

НУМЕРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ПОДВИДОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS THURINGIENSIS*

А. А. ХАЧАТУРЯН, В. К. КОТОВ, Э. Г. АФРИКЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Осуществлен нумерический анализ систематически известной категории микроорганизмов серотипов H₂, H₄, H₅, H₁₀ *Bacillus thuringiensis* с применением программ по числовой таксономии с целью их последующего использования для идентификации вновь выделенных штаммов вида *B. thuringiensis*.

Показана возможность получения кластеров, сходных с известными физиологическими группами. Отобраны дискретные признаки, имеющие диагностическое значение, и типичный штамм для культур подвиды *caucasicus*.

Քվային սաքսոնմիայի ծրագրերի օգտագործմամբ իրագործված է *Bacillus thuringiensis* տեսակի սխտեմատիկորեն հայտնի միկրոօրգանիզմների H₂, H₄, H₅, H₁₀ սերոտիպերի թվային վերլուծություն՝ արդյունքները և ծրագրերը հետագայում երբ անհատված *B. thuringiensis*-ի շտամների իդենտիֆիկացիայի նպատակով օգտագործելու համար: Ցույց է տրված հայտնի ֆիզիոլոգիական խմբերին մտնիկ կլաստերների ստացման հնարավորությունը: Ընտրված են դիագնոստիկ նշանակություն ունեցող դիսկրետ հատկանիշները և *caucasicus* կուլտուրայի տարատեսակի տիպիկ շտամը:

The numerical analysis of systematically known category of the microorganisms of H₂, H₄, H₅, H₁₀ serotypes of *Bacillus thuringiensis* is carried out using the programs of numerical taxonomy, aiming their use in future for the identification of new found strains of *B. thuringiensis*. The possibility to obtain clusters, similar to the known physiological groups, is shown. The discrete characters, having diagnostic value, as well as a typical strain for the cultures of the variety *caucasicus* are screened.

Энтомопатогенные бактерии—*Bacillus thuringiensis*—нумерический анализ—систематика—таксономия.

Научная и практическая значимость штаммов рода *Bacillus*, как продуцентов различных физиологически активных соединений делает целесообразным поиск новых методов их исследования. Большая и разнообразная информация, характеризующая коллекцию культур микроорганизмов этого рода, и сложность ее обработки вынуждают применять математические методы анализа и средства вычислительной техники.

В систематике бактерий в последние годы широко применяется нумерический анализ [7]—математический метод, разработанный Спитом и Соколом [15] и основанный на принципах Адаксона. Этот метод позволяет не только идентифицировать отдельные таксоны, но и выявлять взаимосвязи различных групп микроорганизмов [2—4]. Исследования такого рода на штаммах спороносных бактерий осуществлялись Лысенко [14] в 60-х годах с включением нескольких видов *Bacillus*

и некоторых известных к тому времени подвигов *Bacillus thuringiensis*, а также Бонде в 1975 году [9] с использованием большого количества штаммов различных видов бацилл, имеющих определенное значение в клинической медицине.

В лаборатории спорообразующих бактерий Института микробиологии АН АрмССР накоплен большой фактический материал по изучению многочисленных штаммов различных серотипов. *B. thuringiensis*, имеющих первостепенное значение в борьбе с вредителями сельскохозяйственных культур. Число их постоянно увеличивается и требует неотложного изучения и определения их таксономической принадлежности.

Задачей настоящей работы явился нумерический анализ систематически известной категории микроорганизмов, относящейся к четырем производственно-важным серотипам (H₃, H₄, H₅, H₁₀).

Материал и методика. В качестве ОТЕ рассматривались коллекционные и оригинальные штаммы разных подвигов *B. thuringiensis*, многие из которых используются в производстве инсектицидных препаратов. Подвид *caucasicus* представлен 45 тестируемыми штаммами, из которых 39 использовались для проведения кластерного анализа и 45 штаммов серотипов H₃, H₄, H₅ и H₁₀ для изучения феноменической взаимосвязи и выявления дифференциальных признаков для диагностики штаммов указанных культур (табл. 1). Для характеристики ОТЕ первоначально

Таблица 1. Штаммы *B. thuringiensis* (ОТЕ), использованные при нумерическом анализе

Серотип	Число штаммов	Серотип	Число штаммов
H ₁	<i>aiesti</i>	H ₃	<i>gallertae</i>
	<i>rixouae</i>		<i>canadensis</i>
	<i>kurstaki</i>		<i>cerens</i>
	<i>cerens</i>	H ₄	<i>caucasicus</i>
H ₂	<i>sotto</i>		<i>darmstadtensis</i>
	<i>dendrolimus</i>		<i>cerens</i>
	<i>tuvlensis</i>		
	<i>kenyae</i>		
	<i>cerens</i>		
Идентифицированные	2	Всего	42

было отобрано 96 признаков, полученных при исследовании штаммов методами, описанными в работах де Баржак и Бенфуа [10], Гордон и соавт. [11] и в определителе Верге [8].

