

УДК 579.852.11

А.М. Остапчук

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 220 11 95, e-mail: chromas@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО–БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМУ *BACILLUS SP. ONU14* З ЕНТОМОПАТОГЕННОЮ АКТИВНІСТЮ

Мета. Вивчити молекулярно-біологічні характеристики та провести ідентифікацію штаму *Bacillus sp. ONU14* з ентомопатогенною активністю проти шкідника грибів грибною комарика *Bradisia pilistriata* Frey. **Методи.** Ідентифікацію проводили за жирно-кислотним складом методом газо-рідинної хроматографії з використанням автоматизованої системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock та реакції мультиплексної ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) із групо-специфічними праймерами. Для молекулярно-біологічної характеристики застосовували методи фазово-контрастної та електронної мікроскопії, SDS-PAGE, метод градієнтного ультрацентрифугування. **Результати.** Склад жирних кислот та продукти реакції мультиплексної ПЛР з групо-специфічними праймерами дозволяють віднести досліджуваний штам до виду *Bacillus thuringiensis*. Виявлені білкові клітинні включення мають неправильну форму та при розчиненні утворюють протоксини масою близько 66 та 25 кДа. **Висновки.** З використанням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів охарактеризовано ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp. ONU14* з ентомопатогенною активністю. За жирно-кислотним складом та продуктами реакції ПЛР штам ідентифіковано як *Bacillus thuringiensis*.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, жирно-кислотний склад, протоксин, мультиплексна ПЛР.

Представники групи *Bacillus* об'єднані у велику та гетерогенну групу дуже розповсюджених мікроорганізмів з широким спектром особливих фізіолого-біохімічних властивостей. Вони широко використовуються в сучасній біотехнології для синтезу протеолітичних ферментів, біосурфактантів, фітогормонів тощо на ряду з іншими мікроорганізмами. Так, особливою групою із значним біотехнологічним потенціалом, який вирізняє її від інших представників, стоять представники виду *Bacillus thuringiensis*. Не зважаючи на те, що сьогодні цей вид мікроорганізмів широко вивчений та інтенсивно використовується в

© А.М. Остапчук, 2015



сільському господарстві в боротьбі з комахами-шкідниками [1], з'являються нові ізоляти, які розширюють відомі уявлення про фізіолого-біохімічні характеристики цієї групи.

Вид *B. thuringiensis* на ряду з *B. anthracis*, *B. mycooides*, належать до групи *B. cereus*, представники котрої характеризуються високим ступенем генетичної та фенотипової спорідненості. Так аналіз 16S-rRNA показує, що члени групи мають майже ідентичні послідовності. Специфічною експрес-ознакою, за якою можливо диференціювати *B. cereus* від *B. thuringiensis* є здатність останнього до формування параспоральних білкових включень на етапі споруляції, які можуть займати до 30% від маси клітини та проявляють ентомотоксичну активність [2]. Проблема використання такого підходу полягає в тому, що подібні включення виявленні серед представників *Brevibacillus*, *Paenibacillus* та *Clostridium* [3].

Використання комплексу мікробіологічних, біохімічних та молекулярно-генетичних методів дозволяє охарактеризувати та ідентифікувати нові ізоляти, які можуть бути перспективними для біотехнології.

Метою нашої роботи було вивчити молекулярно-біологічні характеристики та провести ідентифікацію штаму *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю проти шкідника грибів грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp.* ONU14, виділений із мертвих комах грибного комарика та зберігається в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова [4].

Культивування проводили на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані при 30 °C впродовж 24 год при 180 об/хв. Для індукції спороутворення та кристалоутворення добову культуру поміщали в розчин 0,86% NaCl та культивували при 30 °C впродовж наступних 24 год при 180 об/хв. Формування спор та кристалів спостерігали в фазово-контрастний мікроскоп Laboval 4 (Karl Zeiss).

Морфологію та розміри клітин визначали методом електронної мікроскопії. Зразки адсорбували на мідних сіточках з формваровою підложкою впродовж 10 хв, промивали водою та контрастували спиртовим розчином ураніл ацетату. Дослідження проводили на електронному мікроскопі JEM-1400 (Jeol, Японія) при 80 кВ.

