



УДК 575:574.2

## Особенности колонизации сред разной плотности у *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae*

В. И. Чемерилова

Иркутский государственный университет, г. Иркутск  
E-mail: [valchem@yandex.ru](mailto:valchem@yandex.ru); [val@botdep.isu.ru](mailto:val@botdep.isu.ru)

**Аннотация.** Исследовали поведение клеток *Bacillus thuringiensis ssp. galleriae* (штаммы дикого типа 1 000 и 2–1) в жидкой, полужидкой (0,4 % агара, w/v) и плотной (1,5 % агара, w/v) средах. Установлено, что популяции исследованных штаммов гетерогенны и содержат два наследственно закрепленных типа клеток, различающихся по способности колонизировать среды разной плотности. Один тип клеток эффективно колонизирует среды с низкой плотностью (0,2–0,4 % агара) благодаря плаванию, но не способен активно передвигаться по плотной среде. Второй тип клеток, наоборот, не способен активно двигаться в полужидкой среде, но эффективно колонизирует как поверхность плотной среды путем роения, так и ее толщу, благодаря формированию длинных (80  $\mu\text{m}$ ) септированных и несептированных нитей. В клоновых культурах обоих вариантов с высокой частотой возникают альтернативные формы.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, колонизация сред, роение, нитевидные клетки.

*Bacillus thuringiensis* (BT) – это вид грамположительных спорообразующих бактерий, отличительной чертой которого является формирование одновременно со спорами белковых кристаллов ( $\delta$ -эндотоксин), токсичных для определенных видов насекомых и безвредных для млекопитающих. Благодаря данному свойству представители вида нашли практическое применение в качестве эффективных биоинсектицидов. Однако к настоящему времени накопились сведения о том, что бактерии данного вида могут быть причиной серьезных оппортунистических инфекций млекопитающих и внутрибольничных инфекций человека [7; 9]. Получены молекулярно-генетические доказательства их близкого родства с таким патогеном, как *Bacillus anthracis* [1], а также сведения о локализации генов  $\delta$ -эндотоксинов на плазмидах у этих бацилл и о возможности их горизонтального переноса в лабораторных и природных условиях [8; 10]. Все это заставляет взглянуть на данный вид микроорганизмов как на потенциально опасный для человека и делает актуальными вопросы, связанные с экологией его представителей. К сожалению, на фоне глубокой изученности свойства энтомопатогенности, имеющиеся к настоящему времени сведения не дают однозначного ответа даже на вопрос о местообитании вида и его роли в биоценозе [2]. Повсеместное распространение и размножение не только в гемоцеле личинок на-

секомых, но и на филлоплане растений, предполагает способность клеток данного вида существовать в различных условиях и активно колонизировать среды разной плотности, хотя конкретные исследования этого вопроса не проводились. В последние годы появилось несколько работ с использованием штамма 407 Cry<sup>+</sup> подвида *thuringiensis* (серотип H1), в которых показано, что активная колонизация поверхности плотных сред у данного штамма обеспечивается, как и у ряда других бактерий, формированием удлинённых (14–16 мкм) гиперфлагеллированных клеток-швермеров и их совместным движением по типу роения [3; 4]. Анализ неспособных к роению мутантов выявил, что для формирования швермеров и роения существенны не только молекулярные компоненты, участвующие в биогенезе и функционировании жгутиков, хемотаксисе и активном росте, но и белки других многочисленных клеточных функций [6], предполагая сложность генетического контроля поведения бацилл.

Цель настоящего исследования – изучить поведение клеток *B. thuringiensis* подвида *galleriae* в средах с разной плотностью.

### Материалы и методы

В исследовании использовали типовой штамм B-1000 и природный изолят 2–1 *B. thuringiensis ssp. galleriae* (серотип H5a5b). Штам-

мы получены из коллекции Восточно-Сибирского музея микробиологии Иркутского государственного университета.

