

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ДИССОЦИАНТОВ *MICROCOCCUS LUTEUS* К ДЕЙСТВИЮ δ -ЭНДОТОКСИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

© 1996 г. Т.Г.Юдина, Е.С.Милько, Н.С.Егоров

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова Поступила в редакцию 09.03.95 г.

δ -Эндотоксины *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* оказывают антибиотическое действие на три из четырех проверенных видов микрококков с активностью 10-23 ед/мг, сравнимой с активностью бацитрацина. R-диссоцианты *Micrococcus luteus* более чем в 2 раза устойчивее к действию 5-эндотоксинов, чем клетки S- и M-типов. Усиление роста тест-микроорганизмов при концентрациях антибиотиков, еще подавляющих рост S- и M-диссоциантов, но уже не оказывающих антибиотического действия на R-варианты, обусловлено развитием последних.

5-Эндотоксины параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* оказывают инсектицидное действие на ряд насекомых, подавляют рост опухолевых клеток млекопитающих и проявляют антибиотическую активность по отношению к некоторым микроорганизмам [1, 2]. Показана прямая корреляция между инсектицидным и антибактериальным действием растворов кристаллов *B. thuringiensis* и предложено объяснение причин такой корреляции [2, 3].

Ранее нами исследована антимикробная активность растворов параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* spp. *thuringiensis*, *kurstaki*, токсичных к представителям отряда чешуекрылых насекомых (*Lepidoptera*) или к чешуекрылым и двукрылым (отр. *Diptera*). Бактерии, образующие такие кристаллы, относятся к патотипам A и D соответственно [1, 4]. В 1983 г. выделена бактерия *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis*, отнесенная к патотипу C - патогенам жесткокрылых насекомых (отр. *Coleoptera*). Известно несколько *Coleoptera* - активных штаммов, не действующих на чешуекрылых и двукрылых насекомых [1, 4]. Специфичные к жесткокрылым 8-эндотоксины отличаются от *Lepidoptera*-специфичных белков способностью находиться в кристаллах не только в виде протоксинов, но и в виде активных токсинов с молекулярной массой 55-67 кДа. Они образуются в результате модификации белков протеиназами бактерии-продуцента в период формирования кристаллов [5]. Таким образом, δ -эндотоксины *B. thuringiensis* - это высокомолекулярные полипептиды, проявляющие биологическую активность по отношению к эукариотам и прокариотам.

Важным условием приспособления к окружающей среде у прокариот является генетическое разнообразие внутри их популяций. Геномный полиморфизм присущ любым популяциям прокариот, так как они гетерогенны, состоят из ряда диссоциантов - клеток, отличающихся генетически, морфологически и физиолого-биохимически [6]. В связи с этим предложена базовая модель культуры микроорганизмов как распределенной системы, учитывающая гетерогенность популяции, различия в состоянии клеток и окружающей их среды [7]. Имеется множество примеров разной чувствительности диссоциантов к воздействию факторов окружающей среды, что расширяет границы адаптационной способности вида в различных экосистемах [6, 8]. Среди таких факторов важную роль играют антибиотики, чувствительность к которым у диссоциантов способна различаться в несколько раз [9].

Целью данной работы было изучение чувствительности диссоциантов *Micrococcus luteus* к антибактериальному действию 8-эндотоксинов *B. thuringiensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили с параспоральными кристаллами *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*, штамм 276. Бактерии получены в НПО "Биомаш". В качестве тест-

