

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* МЕТОДОМ ФУЗИИ СФЕРОПЛАСТОВ

С.Н. БАГДАСАРЯН, Э.К. АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН и Республиканский центр депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки РА, 378510, г. Абовян

Получены и охарактеризованы рекомбинанты энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* *subsp. galleriae* и *subsp. caucasicus* с использованием метода фузии сферопластов. Показана возможность получения рекомбинантных форм с новым спектром энтомоцидного действия. Рекомбинантные штаммы обладают инсектицидной активностью против тутаового шелкопряда, яблонной моли и бомбылиниины.

Ստացվել է րեկոմբինացիայի են ներտնայարդեն բակտերիաների *Bacillus thuringiensis* *subsp. galleriae* և *subsp. caucasicus* ի, ռեկոմբինանտ մեկը սֆերոպլաստների ֆուզիայի եղանակով Յուլյո 1 տրոփել միջատապան ազդեցության նոր սպեկտրով հիբրիդ մեկերի ստացման ենարավորությունը Ռեկոմբինանտ շտամները օժտված են միջատապան ակտիվությամբ բոմբուլ չերամորդի խնձորենու, ցեցի և պղծսրիբերի նկատմամբ

Using spheroplasts fusion method the recombinants of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* *subsp. galleriae* and *subsp. caucasicus* have been obtained and characterized. The possibility of receiving the recombinant forms with new spectrum of entomopathogenic activity has been shown. Recombinant strains revealed insecticide action on larvae of *Bombyx mori*, *Hyponomeuta malinellus* Zell and *Apona Crataegi* L.

Энтомопатогенные бактерии - фузия сферопластов - рекомбинанты - *Bacillus thuringiensis*

Энтомопатогенные спорообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (BT) продолжают оставаться основным источником производства инсектицидных препаратов для борьбы с насекомыми - вредителями сельского хозяйства [2,3,6].

Развитие микробиометода тесно связано с поиском и выделением новых активных штаммов - продуцентов энтомоцидных кристаллов, в основном из культур *Bacillus thuringiensis*. Выделены и охарактеризованы разновидности этих бактерий, активные против молей, непарного шелкопряда, колорадского жука, комаров, домашней мухи и паутиного клеща [1,5,7-9,14].

Успехи генетики и генетической инженерии открыли перспективные направления в области создания новых высокоэффективных штаммов энтомопато-генных бактерий. С открытием способности сферопластов поглощать чужеродную ДНК [11] появилась возможность их широкого использования в работах по получению гибридных и рекомбинантных форм микроорганизмов [13,15-17].

В данной работе представлены результаты использования фузии сферопластов для получения рекомбинантов BT.

Материал и методика. Объектом исследования служили противительные штаммы BT для выработки препаратов энтобактерии - *subsp. galleriae* и ГИИ - *subsp. caucasicus* (*darmstadtensis*). Истемляющиеся культуры тешириваны в отсекции Республиканского центра

ленирования микробов (РЦДМ) как *Bacillus thuringiensis subsp. galleriae* ИИМИА-1000 и *Bacillus thuringiensis subsp. caucasicus* ИИМИА-844 [4].

Для выращивания и поддержания культур использовали питательную среду МПА с добавлением (%): дрожжевой автолизат - 1,0, глюкоза - 0,2, агар-агар - 2,0. Конечный pH среды 7,0-7,2.

Ауксотрофность культур проверяли на минимальной среде ОСА (%): K_2HPO_4 - 0,7, KH_2PO_4 - 0,3, $MgSO_4$ - 0,01, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1, $NaCl$ - 0,05, глюкоза - 0,02 с 0,5-1,0% Difco агара.

Для получения и стабилизации протопластов использовали следующие среды: среда ССМ (%) : сахараза - 34,23, яблочнокислый натрий - 0,71, $MgCl_2$ - 0,095, pH 6,5; среда ПС (%) : панкреатический пептолизат казеина - 1,5, K_2HPO_4 - 0,73, дрожжевой экстракт - 0,5, глюкоза - 0,2, pH 7,0-7,2; среда ССМП: ССМ - ПС в соотношении 1:2.

Фузию сфероластов *BT* и отбор рекомбинантных форм проводили по схеме, представленной на рис. 1.

