

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЮРИЦИНОВ-БАКТЕРИЦИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Б. П. КАРАБЕКОВ, А. С. ОВСЕПЯН, А. Х. ЧАХАЛЯН, С. К. КЕЛЕШЯН,
Н. Э. МИКАЕЛЯН, С. В. АВЕТЯН

НИИ “Биотехнология”, АОЗТ, 375056, Ереван

Исследована бактерициногенная активность 100 штаммов *Bacillus thuringiensis*, принадлежащих к различным серотипам. Показано, что из них 42 штамма способны продуцировать бактерицины-тюрицины, в том числе 17 штаммов *subsp. galleriae* (серотип 5a:5b) и 9 штаммов *subsp. berliner* (серотип 1). Определены условия культивирования для максимальной продукции тюрицинов; оптимальной средой является мясо-пептонный агар. Идентифицированы 4 типа тюрицинов *B. thuringiensis*. Некоторые штаммы одновременно синтезируют тюрицины двух типов. При обработке этидиум-бромидом или додецилсульфатом натрия происходит элиминация тюрициногенного фактора (Thu' - признака) с частотой 1-2%. Показана возможность передачи Thu' фактора при смешанном культивировании Thu' и Thu- штаммов.

Ուսումնասիրվել է *Bacillus thuringiensis*-ի տարբեր սերոտիպերին պատկանող 100 շտամների բակտերիցինոգեն ակտիվությունը: Պարզվել է, որ դրանցից 42-ը ունեն այդ հատկությունը և արտադրում են բակտերիցիններ-թյուրիցիններ, այդ թվում 17 շտամ *subsp. galleriae* (սերոտիպ 5a:5b) և 9 շտամ *subsp. berliner* (սերոտիպ 1): Որոշվել են թյուրիցինների մաքսիմալ արտադրման համար աճեցման պայմանները, օպտիմալ միջավայր է հանդիսանում մսապեպտոնային ագարը: Իդենտիֆիկացվել են *B. thuringiensis*-ի թյուրիցինների 4 տեսակներ: Որոշ շտամներ միաժամանակ սինթեզում են 2 տեսակի թյուրիցիններ: Եթիդիում բրոմիդով կամ մատրիումի դոդեցիլսուլֆատով մշակելու դեպքում տեղի է ունենում թյուրիցինոգենային գործոնի (Thu'-հատկանշի) էլիմինացիա 1-2% հաճախականությամբ: Ցույց է տրվել Thu' և Thu- շտամների խառը աճեցման պայմաններում Thu' գործոնի փոխանցման հնարավորությունը:

Bacteriocinogenic activity of 100 strains of *Bacillus thuringiensis* belonging to different serotypes was studied. 42 strains displayed ability for proproducing bacteriocines-thuricines, including 17 strains *subsp. galleriae* (serotype 5a:5b) and 9 strains *subsp. berliner* (serotype 1). The cultivation conditions for maximum production of thuricines were defined, the optimum medium is meat-peptone agar. 4 types of *B. thuringiensis* thuricines were identified. Some strains synthesize simultaneously 2 types of thuricines. The elimination of the thuricinogenic factor (Thu' - sign) with 1-2 per cent frequency at ethidium-bromide or sodium dodecylsulfate treatment takes place. The possibility of transmission of the thuricinogenic factor at joint cultivation of Thu' and Thu- strains was shown.

Тюрицины-бактерицины - Bacillus thuringiensis - трансмиссивность - элиминация

Первые сведения об антагонистических взаимоотношениях в группе *Bacillus thuringiensis* содержатся в работе Красильникова [7] и Африкяна [1]. Впервые метаболиты, подавляющие рост бактерий внутри вида *B. thuringiensis*, были идентифицированы как бактерицины Кригом [14]. Согласно общепринятой номенклатуре, бактерицины, продуцируемые штаммами *B. thuringiensis*, получили название “тюрицины”. В дальнейшем продукцию тюрицинов у различных штаммов этого микроорганизма описали Гоце [11], Иванов с соавт. [4], Де Баржак с соавт. [10], Нетыкса с соавт. [8] и Карабеков с соавт. [9].