Культивирование бактерий и исследование их поведения проводили при 26 °С на среде Луриа-Бертани (LB) без добавления агара или с различным его содержанием (bacto agar "Тур USA", FERAK Berlin).

Десятисуточную культуру из отдельных колоний, сформированных клетками штамма на плотной (1,5 % агара, w/v) среде, вносили в небольшой объем жидкой среды и культивировали в условиях пассивной аэрации в течение 6 ч. Посевной материал отбирали по диаметру колонии (в отдельных экспериментах – по центру и с периферии), параллельно его микроскопируя.

Далее шестичасовую культуру переносили на среду с определенным содержанием агара, осторожно касаясь ее поверхности смоченной в суспензии иглой по центру чашки. Одной и той же суспензией засеивали по 5 чашек. Среду разливали строго по 20 мл в чашки Петри (внутренний диаметр дна 9,5 см) за час до посева. Поверхность среды, содержащей 1,5 % агара, подсушивали в течение 15 мин при 80 °С. Высеваемую суспензию и зону колонизации микроскопировали (CX-41 Olympus со встроенной цифровой видеокамерой PCTV SANYO или ZEISS Primo Star в фазовом контрасте с увеличением  $\times 10$ ,  $\times 40$ ) через 6, 18 и более часов культивирования. В качестве показателя эффективности колонизации использовали диаметр видимой зоны распространения бактерий по среде, который измеряли обычной линейкой, фотодокументировали с помощью цифровой камеры COOLPIX P1 или сканера Epson Perfection 1270. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

### *Результаты и обсуждение*

При первичном клонировании штаммов было отмечено, что клетки формировали на плотной среде LB колонии с разной формой края. Одни колонии были компактными с четко ограниченным краем, другие имели в разной степени расползающийся ризоидный край, причем последние, как правило, занимали большую площадь среды. Так, диаметр колоний с ограниченным краем штамма 1 000 *ssp. gallerae* составил  $5,9 \pm 0,45$  мм через 4 суток культивирования на плотной среде (1,5 % агара), а колоний с ризоидным краем –  $14,6 \pm 1,63$  мм. При субклонировании все клетки колоний с ог-

раниченным краем формировали только колонии с гладким краем, а клетки колоний с ризоидным краем – только с таким же краем. Следовательно, форма края колонии наследуется, а популяции исследуемых штаммов гетерогенны и содержат клетки с разным генотипом, контролирующим данный признак. Полагая, что размер занимаемой колонией площади может отражать стратегию колонизации плотной среды, мы исследовали поведение клеток из 32 колоний разных типов штамма 1000 и 5 колоний штамма 2–1 в жидкой, полужидкой и плотной средах.

*Жидкая среда.* Через шесть часов после внесения в жидкую среду посевного материала, который состоял в основном из спор, все культуры содержали только вегетативные клетки. Однако между культурами, полученными из колоний с ограниченным краем и расползающимся краем, у обоих штаммов наблюдали четкое различие по составу сформированных клеток и их поведению. В 6 часовых культурах из колоний с четко ограниченным краем наблюдали обычно описываемые палочковидные одиночные или парные клетки, размер которых варьировал от 2,5 до 5 мкм. Редко встречались короткие цепочки из 3–5 клеток. Через 2–72 ч культивирования в жидкой среде в популяции этих культур появлялись единичные длинные цепочки клеток, изогнутые по местам перегородок, и необычно длинные нитевидные клетки (более 80 мкм) без видимых перегородок, но обычные клетки продолжали составлять большинство. В противоположность этому, в 6-часовых культурах, сформированных из колоний с расползающимся краем, основную часть популяции составляли длинные септированные и несептированные нитевидные клетки; клетки обычной длины встречались реже или вообще отсутствовали. Через 24–72 ч культивирования в жидкой среде картина в основном сохранялась, но число обычных коротких клеток могло увеличиваться. Формирование нитевидных клеток в этих культурах не зависело от места отбора посевного материала (центр или периферия колонии) и, следовательно, не было связано с местом положения клеток в колонии в момент споруляции. По подвижности и способности формировать конгломераты клеток культуры колонии с ограниченным и с расползающимся краем не различались. Как обычные, так и нитевидные клетки в описанных типах культур могли быть подвижными или слабоподвижными, наибольшей подвижностью отличались мелкие (2,5 мкм) одиночные клетки.

