

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Б.П. КАРАБЕКОВ, А.С. ОВСЕПЯН, А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕСЯН,
А.С. ЗУРАБЯН

НИИ "Биотехнология", АОЗТ, 375056, Ереван

Исследована возможность предотвращения лизиса зараженной бактериофагом растущей культуры *Bacillus thuringiensis var.galleriae* внесением в питательную среду химических факторов, способных вмешаться в процессы взаимодействия фага с бактериальной клеткой: L-дипиколиновой кислоты, ряда поверхностно-активных производных аминокислот, а также производных адамантана, обладающих антивирусным действием. Рассматриваются перспективы их применения для предотвращения фаголизиса культуры-продуцента в промышленных условиях.

Ուսումնասիրվել է *Bacillus thuringiensis var.galleriae*-ի բակտերիոֆագով վարակված աճող կուլտուրայի լիզիսի արգելակման հնարավորությունը որոշ քիմիական գործոնների ազդեցությամբ: Ի հայտ են բերված հակավիրուսային հատկությամբ օժտված L-դիպիկոլինաթթվի, ամինաթթուների մակերեսային ակտիվ և ադամանտանի ածանցյալները, որոնք ընդունակ են արգելակել կամ զգալիորեն ուշացնել բակտերիալ կուլտուրայի լիզիսը:

Prevention of the lysis in the growing culture of *Bacillus thuringiensis var.galleriae* contaminated with bacteriophage was researched. Some of the used substances for example L-dipicolinic acid, surface active derivatives of a number of aminoacids and also adamantan derivatives with antiviral action was researched. Prospects of their industrial application for preventing the phage lysis of the producing strains are considered.

Бактериофагу Bacillus thuringiensis - энтобактерин - ингибиторы фаголизиса

Исследования, посвященные решению проблемы борьбы с промышленным фаголизисом *Bacillus thuringiensis* в производстве энтобактерина в основном проводились в направлении повышения устойчивости штаммов-продуцентов к атаке бактериофагов путем получения фагорезистентных мутантов [2, 4, 5-7]. Однако эти работы до настоящего времени не дали сколько-нибудь ошутимых результатов, что, по-видимому, объясняется, в частности, высокой чувствительностью указанного микроорганизма практически ко всем бактериофагам, когда-либо выделенным на *B.thuringiensis* и *B.cereus* [8, 11]. В этом отношении штаммы *var.galleriae* можно рассматривать в качестве универсального хозяина для бактериофагов указанных групп микроорганизмов [11].

В свете сказанного представляется актуальным поиск иных путей решения проблемы. Одним из таких путей может быть отбор неспецифических средств, ингибирующих фаголизис бактериальных клеток.

По литературным сведениям, неспецифическое прерывание механизмов взаимодействия бактериальных клеток и их вирусов-бактериофагов может быть осуществлено путем добавления в питательную среду различных компонентов или удаления из нее кофакторов адсорбции

фага на бактериальной клетке [1, 3, 11]. Так, внесение в питательную среду L-дипиколиновой кислоты в конечной концентрации 0,4 мг/мл предотвращает фаголизис клеток *B.cereus* [11]. Такой же результат был получен в опытах с фагом SP-10 на *B.subtilis* [12]. Нами было показано, что при отсутствии ионов магния в среде бактериофаги *Corynebacterium glutamicum* не размножаются [3].

Согласно данным японских исследователей, добавление в культуральную среду некоторых производных аминокислот приводит к задержке лизиса зараженных фагом бактериальных клеток [10]. В результате этих работ компанией "Ajinomoto" запатентован способ, позволяющий избежать фаголизиса или уменьшить вред, наносимый бактериофагом при производстве аминокислот [9].

В настоящей работе представлены результаты поиска эффективных средств, способных ингибировать фаголизис у *B.thuringiensis var.galleriae*.

Материал и методика. Использовали продуцент энтобактерина - производственный штамм *B.thuringiensis var.galleriae* 69-6 (серотип H5a-5b), полученный из Центрального музея промышленных микроорганизмов, (Москва). Штамм чувствителен к широкому спектру бактериофагов, выделенных как в условиях производства, так и в лаборатории.

Использовали также вирулентные бактериофаги PG-10, PG-56, PG-42, PG-8, PD-1, PD-2, выделенные в производственных условиях. Все исследованные фаги, кроме фага штамма 69-6, активно лизировали многие штаммы *B.thuringiensis* из нашей коллекции, насыщающей свыше 100 штаммов, представляющих все серотипы и варианты этого микроорганизма.