Исходную матрицу признаков, размерности 40×80, составляли кодированием положительных значений как 1, а отрицательных—как 0. Обработку исходной матрицы признаков проподили с помощью пакета программ по нумерической таксономии «Кластер» на ЭВМ СМ-4. Этот пакет входит в состав программного обеспечения автоматизированной системы научных исследований, создаваемой в ИНМИА. Программы написаны на языке ФОРТРАН. Последовательность вычислений при проведении нумерического анализа с помощью пакета «Кластер» представлена на рис. 1.

Расчет таксономического сходства ОТЕ производили с использованием техники сравнения по двум коэффициентам ассоциации [7].

Коэффициент простого сходства Смита

$$S_{sm} = \frac{n_{11} + n_{00}}{n_{11} + n_{00} + n_{10}}$$

коэффициент Жаккарда

$$S_j = \frac{n_{11}}{n_{11} + n_{10}}$$

где p_{11} , p_{00} —количество признаков соответственно положительных и отрицательных, имеющих одинаковое значение для обеих сравниваемых ОТЕ, p_{10} —количество различающихся признаков для сравниваемых ОТЕ. Кластеризацию симметрической матрицы подобия выполняли методом усредненного свизывания (двугрупповой среднорифметический метод без взвешивания). Для оценки эффективности разделения на кластеры использовали кофенетический коэффициент корреляции [4, 15].

Другая часть программ пакета основана на принципах координатного анализа [12, 13], позволяющего уменьшать размерность пространства признаков и находить более простую структуру идентификационного набора признаков. Кратчайшее остовное дерево симметрической матрицы подобия помогает избежать грубых ошибок при построении матрицы подобия в пространстве найденных факторов и наглядно представить результаты вычислений.

Результаты и обсуждение. На основании кластеризации матрицы подобия 39 штаммов серотипа *H₁₀ B. thuringiensis* были выделены фенотипические группы этого подвида, в целом близкие к данным классической систематики [1] и подтверждающие их неоднородность (табл. 2).

Таблица 2. Группы штаммов серотипа *H₁₀*, полученные с помощью нумерического и классического методов анализа

Кластеры (феноны) (порог объединения и феноны 0.950)	Физиологические группы (по Африкану и Чил-Акопин, 1980)
805, 831, 837, 836, 841, 844, 853, 871, 873, 876, 880, 887, 888, 893, 895, 905, 914, 917, 918, 919, 811	805, 811, 831, 837, 839, 841, 853, 871, 873, 876, 880, 887, 893, 895, 905, 914, 915, 917, 918, 919, 924.
925, 926, 927, 957, 875, 915, 924, 896, 911, 921, 928, 939, 950	925, 926, 927, 939, 927, 875, 844, 896, 911, 921, 888, 928, 950.
1079, 1096—3, 1113, 641, 1075.*	1079, 1096—3, 1113, 641, 1075.

Примечание: курсивом выделены штаммы, которые не вошли в соответствующие кластеры или в физиологические группы.

* 1075 — *subsp. darmstadtensis*.

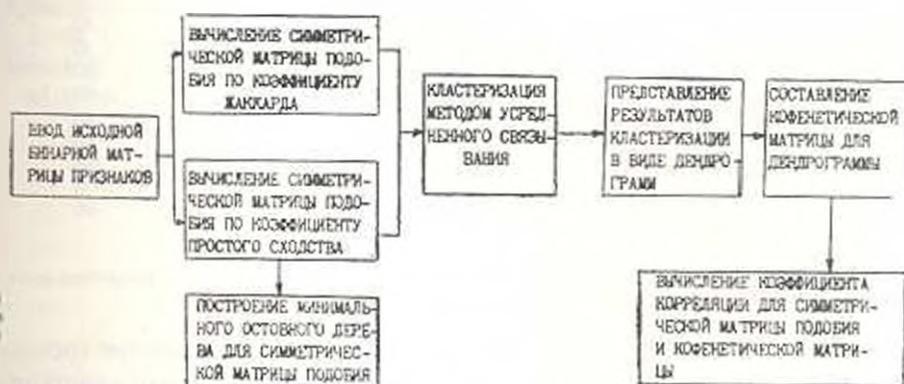


Рис. 1. Последовательность вычислений с помощью пакета прикладных программ по нумерической таксономии «Кластер».

Анализ 45 штаммов серотипов Н₃, Н₄, Н₅, и Н₁₀ с использованием программ координатного анализа позволил построить минимальное остовное дерево (рис. 2). Как видно из дендрограммы, особенно четко группируется (проявляется фенотипическое родство) большая часть культур серотипа Н₁₀ (871, 841, 805, 844, 1075, 888, 893, 1096-3, 1113, 921, 950, 925), для которых типичным штаммом может служить штамм