Среди подвижных как нитевидных, так и одиночных клеток можно отметить различия по поведению. Клетки одних культур стремились объединиться в пучки (короткие) или перевитые тяжи (нитевидные), а клетки других колоний не обладали таким свойством и располагались раздельно.

*Колонизация среды с низкой плотностью.* Для сравнительного исследования поведения клеток разных культур в средах с низкой плотностью была выбрана среда LB с содержанием 0,4 % агара. В данной среде в отличие от среды с 0,5 % агара клетки ВТ были способны плавать, а варьирование диаметра зоны распространения клеток по этой среде было меньшим по сравнению со средой, содержащей 0,3 % агара. Результаты экспериментов показали, что способность клеток эффективно колонизировать полужидкую среду полностью определяется составом и состоянием исследованных культур, сформировавшихся в жидкой среде. Большинство культур из колоний с ограниченным краем (12 культур штамма 1000 и 2 культуры штамма 2–1) отличались относительно высокой скоростью миграции зоны колонизации (2–2,5 мм/ч), значительным ее диаметром к 18-му часу культивирования (20,2±0,72 мм), формированием по краю характерного ободка из быстроплавающих коротких одиночных клеток. Только одна культура штамма 2–1, содержащая обычные клетки, слабо распространялась по полужидкой среде (диаметр зоны через 18 ч был равен 11 мм, скорость продвижения 0,5 мм/ч), по-видимому, из-за слабой подвижности клеток, наблюдаемой и в жидкой среде. Все культуры из колоний с расплывающимся краем (10 культур штамма 1000 и 2 культуры штамма 2–1) оказались неспособными после культивирования в жидкой среде к активному движению в среде с 0,4 % агара, по крайней мере, в течение 48 ч. Диаметр зоны колонизации в среднем для этих культур составил 2,0±0,22 мм и определялся только характером размножения клеток. Край зоны интенсивного роста на поверхности среды был образован длинными, уложенными параллельно и тесно расположенными друг к другу цепями клеток, за краем в среде иногда можно было видеть микроколонии, сформированные пучками коротких цепочек. При наблюдении за зоной роста таких культур в течение более 48 ч было отмечено появление секторов быстрого движения, образованных одиночными короткими подвижными клетками.

*Колонизация плотной среды с 1,0–1,5 % содержанием агара.* Клетки культур из колоний с ограниченным краем, легко распространяющиеся по полужидкой среде, были не способны эффективно колонизировать плотную среду. Диаметр их зон распространения по среде с 1,5 % содержанием агара через 96 ч культивирования при 26 °С варьировал незначительно (9–14,5 мм) и в среднем составил 12,9±0,78 мм. По краю зон располагались параллельно уложенные цепи клеток, формирующие небольшие волны и изгибы. К этому времени клетки культур из колоний с расплывающимся краем занимали поверхность диаметром от 18 до 22 мм со средним значением 19,5±0,35 мм за счет активного роения, т. е. совместного движения групп параллельно уложенных нитевидных клеток, которые далеко выступали из зоны, образуя причудливые узоры. Кроме того, у ряда клонов нитевидные клетки проникали в толщу среды, располагаясь поодиночке, и напоминали мицелий. Следует отметить, высокую изменчивость исследуемого признака. Так, в зонах колонизации плотной среды культурами из колоний с ограниченным краем наблюдали сектора активного роения и глубинного роста, а в зонах распространения культур из колоний с расплывающимся краем – сектора с отсутствием активного движения.

