



Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ МУТАНТОВ У ИНСЕКТИЦИДНЫХ ШТАММОВ РАЗНЫХ СЕРОВАРОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

С.В. АВЕТИСЯН¹, А.С. ОВСЕПЯН¹, А.Х. ЧАХАЛЯН¹, С.К. КЕЛЕШЯН¹,
Л.А. ЧИЛ-АКОПЯН¹, М. А. САРКИСЯН², А.С. САГИЯН¹

¹ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА

²Научный центр земледелия и защиты растений НАН РА

У штаммов *Bacillus thuringiensis* разных сероваров, отличающихся спектром инсектицидного действия, методом химического мутагенеза получена коллекция мутантов, синтезирующих водорастворимый меланин. Отобраны мутанты, характеризующиеся высоким уровнем синтеза меланина. Показано повышение инсектицидной активности у меланинсинтезирующих мутантов, что является следствием фотопротекторного свойства пигмента, защищающего споры и кристаллы инсектицидных штаммов от разрушающего действия УФ-облучения и инсоляции.

Bacillus thuringiensis — мутант – меланин – инсектицидная активность

Bacillus thuringiensis-ի միջատասպան ազդեցության տարբեր սպեկտրով սերովարներին պատկանող շտամներից քիմիական մուտագենեզի եղանակով ստացվել է ջրալուծ մելանին սինթեզող մուտանտների հավաքածու: Ընտրվել են բարձր ակտիվությամբ մելանին սինթեզող շտամներ: Ցույց է տրվել, մելանին սինթեզող մուտանտների միջատասպան ակտիվության ավելի բարձր է, ինչը կապված է պիգմենտի ֆոտոպաշտպանիչ, այսինքն ՌԻՄ-ճառագայթման և արևի ճառագայթների քայքայիչ ազդեցությունից միջատասպան շտամների սպորները և բյուրեղները պաշտպանելու հատկության հետ:

Bacillus thuringiensis – մուտանտ – մելանին – միջատասպան ակտիվություն

A collection of water-soluble melanin-synthesizing mutants of *B. thuringiensis* strains that belong to various serovars and have different insecticide action spectra have been obtained by chemical mutagenesis. Mutants that showed high level of melanin synthesis have been selected. The insecticide activity of melanin-synthesizing mutants was shown to be increased as a result of photoprotective property of the pigment protecting spores and crystals of insecticidal strains from destructive action of UV-radiation and insolation.

Bacillus thuringiensis – mutant – melanin – insecticide activity

Многочисленные исследования последних лет, направленные на изучение свойств и структуры меланинов, подтверждают их важное практическое значение в медицине, косметологии и сельском хозяйстве [4,14,17,19]. Однако объектами исследований преимущественно являются

синтетические водорастворимые меланины, поскольку выделение меланина из природных объектов сложно и связано с большими затратами.

К тому же, эти меланины не растворяются в воде, что затрудняет их широкое практическое применение. В связи с этим, разработка эффективного способа получения природного водорастворимого меланина продолжает оставаться актуальной задачей.

Ранее нами методом химического мутагенеза был получен мутант *B.thuringiensis K1(BTGK1)*, синтезирующий темно-коричневый водорастворимый пигмент, который легко выделяется из культуральной жидкости (КЖ) по разработанной в НИИ биотехнологии методике [1]. Результаты изучения физико-химических характеристик – инфракрасных и электронно-парамагнитных резонансных спектров и специфических качественных реакций свидетельствовали о меланиновой природе пигмента [2,12], а изучение биологической активности показало, что бактериальный меланин уже в малых дозах (0,03 – 0,06%) является биостимулятором многих овоще-бахчевых культур, значительно повышает их урожайность и может быть успешно использован в качестве биоудобрения [3,13,20].