Для виділення кристалів добову культуру поміщали в колбу з стерильною водою та культивували при 30 °C впродовж 72 год до повного лізису клітин. Ступінь лізису контролювали методом фазового контрасту та забарвленням суспензії розчином сафраніну.

Очистку кристалів проводили згідно Sharpe [5], методом ультрацентрифугування в лінійному градієнті розчину ренографіну на ультрацентрифузі Beckman при 20 000 g впродовж 1 год.

Розчинення очищених кристалів проводили в розчині 50 мМ Na₂CO₃ з рН-10,5 для вивільнення молекул протоксинів, які входять до складу кристалів.



Спектр протоксिनних білкових субодиниць очищених кристалів досліджуваних штамів вивчали методом вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE). Розділення проводили в 14% гелі на електрофоретичній камері Bio-Rad Mini Protean.

Реакцію мультиплексною ПЛР проводили згідно Park [6]. Групоспецифічні праймери, які визначають приналежність досліджуваного штаму до групи бактерій *B. cereus* та специфічно взаємодіють з геном groEL – продукт 400 п.н, та видоспецифічні праймери до *B. thuringiensis*, які взаємодіють з геном gyrB – продукт 299 п.н. Як негативний контроль використовували *B. subtilis* ATCC 7001, позитивний контроль на групоспецифічний праймер – *B. cereus* ATCC 10702 та *B. thuringiensis* IMV 7173 на видоспецифічний праймер.

Ідентифікацію за жирно-кислотним складом проводили методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Колонка капілярна 25м×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв. Досліджувану культуру двічі пасивували на твердому поживному середовищі Лурія-Бертані.

Чисту культуру пересівали на ТВА середовище та вирощували впродовж 24 год при 28 °С. Послідовно проводили: омилення ліпідів клітинної стінки бактерій після додавання метанольного розчину NaOH, метилювання вивільнених солей жирних кислот в присутності кислого розчину метанолу, екстракцію органічним розчинником методом рідинно-рідинної екстракції та нейтралізацію проби з додаванням 0,1 М розчину NaOH. Отримані метилові ефіри аналізували методом газової хроматографії.

Результати та обговорення

Раніше було показано, що досліджуваний штам *Bacillus sp.* ONU14 проявляє ентомоцидну активність проти грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey [4].

При рості на рідкому поживному середовищі для клітин досліджуваного штаму була характерна видовжена форма (рис. 1), клітини розміщені поодинокі або парами. На 3-ю добу культивування спостерігалось утворення ендоспор для яких було характерним розміщення в одному з кінців клітин. За Грамом досліджуваний штам забарвлювався позитивно.

Методом фазово-контрастної мікроскопії була показана здатність штаму до формування контрастних кристалічних включень неправильної та овальної форми (рис. 1).

Подібні білкові включення характерні для представників виду *B. thuringiensis*, та є факторами патогенності поряд з фосфоліпазами, хітиназами, протеазами, β-екзотоксином та речовинами з антифунгіцидною дією, такими як цвітерміцин [7]. Формування таких кристалів у *B. thuringiensis* є унікальним генетично детермінованим феноменом, який індукується стресовими факторами навколишнього середовища та пов'язаний із фізичним виходом води в процесі споруляції. Біологічно, такий ефект направлений на виживання клітин



провокуючи летальну дію направлену на комаху господаря (руйнування клітин епітелію кишківника комах, вивільнення поживних речовин та переходу у вегетативну фазу бактерії та подальшого розмноження).

Параспорульні включення *B. thuringiensis* являють собою олігомери які складаються з поліпептидних протоксिनних субодиниць [2]. Вони можуть включати Сгу токсини, які вимагають специфічного білкового рецептора для зв'язування з епітеліальними клітинами кишково-шлункового тракту комах та Сут токсини, які зв'язуються з фосфоліпідами, і тому не мають такої чіткої специфічності. Останні мають молекулярну масу близько 25 кДа є високоактивним проти комарів та можуть підсилювати дію Сут токсинів [9].