микроорганизмов использовали *Micrococcus lysodeikticus*, *M. luteus*, *M. aurantiacus*, *M. varians* из коллекции кафедры микробиологии МГУ. *B. thuringiensis* выращивали на агаризованной среде, как описано ранее [2]. Споро-кристаллическую смесь трижды промывали водой, осаждая кристаллы центрифугированием, затем раствором 1 М NaCl, водой, смесью ацетона с водой (1 : 1) и снова трижды дистиллированной водой. Кристаллы растворяли в 0.02 N NaOH в течение 2 ч при 20°C и постоянном перемешивании. Полученную смесь центрифугировали при 4°C. 8-Эндотоксины осаждали из супернатанта уксусной кислотой при pH 6.0 и растворяли в 0.015 М фосфатном буферном растворе (pH 7.8). Антибиотическую активность растворов кристаллов оценивали по их действию на микрококки методом диффузии в агар. В лунки вносили по 20 мкл растворов с концентрацией 8-эндотоксинов 20-200 мкг/мл, которую определяли спектрофотометрически при 280 нм [2]. Антибиотическую активность определяли после диффузии растворов в агар и роста микрококков при 30°C в течение 24 ч по диаметру зон подавления роста, используя в качестве контроля бацитрацин с активностью 33 ед/мг.

Клетки микрококков в 0.015 М фосфатном буферном растворе (pH 7.8) после действия на них 5-эндотоксинов готовили для просвечивающей электронной микроскопии, подвергая фиксации 2.5%-ным раствором глутаральдегида, постфиксации OsC>4. Затем клетки обезвоживали в водном этаноле разных концентраций, ацетоне, пропитывали смолами. Образцы резали на ультрамикротоме LKB (Швеция), помещали на формваровые сеточки, контрастировали нитратом свинца по Рейнольдсу [10] и просматривали в трансмиссионном микроскопе JEOL 2M (Япония). Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди различных видов микрококков наиболее чувствительны к антибактериальному действию растворов кристаллов *M. lysodeikticus*. Практически совсем не проявляют чувствительности к 5-эндотоксинам *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* в использованных концентрациях (20-200 мкг/мл) клетки *M. varians* (табл. 1).

Таблица 1. Чувствительность различных видов микрококков к антибактериальному действию растворов параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*

Тест-микроорганизм	Антибактериальная активность белка кристаллов, ед/мг
<i>M. lysodeikticus</i>	21.0 +2.7
<i>M. luteus</i>	13.7 +1.5
<i>M. aurantiacus</i>	11.5+ 1.5
<i>M. varians</i>	Нет

Примечание. В таблице приведены средние значения активности, полученные для концентраций раствора кристаллов 20-200 мкг/мл, внесенных в лунку по 20 мкл.

Следовательно, метод диффузии в агар, успешно применяемый для количественного учета активности антибиотиков [II], а также для оценки токсичности различных низкомолекулярных веществ по отношению к бактериям и грибам [12], пригоден и для определения антимикробного действия высокомолекулярных соединений, какими являются 8-эндотоксины *B. thuringiensis*, молекулярная масса которых, как указывалось, составляет нескол! десятков килодальтон [1, 3, 4].

Проявление антибактериальной активно. соединений любой молекулярной массы, диффундировавших в агар, сходно. Например, 8-эндотоксины и бацитрацин, молекулярная масса которых различается примерно в 40 раз, приводят к образованию практически одинаковых зон подавления или стимулирования роста *M. luteus* (рис.1).

Стимулирование роста тест-микроорганизма наиболее заметно на газоне с *M. luteus*, чуть слабее - на газоне с *M. aurantiacus*, а на газоне с *M. lysodeikticus* его практически не было. Важно отметить, что зоны стимулирования роста микроорганизмов могут находиться непосредственно около лунок, куда внесен раствор антибактериального соединения в определенной концентрации (рис. 1, лунки 6, 7). Это наблюдается при концентрации раствора антибиотиков, немного меньшей,

чем концентрация, оказывающая бактерицидное или бактериостатическое действие. Причины формирования зон усиления роста микроорганизмов на агаре под влиянием антибиотиков не ясны. Мы предположили, что основная причина этого явления - в различной чувствительности диссоциантов, составляющих популяцию тест-микроорганизмов, к действию антибиотиков.

В табл. 2 представлено количество клеток *M. luteus*, образующих колонии отличающейся морфологии.