Меланинсинтезирующий мутант BTGK1 был получен на основе штамма *B. thuringiensis subsp. galleriae 69-6 (BTG69-6)*, который является промышленным штаммом и используется для производства бактериальных инсектицидов. Совмещение в одном штамме двух полезных свойств – инсектицидного и меланинсинтезирующего позволило нам решить задачу стабилизации препарата на основе штамма BTG69-6, поскольку известно, что споры и кристаллы *B. thuringiensis* высокочувствительны к ультрафиолетовому облучению и солнечным лучам и в полевых условиях быстро теряют инсектицидную активность [15, 23], а меланины, продуцируемые микроорганизмами, являются природными фотопротекторами и защищают клеточные компоненты, в том числе споры и кристаллы, от УФ-повреждений и отрицательного действия солнечных лучей [16, 18, 21, 22]. В результате удлиняется время действия и следовательно биологическая эффективность препаратов на основе инсектицидных штаммов.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось получение и изучение меланинсинтезирующих мутантов у штаммов *B. thuringiensis* других сероваров, отличающихся спектром энтомоцидного действия [6]. Способность таких штаммов к одновременному синтезу двух биологически активных веществ - меланина и инсектицидных токсинов в одном производственном процессе, несомненно, обеспечит высокий уровень эффективности их использования.

Материал и методика. В работе использована коллекция музейных культур НИИ Биотехнологии, включающая 73 штамма *B. thuringiensis* (22 серовара), которые были получены из Биологического института сибирского отделения АН СССР, Бердского химического завода и Всесоюзного института защиты растений, а также штаммы BTG69-6 и BTGK1 для сравнительного изучения меланинсинтезирующей и инсектицидной активности новых мутантов.

Для культивирования штаммов использовали мясопептонный бульон и мясопептонный агар.

КЖ с целью определения вирулентности исследуемых штаммов получали ферментацией в среде следующего состава, %: БВК – 3,0; мука пшеничная – 1,2; отруби пшеничные – 0,3; NaCl – 0,2; CaCl₂ – 0,05. Ферментацию проводили при температуре 30° в течение 48 ч на качалке со скоростью вращения 220 об/мин.

Посевным материалом служили культуры, выращенные на среде: мясная вода – 100 мл; пептон – 10 г; дрожжевой экстракт – 1 г; NaCl – 5 г; агар-агар – 20 г, вода водопроводная – до 1 л.

Для оценки споро-кристаллообразования полученные КЖ изучали микроскопированием в световом фазово-контрастном микроскопе (БИОЛАМ ЛОМО). Подсчет титра спор осуществляли в счетной камере Горяева.

Биологическую (инсектицидную, энтомоцидную) активность исследуемых штаммов по отношению к гусеницам златогузки (*Euproctis chrysorrhoea* L.) и непарного шелкопряда (*Ocneria dispar*) разных возрастов определяли по формуле Аббата [10], а также по значениям ЛК₅₀ на тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*) (ТШ) и златогузке [7,11]. Гусеницы златогузки были собраны в селе Ттуджур области Арагацотн РА. Гусеницы тутового шелкопряда были выращены из грены, полученной из Грузинского сельскохозяйственного института (кафедра шелководства).

Лабораторные испытания для определения инсектицидности штаммов проводили вскармливанием гусениц ТШ тузовыми, а гусениц златогузки дубовыми листьями, обработанными культуральной жидкостью, полученной ферментацией исследуемых штаммов. При полевых испытаниях дубовые деревья высотой 2,5-3,0 м (деляночный опыт) обрабатывали рабочими суспензиями исходных и мутантных штаммов. Плотность златогузки находилась в пределах экономического порога вредоносности вредителя [9]. Обработку проводили ранцевым опрыскивателем марки АО-2. Расход рабочей суспензии на каждое дерево составлял 3-4 л. Для определения эффективности опрыскивания проводили учет вредителей через 3, 7, 10, 12 сут. Учитывали живые гусеницы на 12-ти погонных метрах в разных местах кроны.

Мутагенизацию культур проводили 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (НГ) фирмы Serva по известной методике [8]. Обработку мутагеном в конечной концентрации 1000 мкг/мл проводили при 30° в течение 60 мин в фосфатном буфере (0,66 мМ Na₂HPO₄ + 6,43 мМ KH₂PO₄, pH 6,0).

Для определения меланинсинтезирующей активности проводили ферментацию в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 50-70 мл разработанной нами среды следующего состава, %: пшеничные отруби – 1,5; гидролизат рыбной муки – 4; NaCl – 0,2 и CaCl₂ – 0,05, на качалке со скоростью вращения 220 об/мин, при температуре 37° в течение 72 ч. В качестве посевного материала для ферментации использовали суспензии клеток культур, полученные методом смыва со скошенного мясопептонного агара после выращивания штаммов в течение 48 ч.