В качестве питательных сред в работе применяли общепринятые лабораторные жидкие и агаризованные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), 2,0%-ный мясо-пептонный агар для работы с бактериями и 1,2%- и 0,7%-ный мясо-пептонный агар при работе с фагами двуслойным методом Грация [1].

Использовали также производственные среды: кукурузно-глюкозную среду (КГС) и дрожже-полисахаридную среду (ДПС).

В качестве ингибиторов фаголизиса были испытаны обладающие поверхностно-активными свойствами производные аминокислот, синтезированные на кафедре органического синтеза Ереванского государственного университета, два производных адамантана, синтезированных в Институте тонкой органической химии НАН Армении Ц.Е.Агаджаняном и альфа-дипиколиновая кислота, синтезированная на Ереванском заводе химреактивов. Список использованных веществ приводится в табл. I.

Активность препарата определяли в жидкой среде МПБ. Бактериальный штамм засекали в пробирку с 10 мл МПБ и инкубировали в течение ночи при 30° на качалке со скоростью вращения 240±5 об/мин.

На следующий день культуру освежали путем переноса 10% ночной культуры в 10 мл стерильной питательной среды, содержащей исследуемый препарат. Концентрацию препарата определяли экспериментально после определения бактерицидного или бактериостатического действия препарата. Освеженную культуру инкубировали при 30° с аэрацией в течение 2-3 ч, затем ее заражали вирулентным фагом с различной множественностью инфекции (moi). Динамику роста культуры до и после заражения бактериофагом определяли измерением оптической плотности культуральной жидкости на ФЭК М.

Антибактериальное действие различных концентраций исследуемых препаратов определяли по вышеописанной методике, исключая заражение бактериофагом.

Антифаговое действие исследованных препаратов проверяли по методике, описанной для фага T4 (*Virology*, 35,330,1966).

Качественное определение активности исследуемых препаратов проводили спот-тестом: исследуемый препарат в соответствующей концентрации вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7%-ного расплавленного и остуженного до 46° МПА для верхнего слоя, куда предварительно вносили 0,5 мл ночной бактериальной культуры. Затем эту смесь равномерно

наносили на поверхность 1,2%-ного МПА в чашках Петри по методу Грация для получения бактериального газона. Через 1-2 ч на поверхность газона наносили капли бактериофага в титре $1,0 \times 10^7$ фаговых частиц в 1 мл среды. Чашки инкубировали в течение ночи при 30°. В качестве контроля использовали среды, не содержащие исследуемое вещество.

Таблица 1. Препараты, использованные в качестве ингибиторов фаголизиса

№ п/п	Шифр	Название препарата
1	201	Стеароил молочная кислота
2	180	N-стеароил-1-аланин
3	181	N-стеароил-1-аланин
4	184	N-стеароил-1-валин
5	174	N-стеароил-1-метионин
6	178	N-стеароил-DL-аланин
7	185	N-стеароил-L-гистидин
8	206	N-стеароил-DL-метионин
9	207	N-ацетил-DL-аланин
10	203	N-ацетил-DL-лейцин
11	208	N-олеил-L-глутаминовая кислота
12	209	N-стеароил-L-глутаминовая кислота
13	183	N-стеароил-L-лизин
14	212	N-олеил-L-глицин
15	200	2,6-дипиколиновая кислота
16	213	трихлоргидрид L-амино-3,5,7-азада мантан
17	214	хлоргидрид-7-нитро-1,3,5-триазада мантан

Результаты и обсуждение. В целях определения оптимальной множественности инфицирования вирулентным фагом, при котором лизис культуры штамма 69-6 в жидкой питательной среде регистрируется наиболее четко и в сравнительно короткий промежуток времени, проводили опыты с различной множественностью инфицирования. Результаты 4 таких опытов обобщены в табл.2.

Таблица 2. Динамика изменения оптической плотности растущих бульонных культур штамма 69-6 после заражения их фагом PG-10 с различной множественностью инфекции

Множественность инфекции	Оптическая плотность в интервале времени, ч			
	0	2	3	6
moi = 1,0	0,80	1,18	1,00	0,21
moi = 0,1	0,80	1,19	1,74	0,69
moi = 0,01	0,85	1,24	1,98	2,10
moi = 0,001	0,90	1,43	2,08	2,50
moi = 0 (контроль)	0,83	1,38	1,95	2,30

Примечание: 0 часов - время внесения фага в бульонную культуру бактерий.