Таблица 2. Количество диссоциантов в популяции *M. luteus* и их чувствительность к антибактериальному действию 8-эндотоксинов *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*

Диссоцианты <i>M.luteus</i>	Характеристика колоний	Доля от общего числа клеток популяции, %	Концентрация раствора δ -эндотоксинов, при которой четко проявляется их антибактериальное действие, (мкг/мл)
R-	Плотные, интенсивно-желтые, матовые, с волнистым краем, изогнутым профилем	11.0+1.2	46.0
S-	Блестящие, желтые, мягкие, выпуклые, с гладким краем	82.0 +2.0	23.0
M-	Полупрозрачные, желтые, слизистые	3.0 +0.7	16.0

Около 11% популяции составили R-диссоцианты. Колонии, образованные такими клетками через 4 сут роста при 30°C на агаризованном бульоне Хоттингера с 1% глюкозы, были интенсивно-желтого цвета, плотной консистенции, со слегка волнистым краем, изогнутым профилем, матовые. Основную часть популяции (около 80%) составили клетки, образующие колонии S-типа: выпуклые, более светло-желтые, чем R-колонии, с гладким краем, блестящие, мягкой консистенции. M-диссоцианты (около 3%) образовали полупрозрачные желтые слизистые колонии. 3-5% колоний в исследуемой популяции имели промежуточные признаки. Поэтому мы не отнесли их к какому-либо типу диссоциантов.

Из 10-20 колоний каждого диссоцианта *M. luteus* была приготовлена суспензия клеток одинаковой оптической плотности, использованная для определения антибиотической активности δ -эндотоксинов и бацитрацина (как контроля), методом диффузии в агар. В несколько лунок вносили по 20 мкл растворов различных концентраций (от 5 до 100 мкг/мл). Опыт показал, что чувствительность к антибиотическому действию 8-эндотоксинов у R-диссоциантов наименьшая: 20 мкл раствора с концентрацией 46.0 мкг/мл оказывали выраженное антибактериальное действие на рост газона *M. luteus*, засеянного клетками из R-колоний. На газонах с S-диссоциантами подавление роста наблюдали и при внесении в лунки раствора кристаллов подвида *tenebrionis* с концентрацией 23.0 мкг/мл, т.е. чувствительность S-диссоциантов к антибактериальному действию 8-эндотоксинов примерно вдвое выше, чем у R-клеток. Еще большая чувствительность наблюдалась у M-диссоциантов: раствор кристаллов в концентрации 16.0 мкг/мл подавлял рост тест-микроорганизма вокруг лунок.

Таким образом, R-диссоцианты *M. luteus* более устойчивы к антибактериальному действию S-эндотоксинов, чем S- и M-варианты, в 2 и 3 раза соответственно. Причины этого заключаются, повидимому, главным образом в различной толщине клеточных стенок диссоциантов [6].

Просвечивающая электронная микроскопия показала, что в популяции *M. luteus* прежде всего подвергаются действию 5-эндотоксинов M-диссоцианты. Через 15 мин инкубации клеток в фосфатном буферном растворе с 50 мкг/мл S-эндотоксинов часть клеток популяции (M-варианты) уже представляла собой остатки мембран (рис. 2а). У большинства S-диссоциантов клеточная стенка нарушена, происходит их агрегация, раздувание (рис. 2б), что приводит к лизису S-вариантов подобно M-клеткам. R-варианты пока не подвержены действию 5-эндотоксинов, их клетки не нарушены (рис. 2в). Если концентрация 8-эндотоксинов в инкубационной смеси меньше, чем

подавляющая рост R-диссоциантов, последние смогут усиленно расти на питательной среде после лизиса S- и M-диссоциантов, используя, видимо, и компоненты лизировавшихся клеток как источники питания. Таким образом, на соответствующем участке агара, где подавлен рост S- и M-диссоциантов, условия для ускоренного роста популяции R-диссоциантов, к тому же характеризующейся наибольшей скоростью и плотностью роста среди всех вариантов [6, 13], будут оптимальными. Поэтому образуются зоны усиленного роста тест-микроорганизма, состоящие в основном из R-диссоциантов.