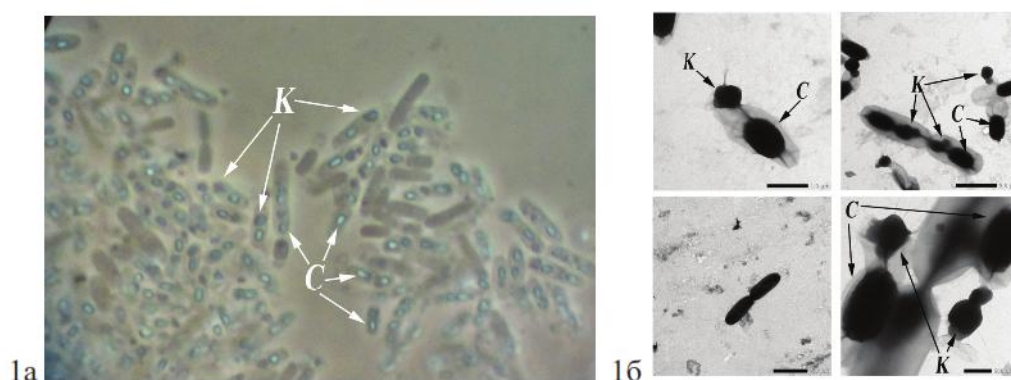


Рис. 1. Бактерії, ендоспори (С), кристали (К) штаму *Bacillus sp.* ONU14 фазово-контрастна мікроскопія (1а), електронна мікроскопія (1б)

Fig. 1. Bacteria cells, spores (C), crystals (K) *Bacillus sp.* ONU14 strain phase-contrast microscopy (1a), electron microscopy (1b)

Методом ультрацентрифугування були отримані очищені кристалічні включення досліджуваного штаму. З використанням SDS-PAGE показано, що після розчинення кристалів утворюються протоксини з молекулярною масою близько 65 кДа (рис. 2). Відомо, що *B. thuringiensis* можуть формувати два типи протоксинів з молекулярною масою 125–135 кДа та 72 кДа, які процесуються в активні токсини з молекулярною масою близько 65 кДа та 68 кДа, відповідно [8]. Також була виявлена інтенсивна білкова полоса з молекулярною масою близько 30 кДа, яка очевидно відповідає Сут токсину (рис. 2).

Для ідентифікації досліджуваного штаму ми використали метод хемотаксономії, що базується на порівнянні профілю загально клітинних жирних кислот.

Для жирно-кислотного складу (рис. 3.) досліджуваного штаму були характерні розгалужені жирні кислоти. Показано, що переважальними в жирно-кислотному профілі були C15:0 iso (32,11%) ізомери C16:1 (11,74%), C13:0 iso (10,76%) в менших кількостях виявлені C14:0 iso (4,10%), C14:0 (4,59%), C15:0 anteiso (4,16%), C16:0 iso (4,68%), C16:0 (4,16%), ізомери C17:1 iso (6,2%), C17:0 iso (5,27%), жирні кислоти C12:0 iso, C12:0, C13:0 anteiso, C17:0 anteiso,

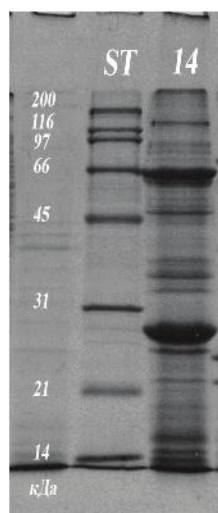


Рис. 2. SDS-PAGE очищених кристалів штаму *Bacillus sp.* ONU14
 Fig. 2. Purified crystals SDS-PAGE of *Bacillus sp.* ONU14 strain

C17:1 anteiso – до 2% від загальної суми площ піків. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA) за спектром жирних кислот досліджуваний штам ідентифіковано як *Bacillus thuringiensis*.