Уровень пигментообразования оценивали по интенсивности окрашивания ростовой среды спектральным методом (длина волны 315 нм). В качестве контроля использовали водный раствор (pH 9,0) синтетического меланина (Sigma).

Статистическую обработку полученных данных проводили по Берштейну [5].

Результаты и обсуждение. С целью отбора наиболее перспективных для получения новых высокоактивных меланиногенных и одновременно инсектицидных продуцентов были исследованы 73 штамма *B. thuringiensis* (22 серовара) с разным спектром инсектицидного действия. По признаку наибольшей эффективности спорокристаллообразования были отобраны 17 штаммов разных сероваров *B. thuringiensis* со следующей характеристикой: количество свободных спор – 80-90%; количество кристаллов разных размеров – более 100%; неспорулирующие вегетативные клетки и спорующие клетки с кристаллами–10-20 %. Развитие культур – типичное для *B. thuringiensis*.

Для определения инсектицидной активности отобранных штаммов в лабораторных условиях культуральную жидкость испытывали на гусеницах златогузки разных возрастов. Общая численность вредителей в каждом варианте составляла 30 особей, по 10 в каждой из трех повторностей. Учет количества живых и погибших гусениц проводили на 5-е и 8-е сутки после обработки. Биологическую эффективность определяли по проценту погибших особей. Результаты опытов представлены в табл.1.

Таблица 1. Биологическая эффективность исследованных штаммов *B. thuringiensis*

Серовар	Штамм	Гибель гусениц златогузки по возрастам, % (с поправкой на контроль)					
		I возраст		II возраст		III возраст	
		по дням					
		5	8	5	8	5	8
<i>thuringiensis</i>	98	77	100	90	90	83	83
<i>kurstaki</i>	Z-52	100	100	85	95	92	96
	HD-1	100	100	73	90	84	88
<i>sotto</i>	49-3	77	100	66	66	54	62
	1131	93	100	60	90	56	64
<i>galleriae</i>	69-6	90	93	78	80	64	68
	K ₁	94	94	90	92	77	88
<i>darmstadiensis</i>	805	89	100	30	50	25	46
	844-3	92	100	50	50	35	35
	1075	82	90	24	28	22	22
Не идентифицированы*	Э ₁	86	93	90	95	64	68
	17M	100	100	88	88	63	71
	44P	100	100	78	80	66	72
	Φ	85	90	16	80	36	84
	21a	100	100	80	88	84	95
	8d	76	76	70	78	83	87
	34t	83	86	80	85	73	76

* - серовар не определен

На основании результатов, приведенных в табл.1, для дальнейших исследований были отобраны штаммы *B. thuringiensis* Z-52, HD-1(*kurstaki*) и 21a (не идентифицирован).

Энтомоцидная активность этих штаммов дополнительно была проведена методом Кербера [7] – определением летальной концентрации, вызывающей гибель 50% особей (ЛК₅₀). Испытывались КЖ штаммов без разведения и их четыре последовательные десятикратные разведения. Для сравнения в экспериментах использовали также продуцент меланина BTGK1 и его исходный штамм *B. thuringiensis* 69-6 (табл.2). Эксперименты проводили на гусеницах ТШ третьего возраста и златогузки III-IV возрастов в трех повторностях (30 особей для каждого разведения). Учет погибших гусениц проводили в соответствии с динамикой развития вида насекомого: тутового шелкопряда – через 1, 2 и 3 сут; златогузки – через 3, 6 и 8 сут. По полученным данным была рассчитана ЛК₅₀ (табл.2).

На основании сравнительного анализа приведенных в табл. 2 данных, подтверждающих высокую биологическую активность мутантов *B. thuringiensis* Z-52, HD-1 и 21a против гусениц ТШ и златогузки, эти штаммы были отобраны для получения на их основе пигментообразующих мутантов.