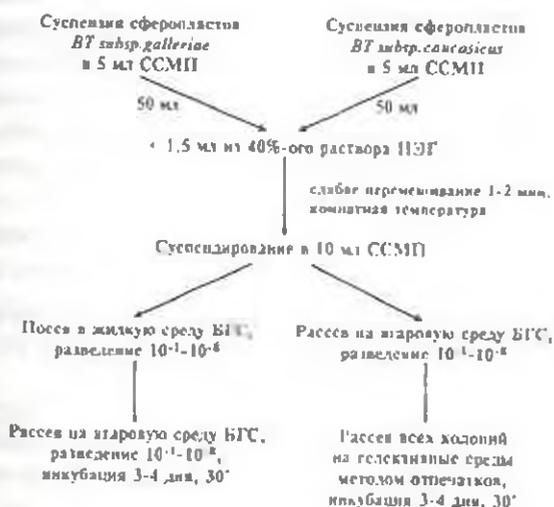


Рис. 1. Фузия и отбор рекомбинантов

Сфероласты *BT* получали под воздействием лизоцима в конечной концентрации 10 мг/мл среды ССМП. Слияние сфероластов осуществляли в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) в конечной концентрации 28%. Для регенерации сфероластов использовали максимальную гипертоническую среду БГС (состав: растворы а, б и в) БГСх2 (а) Na_2CO_3 - 135,075, панкреатический гидролизат казеина - 15, K_2HPO_4 - 3,5, KH_2PO_4 - 1,5, $MgCl_2$ - 0,047, дрожжевой экстракт - 1,0, лизин - 0,02, pH 7,4, стерилизация 0,5 атм 20 мин; (б) растворить в 1 л дистиллированной воды 30 г агара Difco, стерилизация 1 атм 20 мин; (в) 40%-ный раствор глюкозы (холодная стерилизация) на расчете 0,2%

Физиолого-биохимические особенности и рыхтовые потребности изучали согласно методам по идентификации рода *Bacillus* [12]. Антигенные свойства определяли по методу Де Баржак и Бонфуа [10].

Для определения энтомоцидной активности исследовали следующие биотесты: гусеницы тутового шелкопряда *Bombix mori* L. III-IV возраста и личинки вошаной моли *Galleria mellonella* L. VI-VII возрастов. Испытания на личинках яблонной моли (*Hyponomeuta malinella* Zell.) и боярышницы (*Apylla crataegi* L.) проводили в Институте защиты растений МСХ Армении.

Биомассу испытуемых культур нарабатывали в жидкой среде МБП + 1% глюкозы. Культуры выращивали при 37° в течение 24-38 ч, на качалке с 200 об/мин. Испытуемые штаммы в указанных условиях образовывали 95-100% спор и кристаллов.

Результаты и обсуждение. С использованием жидкой питательной среды БГС, благоприятной для регенерации сфероластов рекомбинантных форм *BT subsp. galleriae* и *subsp. caucasicus* и при последующем расसेве на

агаризованной среде БГС были получены 463 колонии (в 3 чашках в разведении 1×10^{-5} , всего 32 колонии, 1×10^{-7} - 3 чашки, всего 119 колоний и 312 колоний в разведении 1×10^{-6}). Все колонии методом отпечатков были пересеяны на селективные среды для отбора рекомбинантов по признаку измененной или утерянной ауксотрофности. Из общего числа колоний получено 27 штаммов, отличающихся от исходных форм ростом на минимальной среде ОСА. Все 27 штаммов при повторной проверке оказались стабильными прототрофами. 47 штаммов отличались способностью расти на селективной среде с добавленным биотином и никотиновой кислотой, в то время как родительские формы в случае хорошего роста на этой же среде не росли на среде ОСА-биотин - штамм ИНМИА-1000 и на среде ОСА+никотиновая кислота - штамм ИНМИА-844. Данные проверки витаминной зависимости полученных рекомбинантных форм подтвердили, что все 47 штаммов отличаются от исходных родительских форм одновременной зависимостью от биотина и никотиновой кислоты. Результаты подтвердились после трехкратной очистки отобранных шести рекомбинантов (R) и проверки ауксотрофности всех расщепившихся клонов.

Изучение культуральных, морфологических, серологических и физиолого-биохимических признаков выявило следующее (табл. 1).

Таблица 1. Дифференциальные признаки рекомбинантных штаммов, полученных фузией сферопластов культур *BT subsp.galleriae* и *subsp.caucasicus*

Штаммы	Серотип; антиген	Ферментация салицила	Образование				Зависимость от		
			лецитиназы	уреазы	глицерина	пиримена	никотина	никотиновой К-ТЦ	биотина + ник. К-ТЦ
Исходный ИНМИА-1000	5	+	-	+	-	-	-	+	-
Исходный ИНМИА-844	10	-	+	-	+	+	+	-	-
R-11	5+10	+	+	+	-	+	-	-	+
R-12	5+10	+	+	-	-	+	-	-	+
R-16	5+10	+	+	-	-	+	-	-	+
R-17	5+10	+	+	-	-	+	-	-	+
R-27	5+10	±	+	-	-	+	-	-	+
R-46	5+10	+	+	-	-	+	-	-	+

По морфологическим признакам полученные рекомбинанты сходны с родительскими формами: клетки палочковидные, грамположительные, с округлыми концами, содержимое молодых особей гомогенно, со временем становится зернистым, образуются овальные споры через 1,5-2 суток инкубации в МПБ при 32°, а процессе высевания спор завершается к 48-72ч. По ходу спорообразования в клетках образуются белковые параспоральные включения - дельта-токсин ромбовидной формы. Между полученными культурами имеются различия в количестве образования спор и токсинов, а также в величине кристаллов.

Серологические исследования выявили агглютинацию всех

рекомбинантов с Н-антисыворотками *BT* серотипов 5 и 10. Исходные штаммы серотипизировались - шт. ИИМИА-1000 серотипа Н5 и шт. ИИМИА-844 серотипа Н10.

