеротипированных вариантов менее чувствительны к нему, так как инактивируются только при 10-кратном (и более) разведении их.

Анализируемые тюринцины различаются по чувствительности к высокой температуре. Если штаммы *thuringiensis*, *caucasicus*, *darmstadtensis*, *thompsoni*, *subtoxicus* (в последних 3 случаях анализировалось только по одному штамму) синтезируют теплоустойчивые тюринцины, то штаммы других серотипов—как теплоустойчивые, так и теплочувствительные.

Эти данные говорят о неодинаковой природе синтезируемых тюринцинов или, по крайней мере, о количественном различии в соотношении компонентов, входящих в их состав.

О неоднородности синтезируемых тюринцинов свидетельствуют и другие данные. В опытах по диффузии тюринцинов в агаре отмечено, что

Таблица 2

Влияние состава сред на синтез тюринцинов

Состав среды	Появление бактериоциногенности и ее интенсивность
МПА	+++
МПА, глюкоза—0,5%	+
Дрожжевой экстракт—1%.	
Пептон—1%, NaCl—0,5%	+
Дрожжевой экстракт—0,5%	
Пептон—1%, NaCl—1%	++
Дрожжевой экстракт—1%, NaCl—0,5%	—
Дрожжевой экстракт—0,5%	
Пептон—0,5%, NaCl—0,5%	+
Пептон—1%, NaCl—0,5%	—
Дрожжевой экстракт—1%, NaCl—1%	—
Пептон—1%, NaCl—1%	+
Дрожжевой экстракт—1%.	
Пептон—1%, NaCl—1%	+
Минимальная среда для <i>B. thuringiensis</i>	—

Примечание: представлены результаты анализа тюринциногенных штаммов *B. thuringiensis* в отношении индикаторного штамма И-50. Использовали 1,2%-ные агаризованные среды; «+» означает условный размер зоны торможения индикаторного штамма, «—» —отсутствие зоны торможения у индикаторного штамма.

Таблица 3

Сравнительная характеристика тюринцинов

Тюринцины вариантов <i>B. thuringiensis</i>	Прочность через целлофановую мембрану	Чувствительность к трипсику	Устойчивость к тепловой обработке		
			60°	80°	100°
<i>thuringiensis</i>	7/9	9/9	9/9	9/9	9/9
<i>finitimus</i>	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>alesti</i>	0/2	2/2	1/2	1/2	1/2
<i>galleriae</i>	0/19	19/19	10/19	10/19	10/19
<i>subtoxicus</i>	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>entomocidus</i>	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>tolworthi</i>	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>darinStadtensis</i>	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>caucasicus</i>	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>thompsoni</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
не серотинированы	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Примечание: в знаменателе число тюринциногенных штаммов, в числителе—число тюринциногенных штаммов, обладающих соответствующим свойством.

штаммы вариантов *thuringiensis*, *thompsoni*, несеротипированный штамм 44-1 сохраняют свои антагонистические свойства в течение длительного времени по сравнению со штаммами других вариантов. Однако замечено, что тюринцины одного и того же варианта могут различаться по скорости диффузии в агаре. Замечено также, что тюринцины, синтезируемые вариантами *thuringiensis*, *thompsoni*, несеротипированными штаммами 14-1 и 17-2, активнее в отношении не только универсальных индикаторных штаммов, но и большего числа штаммов из других серотипов. Это предполагает более широкий спектр действия тюринцинов, синтезируемых штаммами указанных вариантов.

Тюринциногенные штаммы различаются также по морфологии зоны торможения индикаторной культуры (по размеру, прозрачности, характеру расположения вторичных колоний в зоне торможения и т. д.).