### *Заключение*

Из результатов проведенного исследования следует, что для представителей вида *B. thuringiensis* характерен более широкий по сравнению с ранее описанным спектр способов колонизации сред. Наряду с зависимыми или независимыми от жгутиков способами индивидуального или совместного движения по поверхности, отмеченными нами в данном исследовании и описанными ранее для различных видов бактерий [5], ВТ может эффективно колонизировать толщу среды за счет образования и роста длинных нитевидных клеток. Кроме того, колонизация сред разной плотности происходит не за счет дифференцировки определенного типа клеток в момент соприкосновения со средой, а благодаря присутствию в популяции разных форм клеток, возникающих с высокой частотой. Такая изменчивость, несомненно, обеспечивает, наряду со споруляцией, адаптацию бацилл к различным условиям существования.

## Литература

1. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence / E. Helgason [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 6. – P. 2627–2630.
2. Bizzarri M. F. The Ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: Colonization from Soil, Plasmid Transfer, and Interaction with Larvae of *Pieris brassicae* / M. F. Bizzarri, A. H. Bishop // *Microb. Ecol.* – 2008. – Vol. 56. – P. 133–139.
3. Ghelardi E. Swarming behavior and hemolysin BL secretion in *Bacillus cereus*. / E. Ghelardi [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 4089–4093.
4. FlhF, a SRP-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour, and protein secretion in *Bacillus cereus* / S. Salvetti [et al.] // *Microbiology.* – 2007. – Vol. 153. – P. 2541–2552.
5. Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification / J. Henrichsen // *Bacteriol. Rev.* – 1972. – Vol. 36, № 4. – P. 478–503.
6. Identification of non-flagellar genes involved in swarm cell differentiation using a *Bacillus thuringiensis* mini-Tn10 mutant library / S. Salvetti [et al.] // *Microbiology.* – 2009. – Vol. 155. – P. 912–921.
7. Kuroki R. Nosocomial Bacteremia Caused by Biofilm-Forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* / R. Kuroki, K. Kawakami, L. Qin // *Internal medicine.* – 2009. – Vol. 48, № 10. – P. 791–796.
8. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae / D. J. Thomas [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 1. – P. 118–124.
9. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects / S. Salamitou [et al.] // *Microbiol.* – 2000. – Vol. 146. – P. 2825–2832.
10. Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid pBtoxis in *Bacillus cereus* group strains / X. Hu [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2005. – Vol. 245, № 2. – P. 239–247.

## Colonization of different density media in *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae*

V. I. Chemerilova

Irkutsk State University, Irkutsk

**Abstract.** The behaviour of cell's of wild-type strains 1 000 and 2–1 of *Bacillus thuringiensis* ssp. *galleriae* in liquid, semisolid (0,4 % agar, w/v) and solid (1,5 % agar, w/v) media was investigated. It was found that the populations of the investigated strains are heterogeneous and consist of two hereditarily fixed types of cells which are differ in ability to colonize media of different density. One type of cells effectively colonize media with a low density (0,2–0,4 % agar) due to swimming motility, but are not able to actively move through a solid medium. The second type of cells, by contrast, is unable to actively move in a semisolid medium, but can effectively colonize as the surface of a solid medium due to swarming motility, and of medium depth, through shaping the long (80 µm) septated and aseptated filamentous cells. In clonal cultures of both variants, alternative forms are arising with a high frequency.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, colonization of media, swimming and swarming motility, filamentous cells.

Чемерилова Валентина Ивановна  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
кандидат биологических наук  
доцент кафедры ботаники и генетики  
тел. (3952) 34–31–73  
E-mail: valchem@yandex.ru

Chemerilova Valentina Ivanovna  
Irkutsk State University  
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003  
Ph. D. of Biology, ass. prof.  
Head of the Dept. of Botany & Genetics  
phone: (3952) 34–31–73  
E-mail: valchem@yandex.ru