Из табл.2 видно, что через 6 ч роста после добавления фага к культуре штамма 69-6 фаголизис бактериальных клеток четко регистрируется только при $moi=1,0$ и $0,1$. Эти условия эксперимента были выбраны для определения активности исследованных препаратов, хотя в природе заражение бактериальных клеток вирусом с такой множественностью вряд ли возможно.

Типичная кривая антибактериального действия исследованных производных аминокислот представлена на рис.1. Видно, что эти препараты в концентрации до 100 мкг/мл не оказывают заметного бактериостатического влияния, в то время как в концентрации 150-300 мкг/мл они действуют бактериостатически, прекращая дальнейший рост штамма.

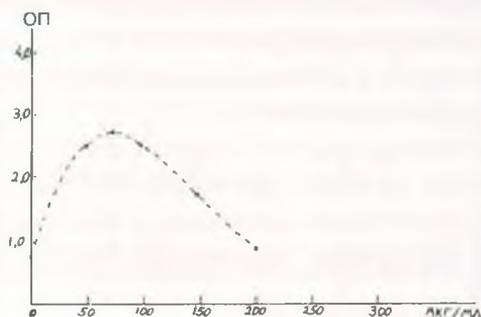


Рис.1. Влияние различных концентраций производных аминокислот на рост штамма 69-6 var. *galleriae*.

Альфа-дипиколиновая кислота (α -ДПК) ингибировала рост штамма 69-6 в концентрации 1,2 мг/мл. В то же время производные адамантана не оказывали антибактериального действия в концентрации до 1000 мкг/мл (рис. 2 и 3).

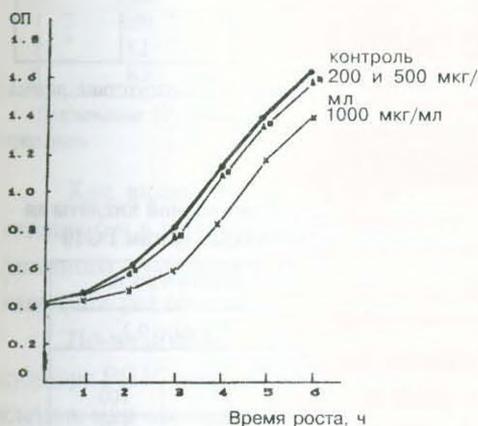


Рис. 2. Влияние различных концентраций трихлоргидрата L-амино-3,5,7-азаадамантана на рост штамма 69-6.

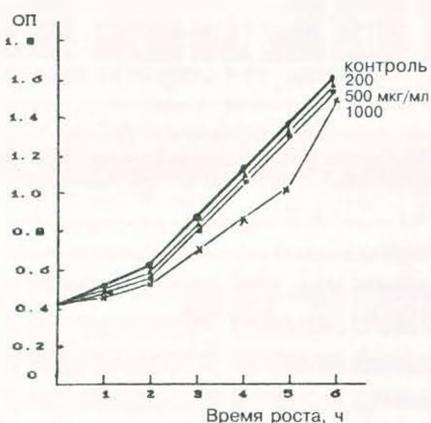


Рис. 3. Влияние различных концентраций хлоргидрата 7-нитро-1,3,5-триазаадамантана на рост штамма 69-6.

Свободный фаг PG-10 инактивировался на 2 порядка при наличии в среде производных адамантана уже в концентрации 200 мкг/мл. На основании этих опытов производные аминокислот испытывали в конечной концентрации 50 и 100 мкг/мл в среде, ДПК - 0,4 и 0,8 мг/мл, а производные адамантана - в концентрации 200 и 500 мкг/мл.

На первом этапе исследований препараты испытывали в спот-тесте с целью выявления качественной реакции на задержку фаголизиса штамма 69-6. Результаты этих опытов приведены в табл.3.

Из табл.3 видно, что только 6 из 17 исследованных в спот-тесте препаратов ингибируют фаголизис штамма 69-6, вызванный разными бактериофагами.

В табл.4 приведены результаты испытания препаратов в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в жидкой среде при множественности заражения фагом $moi = 1,0$ и $0,1$.