Следует отметить, что на газонах, полученных из одного типа диссоциантов, не было заметно зон усиления роста в случае R-варианта, а в случае S- и особенно M-варианта такое усиление роста было выражено менее значительно, чем в исходной популяции *M. luteus*. Тот факт, что усиление роста все-таки наблюдалось, говорит о способности S-диссоциантов к выщеплению R-вариантов, а также о том, что действие 8-эндотоксинов в определенных концентрациях может изменять морфологию микрококков. Подобное явление наблюдали, например, при действии антибиотика джозамицина на стрептококки. Авторы предположили, что это явление может быть вызвано утолщением клеточных стенок [14].

На газоне с *M. lysodeikticus* зон усиления роста после зон бактерицидного или бактериостатического действия S-эндотоксинов практически не было. По-видимому, популяция этого вида микрококков достаточно однородна по чувствительности к 8-эндотоксинам. Возможно также, что морфологические отличия диссоциантов *M. lysodeikticus* при росте на агаризованном бульоне Хоттингера проявляются незначительно. Кроме того, известны соединения, например твин-80, нарушающие синтез клеточных стенок и нивелирующие морфологические различия диссоциантов [15]. Однако мало вероятно, что бацитрацин и раствор параспоральных кристаллов оказывают подобный эффект, причем только на один из исследованных видов микрококков.

Итак, проведенные исследования показали, что R-диссоцианты *M. luteus* обладают примерно в 2-3 раза меньшей чувствительностью к действию S-эндотоксинов подвида *tenebrionis*, чем S- и M-диссоцианты. Следовательно, верно наше предположение о том, что зона усиления роста бактерий на агаризованной среде по сравнению с плотностью всего газона обусловлена более интенсивным развитием R-диссоциантов популяции.

Мы сделали рассев клеток из участков начала и конца зоны усиления роста на газоне с исходной популяцией вокруг лунок с бацитрацином и 8-эндотоксинами, а также в зоне усиления роста непосредственно рядом с лункой, куда было внесено 20 мкл раствора 8-эндотоксинов в концентрации 33 мкг/мл (табл. 3).

Таблица 3. Количество R-диссоциантов в зонах усиления роста *M. luteus*

Растворы, их концентрация	Величина зоны подавления роста, мм от края лунки	Величина зоны усиления роста, мм от края лунки или от края зоны подавления роста	% R-диссоциантов в начале зоны усиления роста рядом с лункой или с зоной подавления роста (а) и в конце такой зоны (б)
Раствор δ-эндотоксинов, 70 мкг/мл	6.0 ± 1.5	4.0 ± 1.3	а) 98.0 ± 1.6
			б) 85.0 ± 3.5
Раствор δ-эндотоксинов, 33 мкг/мл	-	6.0 ± 1.5	а) 93.0 ± 3.8
			б) 71.0 ± 6.0
Раствор бацитрацина, 30 мкг/мл	8.0 ± 1.8	63.0 ± 2.0	а) 95.5 ± 1.8
			б) 68.7 ± 7.0

R-диссоцианты составили 93-98% популяции. Примерно столько же клеток было и в других местах усиления роста. В конце ч-^д ких зон R-варианты высевались в 70-85% случаев.

Это дает также основание считать доказанным, что зона усиления роста бактерий, следующая после зоны бактерицидного или бактериостатического действия на бактерий различных антибиотических соединений, обусловлена преимущественным ростом R-диссоциантов популяции при таких концентрациях антибиотиков, которые уже не оказывают влияния на R-варианты, но еще подавляют рост S- и M-диссоциантов.

Данные табл. 3 дают возможность сравнить интенсивность антибактериального действия 5-эндотоксинов и бацитрацина. В пересчете на ед/мг активности бацитрацина по отношению к *M. luteus* активность 8-эндотоксинов примерно в 2-3 раза меньше и равна 13-14 ед/мг. Важно помнить, что антибактериальная активность различных 5-эндотоксинов, составляющих параспоральные кристаллы даже одного подвида энтомопатогенных бактерий, или разных форм одного 5-эндотоксина, возникающих в результате протеолитической модификации последнего [1, 5], может отличаться по величине.