Таблица 2. Инсектицидная активность штаммов против гусениц тутового шелкопряда и златогузки

Штамм <i>B.thurin-giensis</i>	Титр, млрд. спор/мл	Инсектицидная активность. ЛК ₅₀ , спор/мл					
		Гусеницы тутового шелкопряда III возраста			Гусеницы златогузки III-IV возрастов		
		Учет по дням					
		1	2	3	3	6	8
69-6	4,0	6,8 · 10 ⁷	1,4 · 10 ⁷	4,3 · 10 ⁶	3,6 · 10 ⁷	1,8 · 10 ⁷	6,3 · 10 ⁶
K _I	5,6	1,3 · 10 ⁸	2,1 · 10 ⁷	3,9 · 10 ⁶	3,6 · 10 ⁷	1,3 · 10 ⁷	4,5 · 10 ⁶
Z-52	5,1	1,0 · 10 ⁸	2,0 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁶	1,4 · 10 ⁷	5,7 · 10 ⁶	2,6 · 10 ⁶
HD-1	5,5	8,7 · 10 ⁷	2,4 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁶	6,2 · 10 ⁷	1,7 · 10 ⁷	3,0 · 10 ⁶
21a	5,1	5,9 · 10 ⁷	8,7 · 10 ⁶	2,8 · 10 ⁶	2,3 · 10 ⁷	4,0 · 10 ⁶	2,6 · 10 ⁶

Всего было получено 253 НГ-индуцированных пигментообразующих мутанта.

Полученные мутанты были проверены на меланинсинтезирующую активность. Для этого была проведена количественная оценка содержания меланина в КЖ, полученной ферментацией испытуемых штаммов описанным выше способом. Результаты опытов приведены в табл. 3. По результатам проверки были отобраны мутанты штаммов *B. thuringiensis* Z-52 и 21a. Мутанты были обозначены: Z5, Z11, Z27, a8, a16.

Таблица 3. Меланинсинтезирующая активность пигментных мутантов *B. thuringiensis*

Штамм <i>B. thuringiensis</i>	№ мутанта	Меланин, г/л
21a	a 8	$5,7 \pm 0,16$
	a 16	$5,8 \pm 0,14$
Z-52	5	$5,9 \pm 0,22$
	11	$6,0 \pm 0,16$
	27	$5,8 \pm 0,13$
K1	контроль	$6,0 \pm 0,16$

Для определения вирулентности отобранных меланинсинтезирующих мутантов были проведены испытания в полевых условиях. С этой целью из бактериальной биомассы каждого штамма разведением водопроводной водой была получена рабочая суспензия с ориентировочным титром $4,0-5,0 \cdot 10^8$ спор/мл. Испытания проводили на гусеницах златогузки II-III возрастов и на непарном шелкопряде I-III возрастов. Вирулентность оценивали по проценту гибели насекомых. Результаты опытов в полевых условиях приведены в табл. 4.

Как видно из результатов табл. 4, вирулентность меланиногенных мутантов *B. thuringiensis* по отношению к златогузке в сравнении с исходным штаммом не только не уменьшилась, но и заметно возросла. Повышение инсектицидной активности наблюдалось и в случае испытания бактериальных суспензий на гусеницах непарного шелкопряда I - III возрастов. В то же время микроскопический анализ количества спор и формы кристаллов у исходных штаммов и пигментообразующих мутантов не выявил существенных различий.

Таблица 4. Сравнительная вирулентность исходных штаммов *B. thuringiensis* и их меланиногенных мутантов по отношению к гусеницам златогузки

Штамм <i>B. thuringiensis</i>		Титр рабочей суспензии, спор/мл	Гибель вредителя по дням учета, % (с поправкой на контроль)			
			3	7	10	12
<i>galleriae</i> 69-6	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	30,2	48,4	67,3	68,2
	<i>K1</i> pig ⁺	$4,2 \cdot 10^8$	32,1	53,1	74,4	76,0
<i>kurstaki</i> Z-52	исходный	$4,8 \cdot 10^8$	34,7	55,4	70,6	73,1
	<i>Z11</i> pig ⁺	$5,0 \cdot 10^8$	36,4	58,2	78,5	81,0
Не идентифицирован <i>21a</i>	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	32,4	50,2	65,6	70,6
	<i>a8</i> pig ⁺	$4,6 \cdot 10^8$	34,3	51,7	67,7	72,1

Культуры всех мутантов содержали характерные для исходных штаммов коротковатые палочки в цепочках из двух-трех клеток, содержащих 90-95% оформленных спор и крупные кристаллы неопределенной формы.

Таким образом, хотя синтез меланина исследованными штаммами *B. thuringiensis* не влияет на характер и уровень споро- и кристаллообразования, вирулентность их заметно повышается. Эти результаты коррелируют с имеющимися в литературе данными: пигмент защищает споры и кристаллы от разрушительного воздействия солнечных лучей, тем самым удлиняя время проявления их инсектицидной активности [16, 18, 21, 22].