Полученные данные обусловили необходимость типирования тюринцинов, продуцируемых штаммами *B. thuringiensis*. Для этого у универсального индикаторного штамма Р 10/14 (продуцирует пигмент и устойчив к стрептомицину) были получены мутанты, резистентные к одному из синтезируемых тюринцинов (монорезистентные мутанты). Не все монорезистентные мутанты, полученные одноступенчатым отбором, оказались пригодными для типирования тюринцинов. Наиболее удобным для этих целей оказался мутант, резистентный к тюринцину, продуцируемому штаммом 260/15 варианта *galleriae*, и обозначенный как 14/260-15. Этот мутант оказался устойчивым еще к 7-ми тюринцинам, продуцируемым штаммами варианта *galleriae*. Синтезируемые этими штаммами тюринцины обладают одинаковыми свойствами—у них одинаковая морфология зоны торможения индикаторного штамма, все они теплочувствительны, не проходят через целлофановую мембрану. Таким образом, 8 из 42-х тюринциногенных штаммов продуцируют тюринцины одного и того же типа, их мы отнесли к типу «А».

У мутанта 14/260-15 не изменился характер чувствительности к тюринцинам, продуцируемым 22-мя штаммами различных серотипов, а у 12-ти других штаммов различных серотипов наблюдалось сужение зоны торможения роста. Из суженной зоны торможения роста мутанта 14/260-15, вызванного действием тюринцина штамма 3-16 варианта *galleriae*, был выделен новый мутант 2-16, который оказался одновременно резистентным еще к 21-му тюринцину, продуцируемому штаммами разных серотипов. Таким образом, с помощью двойного резистентного мутанта 2/16 протипированы еще 22 тюринциногенных штамма; продуцируемые тюринцины отнесены к типу «В». Тюринцины этого типа не проходят через целлофановую мембрану, имеют одинаковую чувствительность к трипсинолу, но различаются по морфологии зоны торможения индикаторного штамма и теплочувствительностью.

В отношении тюринцинов, продуцируемых остальными 12-ю тюринциногенными штаммами, у мутанта 2/16 было отмечено сужение зоны торможения роста. Тюринцины, продуцируемые 7-ю штаммами варианта *thuringiensis*, штаммом Р варианта *thompsoni*, несеротипированным штаммом 44-1, проходят через целлофановую мембрану, теплоустойчи-

вы, менее чувствительны к трипсину, имеют одинаковые зоны торможения и широкий спектр действия. Они отнесены к типу «С». Тюринины штамма 19-2 варианта *galleriae*, штамма Р варианта *subtoxicus* и одного несеротипированного штамма теплоустойчивы, но в отличие от тюрининов типа «С» не проходят через целлофановую мембрану, чувствительны к трипсину, имеют узкий спектр действия и мутные зоны торможения роста. Они отнесены к типу «D».

Представленные данные не исключают, однако, что некоторые штаммы продуцируют более одного типа тюрининов. В настоящее время проводятся эксперименты по более детальной характеристике типированных тюрининов и установлению соответствующих генетических детерминант.

Авторы выражают благодарность В. А. Сакалян у за критические замечания и обсуждение результатов.

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Поступило 11.IX 1985 г.

BACILLUS THURINGIENSIS-ի ՇՏԱՄԱՆԵՐՈՎ ՍԻՆԹԵԶՎԱԾ ՏՅՈՒՐԻՑԻՆՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա. Ս. ՀՈՎՍԵՊՅԱՆ, Բ. Պ. ԿԱՐԱԲԵԿՈՎ

Ցույց է տրված, որ *B. thuringiensis*-ի 10 վարիանտների 42 շտամներ (100 ստուգվածներից) սինթեզում են տյուրիցիններ: *Dendrolimus* վարիանտի 9 ստուգված շտամներ տյուրիցին չեն սինթեզում և իրենք էլ զոջայուն են տյուրիցինների նկատմամբ: Սինթեզված տյուրիցինները զգայուն են տրիպսինի նկատմամբ, սակայն միմյանցից տարրերվում են բարձր չերմաստիճանի նկատմամբ ունեցած զոջայունություն, ցելոֆանե թաղանթով անցնելու ունակություն, ինդիկատոր շտամի աճի արգելակված զոջային մորֆոլոգիայով, բակտերիաների վրա ազդման սպեկտրով: Ստացված են *B. thuringiensis* var. *galleriae* P10/14 ունիվերսալ ինդիկատոր շտամի տյուրիցինների նկատմամբ ուղիստենտ մուտանտներ: Դրանց միջոցով տյուրիցինները դասակարգվել են 4 տիպի:

CHARACTERIZATION OF THURICINS PRODUCED BY *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS

A. S. HOVSEPYAN, B. P. KARABEKOV

42 strains (of 100 tested), which belong to 10 subspecies of *B. thuringiensis* produce thuricins. 9 tested strains of *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* do not produce thuricins and are sensitive to any thuricin. All thuricins are sensitive to trypsin, but differ by heat stability, permeability through dialysis membrane, spectrum of action on bacteria. Thuricin-resistant mutants of the indicative *B. thuringiensis* var. *galleriae* P10/14 strain (which is sensitive to all thuricins) are isolated. The thuricins are subdivided into four types by means of these mutants.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Иванюв Г. М., Марченкова Т. В., Лихотникова Н. Н. Изв. Сибирск. отделения АН СССР, серия биол. наук, вып. 3, 15, 126—128, 1973.
2. Карабеков Б. П., Чахмичян А. Г., Оганесян М. Г. Генетика, 18, 1062—1067, 1982.
3. Кудлай Д. Г., Лиходей В. Г. Бактериоогенез. Л., 1966.
4. Лиходей В. Г. Антибиотики, 9, 771—780, 1963.
5. Рабченко Н. Ф., Алиханян С. Н. Генетика, 20, 1067—1071, 1981.
6. Du Barjac H. et Lajudie J. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125, 521—537, 1974.
7. Goze A. C. R. Soc. Biol., 166, 200—204, 1972.
8. Frerderiq P. Rev. Belge Path. Med. Exp., 19, 4—8, 1948.
9. Krieg A. J. Invert. Pathol., 11, 29, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.24 576.851.48

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ У *ESCHERICHIA COLI*

А. С. МИРОНОВ

Изучена экспрессия гена *udr* в геноме бактерий *rho15* на фоне различных мутаций, затрагивающих структурный ген *metE*. Показано, что в отличие от точечной мутации *metE* инсерция *metE::Tn5* супрессирует эффект мутации *rho15* на экспрессию гена *udr*, восстанавливая его чувствительность к действию специфических эффекторов—белка-репрессора *cytR* и комплекса цАМФ—CRP. На основании полученных данных делается заключение о том, что в геноме бактерий *rho15* экспрессия гена *udr* осуществляется под контролем промотора *metE*.

Ключевые слова: ген уридинфосфорилазы, регуляция экспрессии гена.

Структурный ген *udr*, контролирующий синтез фермента уридинфосфорилазы (УДФ), расположен в районе 85 мин хромосомной карты *Escherichia coli*. Промоторная область гена *udr* локализуется в участке, примыкающем к гену *metE*, т. е. транскрипция гена *udr* осуществляется по часовой стрелке карты *E. coli* [1, 4]. Экспрессия гена *udr* находится под негативным контролем регуляторного локуса *cytR*, кодирующего синтез белка-репрессора [13].

Низкомолекулярными эффекторами белка *cytR* служат цитидин (CR) и аденозин [8, 13]. Выражение гена *udr* подвержено строгой кatabолитной репрессии, о чем свидетельствует практически полное подавление активности его промотора на фоне мутаций по аденилатциклазе (*cytA*) или белку-рецептору циклического АМФ (*crp*) [5, 9, 12].

Важную роль в регуляции экспрессии гена *udr* играет фактор терминации транскрипции *rho*. Показано, что присутствие в геноме бактерий мутации *rho15 ts* обуславливает полуконститутивный синтез УДФ, причем усиление экспрессии гена *udr* сопровождается нарушением регуляции с участием белка *cytR* и комплекса цАМФ—CRP. На основании этих данных было сделано заключение о том, что в геноме *rho15* экс-