По большинству физиолого-биохимических признаков отмечается идентичность рекомбинантов с родительскими штаммами: хороший рост при рН 5,7, 7% NaCl, гидролиз крахмала, образуют дигидроксоацетон, ацетилметилкарбинол. От родительского штамма ИИМИА-1000 рекомбинанты наследовали такие важные свойства, как ферментация салицина, наличие Н-антигена серотипа 5, зависимость от никотиновой кислоты и отсутствие образования пленки при росте в жидкой среде. По продуцированию лецитиназы и пигмента, отсутствию образования уреазы, зависимости от биотина, наличию Н-антигена серотипа 10 и синтезу параспоральных включений ромбовидной формы рекомбинанты сходны с другим донором - штаммом ИИМИА-844.

Рекомбинантные формы характеризуются одинаковыми с родительскими штаммами потребностями в сахарах: они усваивают рибозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, целлобиозу, мальтозу, трегалозу, инулин, глицерин, лимонную, янтарную, олеиновую кислоты. Не усваивают ксилозу, рамнозу, арабинозу, сорбозу, лактозу, сахарозу, раффинозу, дульцит, маннит, сорбит, щавелевую кислоту. Незначительные отличия отмечены у 4 штаммов, которые дополнительно усваивают салициловую, молочную, малеиновую, фумаровую кислоты, а из сахаров - арабинозу, рибозу, дульцит.

Все рекомбинанты характеризуются одинаковой подверженностью действию антибиотиков и идентичностью с исходными формами: рост родительских и рекомбинантных форм угнетался большинством использованных препаратов антибиотиков; устойчивость была отмечена к пенициллину, полимиксину, колестилину, гризеофульвину, амфомидину, субтилину и колимицину.

Сочетание вышеуказанных признаков, а также одновременная зависимость от биотина и никотиновой кислоты и наличие 2 Н-антигенов серотипов 5 и 10 дает нам основание заключить, что выделенные штаммы являются рекомбинантными и отличаются от родительских форм наследованием признаков исходных штаммов.

Результаты изучения энтомоцидной активности рекомбинантных форм выявили частичную вирулентность штаммов *R-17* и *R-27* к вошаной моли (20% гибель личинок на 7 день подкормки) и безвредность штаммов *R-46*, *R-4*, *R-16*, *R-12*. Все 6 рекомбинантных культур вызвали 100%-ную гибель гусениц тутового шелкопряда. На основании изучения комплекса физиолого-биохимических, серологических, морфологических и инсектицидных свойств полученных рекомбинантных форм был отобран штамм *R-27* и передан на испытание в Институт защиты растений. Указанный штамм вызвал 90%-ную гибель личинок яблонной моли на 4 день испытаний и 100%-ную смертность боярышницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И.В., Штерншис М.В. Защита растений, 11, 41-42, 1995.
2. Африкян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. 420, Ереван, 1973.
3. Африкян Э.К. Успехи микробиологии, 10, 142-172, 1975.
4. Африкяна Э.Г., Хачатурян А.А. (ред.) Каталог культур микроорганизмов. Изд-во "Гитутюн" НАН Армении. 260, Ереван, 1996.
5. Григорьева Т.М., Кузнецова Н.И., Шагов Е.М., Азизбекян Р.Р. Биотехнология, 9-10, 7-10, 1994.
6. Гулий В.В., Теплякова Т.В., Иванов Г.М. Микроорганизмы, полезные для микробиометода. Новосибирск, 1981.
7. Кузнецова Н.И., Смирнова Т.А., Шамшина Т.Н., Ганушкина Л.А., Азизбекян Р.Р. Биотехнология, 3-4, 11-14, 1995.
8. Шаецов В.В., Щелкова Е.В., Жиглецов С.К. Патент РФ N2033721, 1995.
9. Afrikian E.G. In: Bioprocess Engineering. Ellis Horwood Ltd, Chichester, 276-290, 1989.
10. Barjac H., de Bonnefoi A.A. Entomophaga, 7, 1, 1962.
11. Fodor K., Demiri E., Alföldi L. J. Bacteriology, 135, 68-70, 1979.
12. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus *Bacillus*. USDA, Washington, 283, 1972.
13. Harris H. Cell Fusion. 1970.
14. Lopez-Meza J.E., Federici B.N., Johnson J.J., Ibarra J.E. FEMS Microbiol. Lett., 134, 2-3, 195-201, 1995.
15. Mu Guojun, Dong Yukun, Huang Guanhui Weishengwu Xuebao-Acta Microbiol. Sin., 35, 5, 322-326, 1995.
16. Schaeffer P., Cami B., Hotchkiss R.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2151-2155, 1976.
17. Zou Hua, Mi Tiejuan, Zhang Zhongze, Su Fengyan, Hao Dongmei, Wang Yuying, Qing Gine Weishengwuxue tongbao=Microbiology, 34, 4, 310-315, 1994.

Получила 18.V.1997