Очевидным преимуществом полученных нами высокоактивных меланинсинтезирующих инсектицидных штаммов является также то, что на их основе может быть организовано рентабельное безотходное производство. Биомасса, полученная в результате ферментации этих штаммов, может быть основой экологически чистого инсектицидного препарата для борьбы с разными вредителями сельского хозяйства, а культуральная жидкость – источником для выделения биологически активного бактериального меланина. Использование описанных и подобных штаммов может способствовать решению целого ряда важных для сельского хозяйства задач, таких как замена химических средств борьбы с вредителями сельского хозяйства экологически чистыми биопрепаратами с широким спектром действия, повышение биологической эффективности инсектицидных препаратов, разработка нового биостимулятора растений на основе меланина и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Հովսեփյան Ա., Աղաջանյան Ա., Կարաբեկով Բ., Սաղիյան Ա., Չախալյան Ա., Քելեշյան Ա., Չիլ-Հակոբյան Լ., Հովհաննիսյան Գ., Միրալեյան Ն., Ավետիսյան Ս. ՀՀ Արտոնագիր N 1385 A2, 2003.
2. Агаджанян А.Е. Биотехнология, 2, с.63-67, 2005.
3. Азарян К.Г., Петросян М.П., Агаджанян Дж.А., Попов Ю.Г. Известия ГАУА, 5, с. 5-8, 2005.

4. *Барабой В.А.* Успехи современной биологии 121, с. 36-46, 2001.
5. *Бернштейн А.* Справочник статистических решений. М., Статистика, с.162, 1968.
6. *Бурцева Л.И., Штерншис М.В., Калмыкова Г.В.* Патология насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. В.В. Глупова: М., с.124, 2001.
7. *Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А.* Методические указания. Л., с. 21, 1984.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. Под ред. С.И. Алиханяна, "Мир", М., 1976.
9. *Рогачева А.Я.* Экономические пороги вредоносности главнейших вредных видов насекомых и клещей. М.: Агропромиздат, с. 22. 1986.
10. *Трубникова И.В.* Применение бактериальных препаратов против вредителей сельскохозяйственных культур (рекомендации). М., Агропромиздат, с.6, 1989.
11. *Чил-Акопян Л.А., Хлистовский Е.Д., Адамян М.О., Киносян М.А.* Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, с. 57-61, 1996.
12. *Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian R.A., Vardanyan A.A. Saghiyan A.S.* Pigment Cell Research, 18, 2. p 130-135, 2005.
13. *Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Popov Yu.G., Martirosyan G.S.* Bulletin of Armenian Agricultural Academy, 4, 7-10, 2004.
14. *Berliner D.L., Erwin R.L., McGee D.R.* US Patent 5, 817, 631, 1998.
15. *Blanco, M.G.M.; Wong, L.J.G.; Padilla, C.R.; Martinez, H.Q.* J. Am. Mosq. Control Assoc., 18, p. 352-358, 2002.
16. *Chen Y., Deng Y., Wang J., Cai J. and Ren G.* J.Gen.Appl.Microbiol., 50, p.183-188, 2004.
17. *Colin C, N'Guyen QL.* US Patent 5,925,363,1999.
18. *Gislayne T. Vilas-Bôas; Laurival A. Vilas-Bôas; Veridiana T. Braz; Halha O. Saridakis; Clelton A. Santos; Olívia M. N. Arantes, Braz.* J. Microbiol. 36, 3, p. 271-274, 2005.
19. *Kamei H., Koide T., Hashimoto Y., Kojima T., Umeda T, Hasegawa.* Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 12, 6, p.405-409, 1997.
20. *Popov Yu.G. Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Aghadjanyan J.A., Shcherbakova K.N.* Revue de Citology et de biologie vegetable – Le Botaniste, 28 (s.i.), p. 252-259, 2005.
21. *Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P.* Systematic and Applied Microbiology, 27, 3, p. 286-289, 2004.
22. *Saxena D., Ben-Dov E., Manasherob R., Barak Z, Boussiba S.and Zaritsky A.* Current Microbiology, 44, p 25-30, 2002.
23. *Toma, L.; Severini, F.; Bella, A.; Romi, R.* J. Am. Mosq. Control Assoc., 19, p. 424-429, 2003.

Поступила 03.05.2009.