

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

биол. журн. Армении, 3 (51), 1998

УДК 576.85.5:631.523

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ СЛИЯНИЯ СФЕРОПЛАСТОВ
ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ КУЛЬТУР *B.POPILLIAE* И *B.THURINGIENSIS*
subsp.galleriae

С.Н. БАГДАСАРЯН

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

В результате слияния сферопластов культур *Bacillus popilliae* и *Bacillus thuringiensis subsp.galleriae* получены и выделены рекомбинантные формы. Дана характеристика культуральных, морфологических, физиолого-биохимических, антигенных и инсектицидных свойств полученных рекомбинантов. Полученные стабильные продукты слияния сферопластов - фоторезистентные, прототрофные, не продуцирующие собственный фаз, образующие высокий процент спор и параспоральных белковых включений, активных против гусениц тутового шелкопряда, воцинной моли и комаров.

Ստացվել և անջատվել են ռեկոմբինանտ ձևեր *Bacillus popilliae* և *Bacillus thuringiensis subsp.galleriae* կուլտուրաների սֆերոպլաստների միաձուլման արդյունքում: Տրվել է ստացված ռեկոմբինանտների կուլտուրալ, մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական, բիոքիմիական, հակազենային և միջատասպան հատկությունների բնութագիրը: Սֆերոպլաստների միաձուլումից ստացվել են հաստատուն ձևեր, որոնք ֆազալիզում են, պրոտոտրոֆ, սեփական ֆազ չեն առաջացնում, կազմավորում են սպորների և պարասպորալ սպիտակուցային ներառուկների բարձր տոկոս, ակտիվ են թրեմու շերամի բրբրոնների, *Galleria melonella*-ի և մոծակների նկատմամբ:

The recombinant forms have been obtained and isolated as a result of spheroplasts fusion of *Bacillus popilliae* and *Bacillus thuringiensis subsp.galleriae* cultures. The cultural, morphological, physiologo-biochemical, antigenic and insecticidal properties of obtained recombinants have been characterized. The stable forms of spheroplasts by method of fusion have been obtained, which are phage stable and prototrophs, don't produce own phage, form high percent of spores and parasporal protein inclusions, are active against caterpillars of silkworm, larvae of *Galleria melonella* and mosquitoes.

Bacillus popilliae - *Bacillus thuringiensis* - *фузия сферопластов - рекомбинанты*
- *энтомоцидная активность*

Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* (BT) служат основой для промышленной выработки инсектицидных препаратов [1,3,4]. Однако они имеют ряд недостатков: ограниченный спектр энтомоцидного действия, нестабильную инсектицидную активность, подверженность фаголизису и внешним воздействиям [2,7,10].

На современном этапе развития микробиометода главной задачей является выделение и характеристика новых штаммов микроорганизмов, обладающих энтомоцидностью к таким видам вредоносных насекомых, против которых нет эффективных средств борьбы. В результате получения новых штаммов значительно расширен спектр энтомоцидного действия этих препаратов [6,8,9,16]. Перспективные исследования проводятся в плане направленного получения высокопродуктивных штаммов с использованием современных генетических методов.

Особый интерес представляет получение культур-рекомбинантов методом фузии сферопластов [13,15,17].

В нашей работе ставилась задача получения новых рекомбинантов слиянием сферопластов культур *BT subsp.galleriae*, активных против представителей *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* и *Bacillus popilliae* (BP) - возбудителей молочных болезней японского жука.

Материал и методика. Объектом исследования служили энтомопатогенные бактерии из Коллекции Республиканского центра депонирования микробов (РЦДМ) *BT subsp.galleriae* шт. ИНМИА В-1000 и *BP* шт. ИНМИА В-10802 [5].