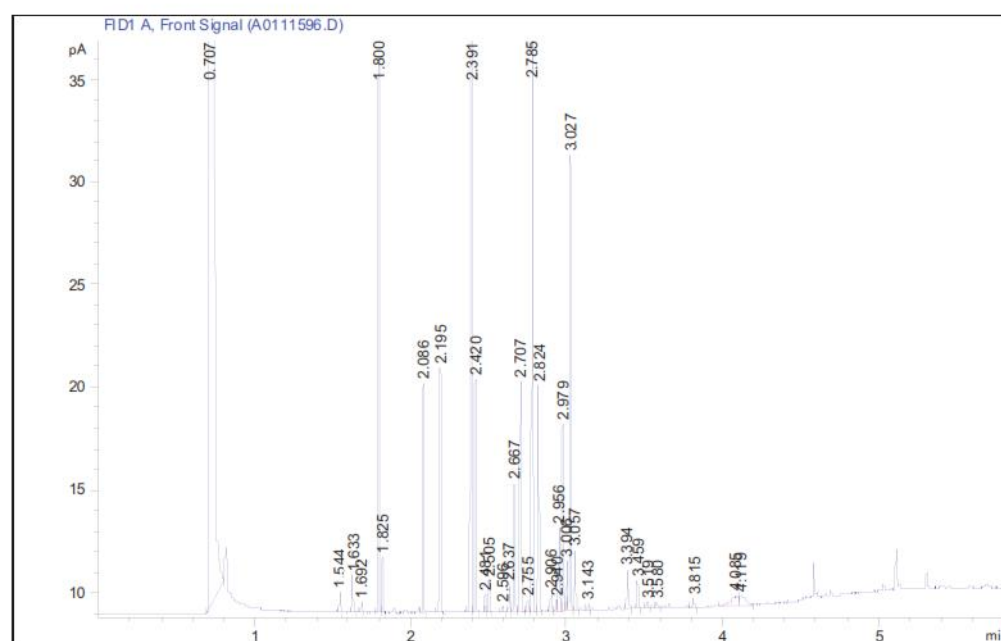


Рис. 3. Спектр жирних кислот штаму *Bacillus thuringiensis* ONU14

Fig. 3. FAMES spectra of *Bacillus thuringiensis* ONU14 strain

Як уже зазначалось, представники групи *B. cereus* є близькими за фенотиповими та генотиповими характеристиками. Методом мультиплексної ПЛР показана здатність до утворення досліджуваним штамом продуктів двох типів – амплікону в 400 п.н. до гену *groEL*, який характерний для всіх представників

групи *B. cereus* та амплікону в 209 п.н. до гену *guyB* діагностичного маркера для виду *B. thuringiensis* (рис. 4).

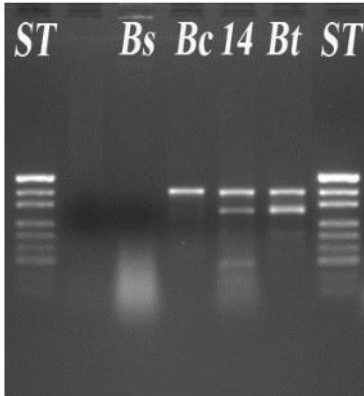


Рис. 4. Мультиплексна ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами

14 – *Bacillus sp.* ONU14, Bs – *B. subtilis* ATCC 7001, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, ST – стандарт

Fig. 4. Multiplex PCR with group- and strainspecific primers

14 – *Bacillus sp.* ONU14, Bs – *B. subtilis* ATCC 7001, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, ST – MW marker

Таким чином, з використанням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів охарактеризовано ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю. Для досліджуваного штаму характерні кристали неправильної та овальної форми, до складу яких входять протоксини з молекулярною масою близько 65 та 25 кДа. За жирно-кислотним складом та продуктами реакції ПЛР досліджуваний штам віднесено до виду *Bacillus thuringiensis*.

Автор висловлює щирю вдячність завідувачу кафедрою мікробіології, вірусології і біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, д.б.н. В.О. Іваниці за надання штамів та проведення критичного рецензування роботи та аспіранту кафедри мікробіології, вірусології і біотехнології Н.В. Коротасєвій за допомогу в організації та проведенні експериментів.