Однако до настоящего времени в литературе нет полных сведений о типах тюрисинов, продуцируемых этими бактериями, различиях между представителями разных серотипов, их основных свойствах, устойчивости Thu⁺ признака и возможной его трансмиссивности.

Нами предпринята попытка исследовать явление тюрисиногенности на основе изучения большого количества штаммов *B.thuringiensis*, представляющих практически все серотипы этой бактерии. Поскольку данный микроорганизм широко используется в народном хозяйстве, представляется актуальным изучение основных физико-химических свойств продуцируемых тюрисинов, их типов у разных серотипов, возможности излечения от Thu⁺ фактора, передачи этого фактора Thu штаммам, а также частоты возникновения признака тюрисиногенности у разных серотипов. Все эти вопросы не освещены в современной научной литературе и нуждаются в исследовании.

Материал и методика. В работе использованы 100 штаммов *B. thuringiensis* практически всех известных серотипов. Штаммы были выделены в различных регионах бывшего СССР и любезно предоставлены в наше распоряжение Всесоюзным институтом защиты растений (г. Санкт-Петербург).

Тюрисиногенную активность штаммов определяли методом "отерченного антагонизма" по Фредерику [9].

Для выявления индикаторных штаммов (тест-культур) все исследованные штаммы подвергли перекрестной проверке. Типирование тюрисинов проводили с помощью тюрисинрезистентных мутантов. Резистентные к тюрисицинам мутанты выделяли из зоны подавления роста тест-культуры.

Излечение от тюрисиногенности (элиминация Thu⁺ признака) проводили путем обработки штамма этидиум-бромидом (5 мкг/мл) или додецилсульфатом (0,001%).

Питательные среды и методы культивирования штаммов не отличались от общепринятых в микробиологии.

Результаты и обсуждение. Тюрисиногенная активность была выявлена у 42 из 100 исследованных штаммов, причем наибольшее число тюрисиногенных штаммов обнаружено у серотипа I (*subsp. berliner*) - 64,3% и серотипа 5a:5b (*subsp. galleriae*) - 42,5%.

Штаммы вариантов *thuringiensis*, *thompsoni* и *galleriae* продуцируют тюрисины широкого спектра действия. Удивительно, что ни один из 9 исследованных штаммов *subsp. dendrolimus* не продуцировал тюрисины, но в то же время они оказались чувствительными к тюрисицинам, продуцируемым всеми 42 тюрисиногенными штаммами, т.е. были универсальными индикаторами тюрисинов. Свойства универсальных индикаторов оказались присущи также штаммам U-50, 17-2 и P10/14 *subsp. galleriae*. Эти последние и были выбраны в качестве тест-культуры для изучения тюрисинов.

Морфология зоны торможения роста чувствительных культур тюрисицинами разных серотипов представлена в табл. 1, по данным которой тюрисиногенные штаммы, относящиеся к вариантам *thuringiensis* и *thompsoni*, а также 14 штаммов варианта *galleriae* вызывают полную задержку роста индикаторного штамма, образуя прозрачные зоны торможения роста диаметром от 15 до 40 мм. Тюрисины остальных штаммов образуют в основном мутные зоны торможения роста индикаторной культуры с вторичным ростом, реже-прозрачные зоны.

Таблица 1. Морфология зоны торможения роста чувствительных культур тюринцинами разных серотипов

Вариант	Серотип	Морфология зоны торможения роста						
		Характер зоны			Диаметр зоны, мм			
		*	**	***	до 10	15	20	до 40
<i>thuringiensis</i>	1	9	-	-	-	-	3	6
<i>finitimus</i>	2	-	1	-	-	1	-	-
<i>alesti</i>	3a;3c	-	-	2	2	-	-	-
<i>galleriae</i>	5a;5b	14	3	-	3	4	4	6
<i>entomocidus</i>	6	-	-	1	1	-	-	-
<i>tolworthi</i>	9	-	2	-	-	1	1	-
<i>darmstadiensis</i>	10a;10b	-	2	-	-	-	1	-
<i>thompsoni</i>	12	1	-	-	-	-	-	1
не серотипируемые	-	1	1	3	1	3	2	1
Итого:	-	25	9	6	7	9	11	14

Примечание: * - прозрачная зона; ** - прозрачная зона с вторичным ростом; *** - мутная зона.