Для получения и стабилизации сферопластов использовали следующие среды (г/л дист. воды):

1. Среда СрIII: панкреатический гидролизат казеина - 15,0; K_2HPO_4 - 7,87; глюкоза - 2,0; биотин - 2,0 мкг; тиамин - 400 мкг; никотиновая кислота - 5000 мкг. pH 7,45.
2. Среда ССМ: сахароза - 34,23; Na-малеат - 0,71; $MgCl_2$ - 0,095. pH 6,5.
3. Среда ССМII: (ССМ x 2) + (СрIII x 4).

В качестве регенерирующих сред использовали агаризованные среды СрII+н и БIC (панкреатический гидролизат казеина -15,0; Na сукцинат - 135,075; K_2HPO_4 - 1,5; $MgCl_2$ - 0,047; биотин - 2,0 мкг; тиамин - 400 мкг; никотиновая кислота - 5000 мкг; лизин - 0,02; глюкоза - 20,0, pH 7,3)

В качестве минимальной использовали предложенную Сильвестром и Кастлюу [14] среду ССК без витаминных добавок.

Отбор рекомбинантов производили на среде ССК с добавлением отдельно и совместно никотиновой кислоты, биотина и тиамина. Конечные концентрации (мкг/мл): никотиновой кислоты - 5,0; биотина - 0,02 и тиамина - 5,0.

После трехкратной очистки отношение рекомбинантных форм к витаминам группы В определяли аукоэлектрофоретическим методом на среде ОСА (г/л): K_2HPO_4 - 7,0; KH_2PO_4 - 3,0; $MgSO_4$ - 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ - 1,0; NaCl - 0,5; глюкоза - 0,2 с добавлением гидролизата казеина, освобожденного от витаминов, в концентрации 800 мкг/л и 1,2% агара Дифко.

Сферопласты *BT* получали в питательной среде ССМII обработкой лизоцимом.

Сферопласты *BP* получали совместным выращиванием культур *BP* и *BT*. Культуру *BP* выращивали в жидкой питательной среде СрII при 30°, на качалке с 220 об/мин в течение 24 ч. Осажденную биомассу *BP* вносили в культуральную жидкость 6-часовой культуры *BT subsp.galleriae* шт. ИНМИА В-1000, выращенной на той же среде и освобожденной от вегетативных клеток центрифугированием при 5000 об в течение 15 мин. Массовое образование сферопластов наблюдали спустя 48 ч инкубации при 30° в стационарных условиях.

Слияние сферопластов проводили в жидкой среде ССМII с добавлением полиэтиленгликоля (ПЭГ) в конечной концентрации 28%. Регенерацию сферопластов осуществляли на агаризованной среде БIC в течение 3-4 сут, при 30°.

Физиолого-биохимические свойства и ростовые потребности изучали согласно методам, принятым для идентификации рода *Bacillus* [12], серотипизацию - по общепринятой методике [13].

Продуцирование спор и энтомоцидных кристаллов изучали в динамике роста на жидких и агаризованных средах методом микроскопии живых и окрашенных препаратов.

Энтомоцидную активность определяли на личинках комаров (*Aedes aegypti* L.) II и III возрастов, гусениц тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.) сорт "Иверия" III-IV возрастов и личинках воциноной моли (*Galleria melonella* L.) VI-VII возрастов.

Результаты и обсуждение. Согласно данным, представленным в табл.1, из общего числа культур (302) получены 28 штаммов, которые отличаются от родительских форм. Все 26 штаммов (2 штамма не выросли) оказались прототрофами, не зависели от витаминов группы В. Не наблюдалось формирования прототрофных колоний в смеси бактерий родительских форм, обработанных в тех же условиях, что и сферопласты, а также в смеси сферопластов исходных форм без обработки ПЭГ. Полученные данные подтверждают, что прототрофные клетки формировались в результате слияния сферопластов различных ауксотрофных форм в присутствии ПЭГ. Можно утверждать, что спонтанное слияние сферопластов в смеси двух родительских форм без обработки ПЭГ исключается.