Таблица 3. Влияние испытуемых препаратов на фаголизис штамма 69-6, вызванный различными бактериофагами

N п/п	Шифр препарата	Бактериофаги					
		PG10	PG56	PG42	PG8	PD1	PD2
1	174	+	-	-	-	-	-
2	178	+	-	-	-	-	-
3	180	-	-	-	-	-	-
4	181	-	-	-	-	-	-
5	183	-	-	-	-	-	-
6	184	+	-	-	-	-	-
7	185	-	-	-	-	-	-
8	200	-	-	-	-	-	-
9	201	+	-	-	+	+	+
10	203	-	-	-	-	-	-
11	206	-	-	-	-	-	-
12	207	-	-	-	-	-	-
13	208	+	+	+	-	+	-
14	209	+	-	-	-	-	+
15	212	-	-	-	-	-	-
16	213	-	-	-	-	-	-
17	214	-	-	-	-	-	-

Примечание: конечная концентрация препарата - 50 мкг/мл; "+" - отсутствие лизиса; "-" - наличие лизиса.

Таблица 4. Влияние производных аминокислот и стеариломолочной кислоты на процесс фаголизиса штамма 69-6, вызванный вирулентным фагом PG10

N п/п	Шифр препарата	Оптическая плотность через 6 ч роста			
		moi = 1,0		moi = 0,1	
		мкг/мл			
		50	100	50	100
1	174	1,12	1,95	2,20	2,25
2	178	2,15	2,10	2,30	2,15
3	180	0,15	0,48	0,17	0,31
4	181	0,27	0,69	0,29	0,43
5	183	0,43	0,27	0,62	0,25
6	184	1,76	1,98	2,15	2,17
7	185	0,15	0,15	0,23	0,28
8	201	2,15	2,15	2,25	2,25
9	203	0,29	0,15	0,52	0,42
10	206	0,23	0,32	0,98	0,69
11	207	0,25	0,43	0,46	0,28
12	208	1,50	2,10	2,10	2,10
13	209	1,79	1,83	2,05	2,20
14	212	0,21	0,27	0,43	0,65
	K1	2,31	2,05	2,35	2,30
	K2	0,21	0,31	0,69	0,48

Примечание: K1 - контроль 1 - в культуру фаг не добавлен; K2 - контроль 2 - в культуру препарат не добавлен, фагом заразили через 2 ч роста.

Таким образом, экспериментально было показано, что 5 производных аминокислот и стеариломолочная кислота в концентрации 50 и 100 мкг/мл способны задерживать лизис зараженных фагом PG10 клеток штамма

69-6 *var.galleriae*. При этом не менее 90% клеток сохраняют способность к дальнейшему росту в присутствии фага, тогда как за этот же период культура штамма 69-6 на среде, не содержащей какого-либо из этих препаратов, в присутствии того же фага PG10 лизируется полностью.

С целью выявления механизма влияния этих препаратов на процесс взаимодействия фага PG10 и клеток штамма 69-6 определяли титр фага в момент добавления его к культуре штамма 69-6 и через 6 ч культивирования (табл.5).

Таблица 5. Результаты определения титра фаговых частиц в момент заражения фагом PG10 и через 6 ч культивирования

Шифр препарата	Титр фаговых частиц	
	в момент заражения	через 6 ч культивирования
174	$3,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
178	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
184	$1,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
201	$4,6 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
208	$5,2 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
209	$1,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
K1	0	0
K2	$1,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^9$

Примечание: K1 - контроль 1 -культура не заражена; K2 - контроль 2-культура не содержит препарата.

Как видно из табл. 5, в культурах штамма 69-6, инкубируемых в течение 6 ч в присутствии одного из активных препаратов, не происходит заметного изменения титра фага PG10, в то время как в отсутствие их титр фага увеличивается не менее чем на 2 порядка.

По-видимому, добавление испытанных препаратов к зараженной фагом культуре PG10 штамма 69-6 препятствует адсорбции фага на бактериальных клетках или значительно затрудняет этот процесс, в результате чего лизис бактериальных клеток резко задерживается. При этом каких-либо изменений в морфологии бактериальных клеток, в их способности к споруляции и образованию кристаллического эндотоксина не наблюдается.

Для выяснения возможности получения достаточно высокого урожая спор при культивировании штамма 69-6 в присутствии этих препаратов и фага PG10, исследовали продуктивность его на двух производственных средах - ДПС и КГС за 48 ч роста при $\text{mOI} = 1,0$ и концентрации препаратов 100 мкг/мл. Результаты этих опытов суммированы в табл.6.

Видно, что эффективность защиты культуры продуцента от фаголизиса не превышает 60%, поэтому эти препараты на данном этапе не могут быть предложены для применения в производстве. Проведенные исследования показали, однако, что поиск веществ, способных защитить культуру продуцента энтобактерина *B.thuringiensis var.galleriae* от атаки вирулентных бактериофагов, перспективен. Полученные результаты позволили предположить, что действие исследованных препаратов на процесс фаголизиса является неспецифическим и не зависит от того, каким

фагом заражается чувствительная культура. Для проверки этого предположения опыты с отобранными веществами были проведены также с другими вирулентными фагами, полученными из Бердского химического комбината (Новосибирская область, Россия). При концентрации препаратов 100 мкг/мл и $mo_i = 1,0$ через 6 ч роста новые фаги с высокой эффективностью лизировали штамм 69-6 *var.galleriae* (табл. 7).