Таким образом, полипептиды параспоральных включений *B. thuringiensis* обладают антибиотической активностью по отношению к *M. luteus*, в 2-3 раза меньшей, чем активность полипептидного антибиотика бацитрацина, хотя молекулярная масса этих соединений отличается в несколько десятков раз. R-диссоцианты *M. luteus* более чем в 2 раза устойчивее к действию 8-эндотоксинов, чем клетки S- и M-типов. Доказано, что усиление роста тест-микроорганизмов при концентрациях антибиотиков, еще подавляющих рост S- и M-диссоциантов, но уже не оказывающих антибиотического действия на R-варианты, обусловлено интенсивным развитием последних.

Работа поддержана грантом "Университеты России", тема 231.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров Н.С., Юдина Т.Г. Биологически активные шмГ^ соединения, определяющие токсичность микроб^ных инсектицидов на основе *Bacillus thuringiensis*. □ Обзор. ВНИИСЭНТИ. 1989. Вып. 6. 50 с.
2. Юдина Т.Г., Егоров Н.С., Лория Ж.К., Выборных С.Н. Биологическая активность параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. № 3. С. 427^36.
3. Егоров Н.С., Юдина Т.Г., Баранов А.Ю. О корреляции между антибиотической и инсектицидной активностью растворов параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Микробиология. 1990. Т. 59. Вып. 3. С. 448-^52.
4. Hofte H., Whiteley H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* II Microbiol. Revs. 1989. V. 53.
№ 2. P.242-255. .
5. Carroll J., Li J., Ellar DJ. Proteolytic processing of a coleopteran-specific 8-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* II Biochem. J. 1989. V. 261. №1. P. 99-105.
6. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во МГУ, 1991. 128 с.
7. Минкевич И.Г. Базовая модель микробной культуры как распределенной системы // Биофизика. 1992. Т. 37. № 2. С. 10-13.
8. Fiedler S., Saltier K. Hydrophobie und mikrobielle Leistung. 2. Bestimmung des Hydrophobigrades oleophiler Mikroorganismen//Zbl. Mikrobiol. 1992. V. 147. № 1-2. P. 5-14.

9. Милько Е.Г., Егоров Н.С., Вуйчик Э. Сравнение чувствительности R-, S- и M-вариантов *Rhodococcus rubropertinctus* к действию антибиотиков // Антибиотики и мед. биотехнология. 1987. Т. 32. № 8. С.576-578.

10. Уикли Э. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. С. 73-228.

11. Егоров Н.С. (ред.). Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд-во МГУ, 1983. С. 106-148.

12. Devillers J., Steiman R., Seigle-Murandi F. The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi // Chemosphere. 1989. V. 19. № 10-11. P. 1693-1700.

13. Могильная О.А., Милько Е.С., Егоров Н.С. Сравнительное электронно-микроскопическое изучение колоний и клеток диссоциантов родококка // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. Вып. 6. С. 877-883.

14. Takemaru I., Kusuda R. Effect of josamycin on form and number of cells forming one chain *Streptococcus* sp. // Nippon Suisan Gakkaishi. Bull. Jap. Soc. Fish. 1990. V. 56. №7. P. 1155.

15. Masaki S., Sugimori G., Okamoto A. et al. Effect' of Tween-80 on the growth of *Mycobacterium avium* Complex // Microbiol. and Immunol. 1990. V. 34. № 8. P.653-663.

Рецензент Е.Л. Головлев

Sensitivity of *Micrococcus luteus* Dissociation Variants to S-Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*

T. G. Yudina, E. S. Mil'ko, and N. S. Egorov

Moscow State University, Moscow, 119895 Russia

Abstract-Endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* produced an antibiotic effect on three out of the four species of micrococci tested, showing an activity of 10-23 units/mg, comparable with that of bacitracin. The R-variants of *Micrococcus luteus* were more than twice as resistant to the action of S-endotoxins as cells of the S and M types. Enhanced growth of the tested microorganisms at concentrations of antibiotics large enough to inhibiting the growth of the S and M variants, but insufficient to suppress the R-variant, was shown to be determined by the intense development of the latter variant.