Результаты исследования физико-химических свойств тюринцинов, представленные в табл. 2, показали, что из 42 исследованных тюринцинов лишь 15 проходили через целлофановую мембрану, тем самым проявляя одно из фундаментальных свойств, присущих бактерицинам. В основном это тюринцины, продуцируемые вариантами *thuringiensis*, *darmstadiensis*. В то же время из 17 штаммов варианта *galleriae* только 3 штамма - 11-67, 3-014, 3-16 - продуцировали тюринцины, проходящие через целлофановую мембрану. Остальные, по-видимому, имеют более высокий молекулярный вес. Неоднородны тюринцины и по чувствительности к тепловой обработке. Так, выдерживание при 60° в течение 30 мин приводило к инактивации тюринцинов у 21 штамма. Остальные тюринцины не утрачивали активности даже при нагревании до 80-100°. Теплоустойчивыми в основном оказались тюринцины вариантов *thuringiensis*, *galleriae*, *caucasicus*. Термочувствительными были тюринцины вариантов *finitimus*, *entomocidus*, *tolworthi*.

Таблица 2. Сравнительные данные о некоторых физико-химических свойствах тюринцинов, продуцируемых штаммами *Bac.thuringiensis*

Вариант	Проходимость через целлофан	Чувствительность к трипсину	Устойчивость к тепловой обработке		
			60°	80°	100°
<i>thuringiensis</i>	9/9	9/9	7/9	7/9	7/9
<i>finitimus</i>	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>alesti</i>	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
<i>galleriae</i>	3/17	17/17	10/17	10/17	10/17
<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>	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2
<i>darmstadiensis</i>	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>caucasicus</i>	0/3	3/3	2/3	2/3	2/3
<i>thompsoni</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
не серотипируется	1/4	4/4	0/4	0/4	0/4
Итого:	15/42	42/42	21/42	21/42	21/42

Примечание: В числителе - количество тюринцинов, обладающих указанным свойством, в знаменателе - количество исследованных тюринцинов.

Все исследованные тюрисины оказались чувствительными к обработке трипсином, что говорит об их белковой природе.

Неоднородны тюрисины и по скорости диффузии в агар.

Известно, что способность бактерий синтезировать бактерицины определяется их генотипом, однако фенотипическое проявление этого признака во многом зависит от внешних условий [5].

Особенно важное значение имеет состав питательной среды. Так, бактерицины *Corynebacterium glutamicum*, так называемые глутамины, не синтезируются на агаризованных средах, приготовленных на основе перевара Хоттингера, но хорошо проявляются на мясо-пептонном агаре (МПА).

Для определения оптимальных условий синтеза тюрисинов нами было исследовано 12 видов питательных сред и установлено, что тюрисины хорошо синтезируются на 1,2% МПА, несколько хуже - на среде с рыбным гидролизатом (1,2%). Добавка к МПА 0,5%-ной глюкозы резко тормозит синтез тюрисинов. Таким же свойством обладает NaCl.

Для типирования тюрисинов, синтезируемых штаммами *B. thuringiensis*, нами были получены резистентные к тюрисицам мутанты универсального индикаторного штамма *subsp. galleriae* P 14/10. Этот штамм, кроме высокой чувствительности ко всем 42 выявленным тюрисицам, обладает резистентностью к высоким концентрациям стрептомицина и синтезирует темно-коричневый пигмент, т.е. имеет фенотип $\text{Thu}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$. Выбор такого маркированного штамма был удобен для последующего анализа полученных мутантов.