Таблица 6. Продуктивность спорообразования штамма 69-6 в присутствии фага PG10 и производных аминокислот

Шифр препарата	ДПС		КГС	
	продуктивность, спор/мл		продуктивность, спор/мл	
	абс	%	абс	%
K1	$2,9 \times 10^9$	100,0	$2,5 \times 10^9$	100,0
K2	$0,6 \times 10^8$	2,1	$1,0 \times 10^8$	4,0
174	$1,3 \times 10^9$	44,8	$1,1 \times 10^9$	46,0
178	$1,6 \times 10^9$	55,2	$1,3 \times 10^9$	52,0
184	$1,3 \times 10^9$	46,5	$1,3 \times 10^9$	52,0
201	$1,8 \times 10^9$	63,8	$1,2 \times 10^9$	50,0
208	$1,0 \times 10^9$	35,9	$1,0 \times 10^9$	40,0
209	$1,8 \times 10^9$	60,7	$1,0 \times 10^9$	40,0

Примечания к таблице те же, что к таблице 5.

Таблица 7. Влияние производных аминокислот на фаголизис клеток штамма 69-6 новыми бактериофагами

Шифр препарата	Оптическая плотность при заражении фагом					
	PG10 контроль	PG56	PG42	PG8	PD1	PD2
174	1,95	0,29	0,98	0,69	0,27	0,21
178	2,10	0,15	0,32	0,29	0,43	0,27
184	1,98	0,27	0,31	0,23	1,00	0,80
201	2,12	0,15	0,92	2,07	2,17	2,00
208	2,15	2,10	2,10	0,27	1,95	0,15
209	2,05	0,93	1,15	1,00	0,43	2,05
K1	2,30	2,35	2,15	2,25	2,40	2,35
K2	0,29	0,18	0,42	0,31	0,21	0,23

Примечания те же, что к табл. 6.

Из представленных в табл. 7 результатов видно, что среди отобранных препаратов наиболее эффективными оказались стеариломолочная кислота (шифр 201), обеспечивающая защиту штамма 69-6 от 4 фагов (PG10, PG8, PD1, PD2), и N-олеил-L-глутаминовая кислота (шифр 208), также защищающая штамм 69-6 от литического действия 4 вирулентных фагов (PG10, PG42, PG56, PD1). N-стеариломолочная кислота (шифр 209) защищает штамм 69-6 от литического действия 2 фагов (PG10 и PD2). Остальные препараты активны только в отношении фага PG10.

Подобная избирательность в действии испытанных препаратов не

может быть расценена как неспецифическое действие и нуждается в специальных исследованиях. Это обстоятельство, несомненно, снижает ценность подобных препаратов как факторов, которые могут быть рекомендованы для применения в производстве с целью борьбы с промышленным фаголизисом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги, М., Мир, 1961.
2. Алиханян С.И., Ломовская Н.Д., Майсурян А.Н. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 125, 1973.
3. Арутюнян С.Ж., Крылов В.Н., Карабеков Б.П. и др. Авт.свид. СССР N 1235219, 1986.
4. Буяновская З.А., Майсурян А.М. Получение штамма бактерий, обладающих новой формой рестрикции размножения бактериофага. Там же, 133.
5. Звенигородский В.И. Получение и характеристика фагоустойчивых мутантов штамма продуцента энтобактерина. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 126, 1973.
6. Звенигородский В.И. Производственные испытания штамма продуцента энтобактерина, как один из этапов селекции. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 127, 1973.
7. Карабеков Б.П., Оганесян М.Г., Скворцова М.М. Авт.свид. СССР N 699016, 1979.
8. Карабеков Б.П. Тез. II науч. конф. ВМО Закавказских республик. 16-17. Телави, 1979.
9. Патент Франции N 2, 242, 462.
10. Amino acid compound cheek virus. Japan Economic Journal. 12, 600, 10, 1974.
11. Goldberg Y.D., Gallacota K. The phages of *Bacillus cereus*. В кн.: "Spores 2", 276-290, 1961.
12. Thorne C.B. В кн.: "Spores 2", 1961.

Поступила 16.IX.1997