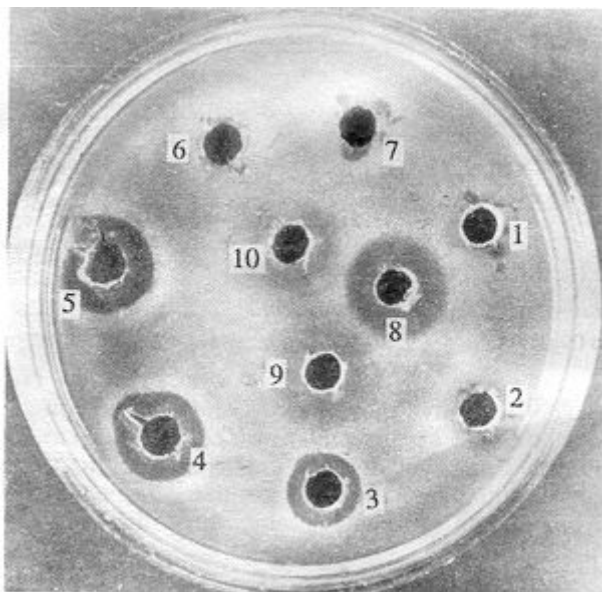


Рис. 1. Проявление действия растворов кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* и бацитрацина на *Micrococcus luteus* при росте на агаре. 1 - контроль (0.015 М фосфатный буферный раствор, используемый для растворения 8-эндотоксинов и бацитрацина); 3-5 - зоны бактерицидного и 2,9,10-зоны бактериостатического действия растворов кристаллов подвида *tenebrionis*; 8 - зона бактерицидного действия бацитрацина; 6 и 7 - зоны усиления роста *M. luteus* под действием растворов 8-эндотоксинов и бацитрацина соответственно. Стимулирование роста видно также за зонами бактерицидного действия антибиотических соединений (лунки 3-5, 8) и слабее - бактериостатического (лунка 2).

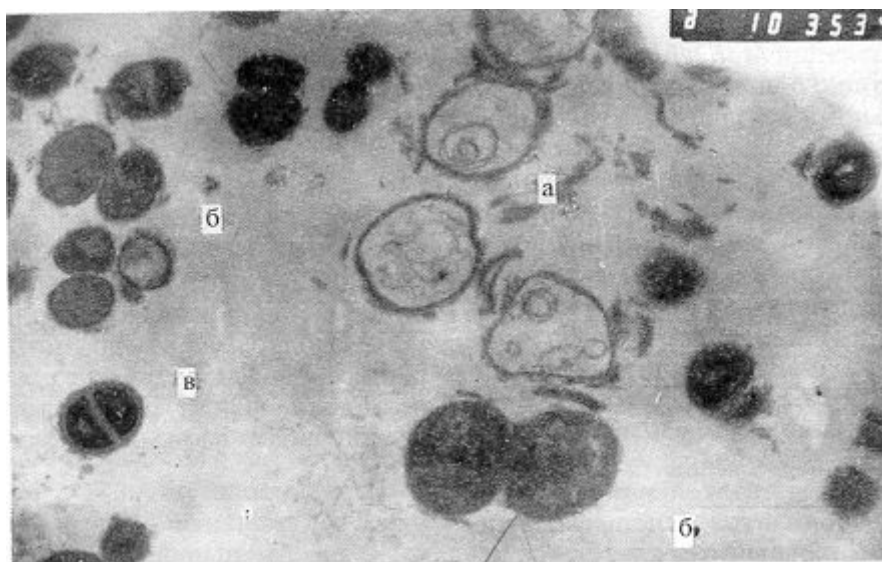


Рис. 2. Вид суспензии клеток *M. luteus* в трансмиссионном электронном микроскопе после действия на них раствора кристаллов *B. thuringiensis* в течение 15 мин: а - разрушенные М-диссоцианты; б - разные стадии процесса разрушения S-диссоциантов; в - вид R-диссоциантов.