На первом этапе типирования исследуемых тюрисинов были получены $\text{Thu}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$ мутанты, выделенные одноступенчатым отбором из вторичного роста зоны торможения роста штамма P14/10, вызванного тюрисином, синтезированным штаммом 260-15 *subsp. galleriae* (мутант 14/26). Указанный мутант оказался резистентным одновременно к тюрисицам еще 6 штаммов, что свидетельствует об идентичности этих тюрисинов и возможности выделения их в отдельную группу, условно обозначенную как тип А. В нее в основном вошли тюрисины, синтезируемые штаммами *subsp. galleriae*.

Мутант 14/26 ($\text{Thu}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$) по сравнению с исходным штаммом P14/10 ($\text{Thu}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$) изменил свою чувствительность к тюрисицам еще 11 штаммов, что выразилось в резком сужении зоны торможения роста. Мы предположили, что эти 11 штаммов продуцируют либо тюрисины 2 типов, один из которых аналогичен тюрисицам типа А, либо продуцируют один сложный тип тюрисица, частично родственной тюрисицам типа А. Чувствительность мутанта 14/26 к тюрисицам других 24 штаммов оставалась прежней.

На втором этапе типирования тюрисинов у мутантного штамма 14/26 был получен новый полирезистентный мутант 14-16/10, который был выделен из вторичного роста зоны торможения монорезистентного мутанта 14/26 тюрисином штамма 3-16 *subsp. galleriae*. Полученный мутант 14-16/10 оказался одновременно резистентным к тюрисицам еще 12 штаммов разных серотипов. Этот тип тюрисинов, родственной тюрисицу штамма 3-16, был

обозначен как тип В. Полученный новый мутант имел фенотип $\text{ThuA}^+ \text{ThuB}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$ и был при этом полностью резистентным к тюрисицинам 5-ти из 11-ти тюрисициногенных штаммов. Монорезистентный мутант $14/16 \text{ ThuA}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$ оказался частично резистентным к этим же тюрисицинам. Это позволяет заключить, что указанные 5 штаммов - 64-7, 11-67, 3-014 (*subsp. galleriae*), штамм Р (*subsp. subtoxicus*) и штамм Р-1 (*subsp. darmstadiensis*) - продуцируют одновременно два типа тюрисицинов А и В. Следовательно, эти штаммы маркируются как имеющие фенотип $\text{ThuA}^+ \text{ThuB}^+$ в отличие от штаммов типа А, имеющих фенотип ThuA^+ , и штаммов, продуцирующих тюрисицины типа В и имеющих фенотип ThuB^+ . Чувствительность мутанта 14-16/10 к остальным, оставшимся нетипированными тюрисицинам либо вовсе не изменилась, либо изменилась в сторону сужения диаметра зоны торможения роста и ее морфологии (зона осталась мутной).

На третьем этапе типирования оставшихся 22-х тюрисициногенных штаммов у мутантного штамма 14-16/10 ($\text{ThuA}^+ \text{ThuB}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^-$) был получен новый полирезистентный мутант 14-16/10-43Р. Последний был выделен из вторичного роста зоны торможения мутанта 14-16/10, вызванного тюрисицином, синтезируемым штаммом 43Р *subsp. thompsoni*. Кроме штамма 43Р, этот мутант был полностью резистентным к тюрисицинам еще 15 штаммов, которые оказались родственными к тюрисицину 43Р. Этот тип тюрисицинов мы обозначили как тип С. Таким образом, новый полирезистентный мутант 14-16/10-43Р был маркирован как имеющий фенотип $\text{ThuB}^+ \text{ThuC}^+ \text{Str}^+ \text{Pig}^+$, а штаммы, синтезирующие тюрисицины типа С, как штаммы, имеющие фенотип ThuC^+ . Оставшиеся пять тюрисициногенных штаммов, к которым мутант 14-16/10-43Р оставался частично чувствительным, мы условно отнесли к типу Д.