Таблица 1. Отбор рекомбинантных форм *B. popilliae* и *B. thuringiensis* на селективных средах

Варианты опыта		Общее число полученных штаммов	Рост на селективных средах (число выросших культур)							Число полученных Р-форм	
			ССК	ССК + никотиновая кислота	ССК + биотин	ССК + тиамин	ССК + биотин + никотиновая кислота	ССК + никотиновая кислота + тиамин	ССК + биотин + тиамин		ССК + биотин + тиамин + никотиновая кислота
Обработка смеси сферопластов <i>B. popilliae</i> и <i>B. thuringiensis</i> ПЭГ		302	28	302	28	28	302	302	28	302	28
Обработка смеси клеток ПЭГ		102	-	102	-	-	102	102	-	102	-
Родительские штаммы	<i>B. thuringiensis</i>	1	-	1	-	-	1	1	-	1	-
	<i>B. popilliae</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Смесь сферопластов <i>B. popilliae</i> и <i>B. thuringiensis</i> (без обработки ПЭГ)		19	-	19	-	-	19	19	-	19	-

Полученные штаммы являются стабильными продуктами слияния сферопластов - рекомбинантами (R-формами), на что указывает сохранение признака прототрофности, способности расти на минимальной среде спустя 2 месяца после выделения или через 4-5 генераций.

На основании полученных данных по изучению физиолого-биохимических особенностей можно заключить, что 24 штамма характеризуются одинаковым отношением к усвоению источников углерода. Они потребляют рибозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, целлобиозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, крахмал, глицерин, декстрин. Как и

родительский штамм, *BT subsp. galleriae* шт. ИНМИА В-1000 не усваивают келлозу, рамнозу, арабинозу, маннозу, сорбозу, лактозу, раффинозу, дульцит, маннит и сорбит. Все штаммы, как и исходная родительская культура, обладают активными протеолитическими и ампиолитическими свойствами, нуждаются в аминокислотах.

Культуральные особенности: на агаризованной среде СПА (сухой питательный агар) образуют плоские, зернистые, гладкие, матовые, кремовато-белые колонии, со слабо ризондными краями. Ломтик картофеля - обильный, беловато-кремовый, гладкий. Рост на МПБ (мясо-пептонный бульон): помутнение с образованием придонного осадка, пленку не формируют.

Вегетативные клетки: палочковидные с округлыми концами, содержимое клеток у молодых особей гомогенно, со временем - зернистое, грамположительные, образуют овальные споры примерно через сутки инкубации при 32° в жидком питательном бульоне, процесс высвобождения спор завершается к 38-42 ч. По ходу спорообразования в клетках образуются включения, токены, напоминающие луковичу (нечеткий ромб).

Серотипизация культур выявила, что все штаммы агглютинировались гомологичной сывороткой к H антигену серотипа 5 в титрах 1:16000, что соответствует серотипу исходной культуры.

Данные изучения энтомоцидности на личинках вошковой моли при их ингенной подкормке в течение всего периода инкубации (до окукливания) свидетельствуют о частичной утере энтомоцидной активности: полученные рекомбинанты вызывали от 7 до 20% гибели личинок на шестой день инкубации, тогда как исходный штамм вызывал 100%-ную гибель. Штаммы Р-20 и Р-22 вызывали гибель комаров спустя 48 ч.

Все культуры-рекомбинанты оказались вирулентными в отношении гусениц тутового шелкопряда. Была получена 100%-ная гибель гусениц при подкормке всеми штаммами.