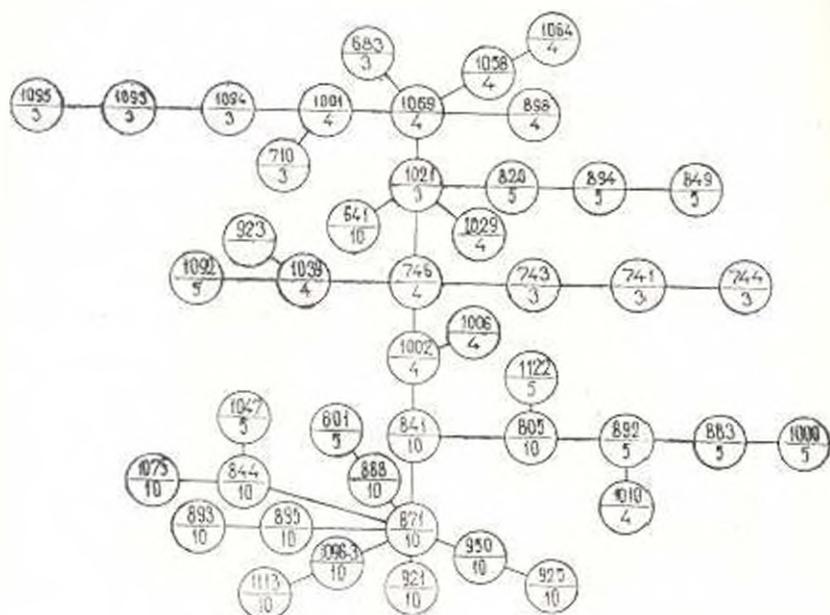


Рис. 2. Фенотипическая взаимосвязь штаммов некоторых серотипов *B. thuringiensis*.

Таблица 3. Характеристика типичного штамма подвиды *B. thuringiensis subsp. caucasicus*

Признаки	Типичный штамм ИИМИА-871	Число штаммов, сходных с типичным (из 45 изученных)	Признаки	Типичный штамм ИИМИА-871	Число штаммов, сходных с типичным (из 45 изученных)
Кристалл	+	43	Целлюлоза	+	31
АМК	++	44	Салицин	-	42
ЛВР	++	43	Эскулин	+	45
ДГА	++	43	Цитрат	+	32
Протеолиз	+	45	Пропионат	++	40
Инвертаза	-	45	Гипурат	-	45
Редуктаза	-	45	Кре-мал	+	45
Уреаза	-	44	α-NaCl	+	45
Сахароза	-	44	Палька	-	45
Манноза	-	45	Пигмент	+	36

Условные обозначения: АМК — ацетил-метил-каридол, ЛВР — лецитино-вителлиновая реакция, ДГА — дигидроксиацетон.

871, расположенный в центре излученной группы. Исключение составляет штамм 641, не обладающий способностью образовывать кристалл.

Характеристика штамма, типичного для серотипа *caucasicus*, приводится в табл. 3, из которой видно, что свойства штамма 871 в основ-

ном коррелируют со свойствами большинства штаммов этого таксона. В процессе анализа выявлен набор из 20 дискретных признаков, в целом совпадающий с ключом де Баржак и Бонфуа [10] и включающий дополнительные свойства, предложенные нами, как имеющие диагностическое значение для некоторых серотипов вида *B. thuringiensis* [6].

Полученные результаты приводят к выводу о том, что использованные признаки обеспечивают идентификацию и кластеризацию культур серотипа H_{10} и проявляют фенотипические связи со штаммами других серотипов (H_3 , H_4 , H_5). Однако у последних не выявляется подобной четкости, они группируются лишь в 3—4 штамма и взаимосвязаны этими небольшими группами, что свидетельствует о необходимости их дальнейшего детального изучения.

Таким образом, подобранный пакет программ может служить основой для быстрой идентификации новых штаммов серотипа H_{10} (*B. thuringiensis* subsp. *caucasicus*).

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкан Э. Г., Чил-Аколян Л. А. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 355—365, 1980.
2. Киприанова Е. А., Паничев А. В., Бойко О. И., Гарагуля Л. Д. Микробиология, 46, 6, 1023—1032, 1979.
3. Лойцанская М. С., Павленко Г. В., Ивченко А. И. Микробиология, 48, 3, 545—551, 1979.
4. Малащенко Ю. Р., Мучник Ф. В., Романовская В. А., Садовников Ю. С. Математические модели и ЭВМ в микробиологической практике. Киев, 1980.
5. Райзин Дж. Ван. Классификация и кластер. М., 1980.
6. Хачатурян А. А. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 385—390, 1980.
7. Abstracts of 2nd Conference on Taxonomy and Automatic Identification of Bacteria. Prague, Czechoslovakia, June 29—July 3, 1987.
8. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8-ed. Baltimore: Williams et Wilkins Co., 1974.
9. Bonde J. J. Danish Medical Bull., 22, 2, 41—61, 1975.
10. De Barjac H., Bonnefol A. Entomophaga, 18, 5—17, 1973.
11. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. N. The Genus Bacillus. Agricult. Handbook N 427, Washington, D. C., 1973.
12. Gower I. C. Biometrika, 53, 3—4, 325—338, 1966.
13. Gower I. C. Appl. statistics, 18, 54—61, 1969.
14. Lysenko O. Insect. Pathol. The Advanced Treatise, 2, Acad. Press, New York, 1—20, 1963.
15. Sneath P. H. A., Sokal R. R. Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, 15, 573, 1973.

Поступило 13.VII 1989 г.