Таким образом, в результате этих исследований удалось показать, что штаммы *B. thuringiensis* синтезируют тюрисицины, по крайней мере, 4 типов, которые можно типировать с помощью моно- и полирезистентных мутантов.

В итоге, из 100 исследованных штаммов *B. thuringiensis* - 42 оказались тюрисициногенными, из них 7 штаммов продуцируют тюрисицины типа А, 8 штаммов - типа В, 17 - типа С, 5 - типа Д, а еще 5 штаммов синтезируют одновременно тюрисицины типов А и В (табл.3).

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что штаммы 1 серотипа образуют тюрисицины только типов В и С, 2 серотипа - типа Д, серотипа 3а - типов А и С, 5 - типов А, В и С, 6 - только типа Д, 9 - только типа С, 10 - только типа Д, 11 - только типа С. Тем не менее только на основании этих результатов говорить о какой-либо коррелятивной связи между типом синтезируемого тюрисицина и серотипом штамма не приходится. Найти корреляцию между типом тюрисицина и его физико-химическими свойствами также не удалось.

Мы предположили, что продукция тюрисицинов у *B. thuringiensis*, так же как и у других микроорганизмов, может быть обусловлена присутствием в клетках тюрисициногенных штаммов особых экстрахромосомальных генетических факторов (возможно, плазмид), осуществляющих контроль признака Thu^+ .

Такое предположение не лишено основания, поскольку у *B. thuringiensis* также обнаружены плазмиды [2, 3]. Если это предположение верно, то штамм может утратить Thu^+ признак, в результате чего он перестанет синтезировать тюрцины и, следовательно, утратит иммунитет к действию аналогичных тюрцинов [12].

Таблица 3. Результаты типирования тюрцинов, продуцируемых штаммами *B. thuringiensis*

Типы тюрцинов			
Штаммы и подвиды			
А	260-15	<i>galleriae</i>	43 P <i>thompsoni</i>
	260-12	<i>galleriae</i>	30 P <i>thuringiensis</i>
	254-4	<i>galleriae</i>	52C <i>thuringiensis</i>
	71-3	<i>galleriae</i>	3 <i>thuringiensis</i>
	71-4	<i>galleriae</i>	63 <i>thuringiensis</i>
	42-2	<i>galleriae</i>	62 <i>thuringiensis</i>
	34 P	<i>alesti</i>	180-2 <i>thuringiensis</i>
В	3-16	<i>galleriae</i>	76-1 <i>thuringiensis</i>
	V-2	<i>berliner</i>	54C <i>alesti</i>
	V-3	<i>berliner</i>	234-4 <i>galleriae</i>
	78-1	<i>galleriae</i>	19-2 <i>galleriae</i>
	78-2	<i>galleriae</i>	63-C <i>tolworthi</i>
	U-50	<i>galleriae</i>	40-P <i>tolworthi</i>
	U-77	<i>galleriae</i>	17-2 не серотипируется
	101	<i>galleriae</i>	58-C не серотипируется
А и В	64-7	<i>galleriae</i>	44-1 не серотипируется
	11-67	<i>galleriae</i>	60-C не серотипируется
	3-014	<i>galleriae</i>	811 <i>caucasicus</i>
	37 P	<i>subtoxicus</i>	837 <i>caucasicus</i>
	38 P	<i>darmstadiensis</i>	805 <i>caucasicus</i>
С			53C <i>finitimus</i>
			BTE <i>entomocidus</i>
Д			

Исследования по элиминации тюрциногенных факторов (Thu^+) проводили путем обработки двух штаммов, синтезирующих тюрцины типа А (42-2 *subsp. galleriae*), типа В (3-16 *subsp. galleriae*) и типа С (30P *subsp. thuringiensis*) этидиум-бромидом (ЭБ) или додецилсульфатом натрия (SDS). Эти же штаммы отличались тем, что продуцировали тюрцины, образующие ясные, прозрачные, большого диаметра зоны торможения роста индикаторных культур, проходящие через целлофановую мембрану.