А.Н. Остапчук

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 220 11 95,
e-mail: chromas@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММА *BACILLUS SP.* ONU14 С ЭНТОМОПАТОГОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Реферат

Цель. Изучить молекулярно-биологические характеристики и провести идентификацию штамма *Bacillus sp.* ONU14 с энтомопатогенной активностью против вредителя грибов грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey. **Методы.** Идентификацию проводили по жирно-кислотному составу методом газожидкостной хроматографии с использованием автоматизированной системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock и реакции мультиплексной



ПЦР с группоспецифическими праймерами. Для молекулярно-биологической характеристики использовали методы фазово-контрастной и электронной микроскопии, SDS-PAGE, метод градиентного ультрацентрифугирования. **Результаты.** Состав жирных кислот и продукты реакции мультиплексной ПЦР с группоспецифическими праймерами позволяют отнести исследуемый штамм к виду *Bacillus thuringiensis*. Белковые клеточные включения имеют неправильную форму и при растворении образуют протоксины с массой приблизительно 66 и 25 кДа. **Выводы.** С использованием микробиологических и молекулярно-биологических методов охарактеризован эндоспоро-образующий штам *Bacillus sp. ONU14* с энтомопатогенной активностью. По жирно-кислотному составу и продуктам реакции мультиплексной ПЦР штамм идентифицирован как *Bacillus thuringiensis*.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, жирно-кислотный состав, протоксин, мультиплексная ПЦР.

A.M. Ostapchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny St., Kyiv, MSP 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 220 11 95, e-mail:chromas@ukr.net

MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS SP. ONU14* STRAIN WITH ENTOMOPATHOGENIC ACTIVITY

Summary

Aim. To study molecular-biological characteristics and *Bacillus sp. ONU14* strain with entomopathogenic activity against mushrooms pest *Bradisia pilistriata* Frey. **Methods.** The identification methods were FAMES analysis by GC with MIDI Sherlock identification system and multiplex PCR with group-specific primers. The molecular-biological characteristics were studied with phase-contrast microscopy, electron microscopy, SDS-PAGE and gradient ultracentrifugation. **Results.** Fatty acids composition and multiplex reaction products identify the strain as *Bacillus thuringiensis*. Intracellular crystals have irregular shape and form protoxins with 65 and 25 kDa. **Conclusions.** Endospore-forming *Bacillus sp. ONU14* strain with entomopathogenic activity was characterized by the microbiological and molecular-biological methods. Fatty acids composition and multiplex PCR reaction identified it as *Bacillus thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, fatty acids composition, protoxin, multiplex PCR.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sanahuja G., Banakar R., Twyman M., Capel T., Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications // Plant Biotechnol J. – 2011. – 9. – P. 283–300.
2. Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective // Bioeng Bugs. – 2010. – 1(1). – P. 31–50.



3. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* // *Anticancer Res.* – 2009. – 29(1). – P. 283–300.

4. Кривицька Т.М., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непоміца Н.М., Іваниця В.О. Характеристика штамів бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю до грибних комариків *Bradysia pilistriata* Frey // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2010. – № 3. – С. 86–94.

5. Sharpe, E.S., Nickerson K.W., Bull L.A., Aronson. J.N. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents // *Appl. Microbiol.* – 1975. – 30. – P. 1052–1053.

6. Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // *J Microbiol Biotechnol.* – 2007. – 17(7). – P. 1177–1182.

7. Ed. Lawrence I. Gilbert and Sarjeet S. Gill *Insect Control: Biological and Synthetic Agents.* – Elsevier: London, 2010. – 451 p.

8. Melo A.L., Socol V.T., Socol C.R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review // *Crit Rev Biotechnol.* – 2014. – 29. – P. 1–10.

9. Soberón M.1., López-Díaz J.A., Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms // *Peptides.* – 2013. – 41. – P. 87–93.

Стаття надійшла до редакції 18.03.2015 р.