Рекомбинанты, за исключением штаммов Р-20, Р-23, Р-27, продуцировали вирулентный фаг при 20 последовательных пассажах. При перекрестном испытании фаголизатов 16 культур выявлено, что все 3 штамма, не продуцирующие фаг, оказались устойчивыми к действию всех использованных фаголизатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян З.Г., Багдасарян С.Н., Африкян Э.К. АС СССР N 922139, 1981.
2. Андреева И.В., Штерншиш М.В. Защита растений, 11, 41-42, 1995.
3. Африкян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. 420, Ереван, 1973.
4. Африкян Э.К. Успехи микробиологии, 10, 142-172, 1975.
5. Африкян Э.Г., Хачатурян А.А. (ред.) Каталог культур микроорганизмов. Изд-во "Гитутюн" НАН Армении, 260, Ереван, 1996.
6. Григорьева Т.М., Кузнецова Н.И., Шагов Е.М., Азизбекян Р.Р. Биотехнология, 9-10, 7-10, 1994.
7. Гулий В.В., Теплякова Т.В., Иванов Г.М. Микроорганизмы, полезные для

- микробиометода. Новосибирск, 1981.
8. Кузнецова Н.И., Смирнова Т.А., Шамилина Т.Н., Ганушкина Л.А., Азизбеян Р.Р. Биотехнология, 3-4, 11-14, 1995.
 9. Меликсетян В.Ш., Кулькова Т.А., Чилингарян К.О., Африкян Э.Г., Алексеев А.П., Карпов Э.Г., Игнатъев В.И. АС СССР №1398120, 1987
 10. Швецова О.И., Зурабова Э.Р. ОНТИ Микробиопром, М., 1972.
 11. Barjac H., de Bonnefoi A.A. Entomophaga, 7, 1, 1962.
 12. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus *Bacillus*. USDA, Washington, 283, 1973.
 13. Lopez-Meza J.E., Federici B.N., Johnson J.J., Ibarra J.E. FEMS Microbiol. Lett., 134, 2-3, 195-201, 1995.
 14. Sylvester C.J., Costilow R.N. J. Bacteriol., 87, 114-119, 1964.
 15. Waalwijk C. Opportun. Mol. Biol. Crop. Prod.: Proc. Int. Symp., Cambridge, 47-58, 1993.
 16. Wu Jixing, Chen Zaier, Xie Tianjian, Zhong Zian-Sheng Weishengwuxue tongbao= Микробиология, 22, 4, 195-197, 1995.
 17. Yuying, Ding Jine Weishengwuxue tongbao=Microbiology, 34, 4, 310-315, 1994.

Поступила 10.XI.1997

Биолог. журн. Армении, 3 (51), 1998

577.15.591.8

ИССЛЕДОВАНИЕ L-АМИНОКИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ У *ASPERGILLUS NIGER* R-3

С.П. ОГАНЕСЯН, А.Р. ПАПОЯН, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Проводилось исследование субклеточных фракций (пероксисом) мицелиального гриба *Aspergillus niger* R-3, полученных посредством изотопической сепарации в градиенте 0,5M раствора сахарозы и 15% перколита. Показано, что для проявления активности оксидазы L-аминокислот наиболее оптимальным являются 0,5% D-глюкоза и 1/4 нормы источника азота - L-аланина в питательной среде.

Անոսմնափրվել են *Aspergillus niger* R-3 միցելիալ սնկի ենթաբջջային ֆրակցիաները պերօքսիսոմները, ստացված 0,5մ սախարոզի և 15% պերկոլի գրադիենտում իզոպիկնիկ բաժանման միջոցով: Հաստատվել է, որ L-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության դրսևորման համար առավել բարենպաստ են 0,5% D-գլյուկոզի և ազոտի աղբյուրի աղբյուրի L-ալանինի, 1/4 կոնցենտրացիայի պարունակությունը սննդամիջավայրում:

The subcellular fractions (peroxisomes) of *Aspergillus niger* R-3 have been studied by isopicnic separation in gradient of 0.5M sucrose and 15% Percoll. The presence of 0.5% D-glucose and 1/4 concentration of L-alanine as source of nitrogen in growth medium is the optimal condition for synthesis of L-aminoacid oxidase activity.

Aspergillus niger - L-аминокислотная оксидаза - пероксисомы