Результаты этих опытов представлены в табл. 4, по данным которой все 36 Thu^- клонов, полученных в результате этих опытов, оказались чувствительными к тюрцинам исходных штаммов, что свидетельствует об утрате иммунитета к действию собственного тюрцина.

Эти результаты косвенно говорят о внехромосомном контроле Thu^- признака у *B. thuringiensis*. Трансмиссивность бактерициногенных факторов установлена давно [2]. Возможность осуществления передачи трансмиссивных генетических факторов у *B. thuringiensis* была показана нами [6]. Поэтому для проверки трансмиссивности Thu^- фактора нами была применена методика, описанная в работе Карабекова с соавт. [6].

В качестве донорного штамма был использован штамм 42-2 варианта *galleriae*, продуцирующий тюрцин типа А и имеющий фенотип $\text{ThuA}^+ \text{Pig}^+ \text{Str}^- \text{ThuA}^+$. В качестве реципиента был использован индикаторный штамм 10-14 *subsp. galleriae*, имеющий фенотип $\text{Thu}^- \text{Pig}^+ \text{Str}^- \text{ThuA}^+$.

Таблица 4. Частота элиминации Thu^+ маркера тюринциогенных штаммов при обработке этидиум-бромидом и додецилсульфатом натрия

N штамма	Элиминирующий фактор	Количество исследованных колоний	Количество утративших Thu^+ признак колоний	Частота элиминации, %
42-2	ЭБ	1100	11	1,0
	SDS	400	7	1,75
3-16	ЭБ	650	7	1,08
	SDS	680	5	0,7
30P	ЭБ	100	2	2,0
	SDS	350	4	1,14
Итого	ЭБ	1850	20	1,08
	SDS	1430	16	1,12
Всего	ЭБ + SDS	3280	36	1,09

Выросшие на чашках Петри $\text{Pig}^+ \text{Str}^+$ колонии тотально проверяли на тюринциогенность.

Из проверенных 2500 колоний лишь в одном случае (0,04%) у одного из клонов был зарегистрирован фенотип $\text{ThuA}^+ \text{Pig}^- \text{Str}^+ \text{ThuA}'$, т.е. клон носил признаки как реципиентного, так и донорного штамма.

Результаты этих опытов, по-видимому, следует рассматривать лишь как предварительные данные о возможном трансмиссивном характере Thu^+ факторов *B. thuringiensis*, что требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э.Г., Чилингарян В.А., Чил-Акопян Л.А., Геворкян С.Г. и др. Биолог. журн. Армении, 2, 8, 1969.
2. Дебабов В.Г., Азизбеков Р.Р. и др. Генетика, 13, 3, 496-501, 1977.
3. Захарян Р.А., Израелян Ю.А. и др. Микробиология, 48, 2, 226-229, 1979.
4. Иванов Г.М., Марченкова Т.В., Лихотникова Н.И. Изв. СО АН СССР, 3, 1973.
5. Карабеков Б.П., Кажоян С.В. и др. Микробиология, 3, 2, 261, 1984.
6. Карабеков Б.П., Чахмахчян А.Г., Оганесян М.Г. Генетика, 18, 4, 1062-1067, 1982.
7. Красильников Н.А., Гукасян А.Б. Микробиология, 32, 4, 1964.
8. Нетыкса Е.М., Смирнова Т.А., Миненкова И.В., Азизбекян Р.Р. Микробиология, 48, 4, 1979.
9. Фредерик П. В сб.: Биологическое воспроизведение макромолекул, Изд. ИЛ. М., 1960.
10. Barjac de H. et J. Lajudie Ann. Microbiol (Inst. Pasteur) 125B, 4, 1974.
11. Coze A. C. R. Soc. Biol., 166, 1, 1972.
12. Fukushima H., Tsuboi Y., Fukushima S., Sagawa H. Arch. Oral. Biol., 25, 767-771, 1980.
13. Glowes R.C. Zbl. Bact., 196, 2/3, 152, 1965.
14. Kreeg A. J. Invert. Pathol., 15, 2, 1970.

Поступила 16.IX.1997