

УДК 57

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОБРАЗОВАНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

С.В.Мерчина, Г.Ф.Архипова, Д.А.Васильев

Протопласты бактерий являются более удобной, по сравнению с клеткой, моделью для генетических исследований по возможному проникновению генетического материала от одного вида бактерий в другой, так как отсутствие такого важного биологического барьера, как клеточная стенка облегчает слияние протопластов и проникновение в них ДНК.

Образование протопластоподобных структур было описано в литературе для некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий (Рябченко, 1980; Алиханян, 1981). Многие исследователи получали протопласты с помощью комбинированного действия пенициллина с лизоцимом (Чернов, 1984), глицина с лизоцимом. Однако уровень реверсии протопластов, полученных такими способами, в исходное бактериальное состояние очень низкий (Chatterjee, Williams, 1964), а также ЭДТА с лизоцимом (Иванова, 1983).

В связи с этим задачи наших исследований заключались в разработке методов получения протопластов у штаммов *Bacillus cereus* GP-7, *Bacillus anthracis* -34F2.

В работе использовали сибиреязвенный штамм, устойчивый к стрептомицину (1000 мкг/мл), и шт. *Bacillus cereus* GP-7, устойчивый к тетрациклину (150 мкг/мл). Штамм *Bacillus cereus* GP-7 имеет 2 плазмиды - рBC-16 и рBC-17, причем плазида рBC-17 является критической (то есть функция ее не определена), а плазида рBC-16 детерминирует устойчивость к тетрациклину (150 мкг/мл).

В основе нашей работы лежит модифицированный нами метод Chang, Choen (1979).

С целью получения протопластов клетки бактерий выращивали в богатой питательной гипертонической среде (ДМ-3), содержащей гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, глюкозу и антибиотики - стрептомицин и тетрациклин.

Культуры выращивали при постоянном перемешивании. Затем трижды отмывали их средой для протопластирования ДМ-3.

В своих опытах проводили изучение пригодности различных сред для образования протопластов: СММ, содержащую сахарозу, хлористый магний и малеиновую кислоту; ГКЯ – основными компонентами которой являются гидролизат казеина и янтарно-кислый натрий, и среду Алфолди, в состав которой входят 1 и 2-х валентные катионы. Исходные концентрации клеток определяли титрованием их в физиологическом растворе и высевом на мясо-пептонный агар (МПА) из соответствующих разведений. Протопласты получали путем обработки клеток бактерий

лизоцимом различных концентраций – 1, 2, 5 и 10 мг/мл. После добавления к клеткам лизоцима содержимое пробирок ресуспендировали и ставили на шуттель-аппарат при t° – 37°C. Время инкубирования клеток с лизоцимом было равно 1 часу. Через 1 час инкубации бактериальных клеток с лизоцимом суспензию отмывали от лизоцима, титровали ее в среде для протопластообразования и из соответствующих разведений высеивали на твердую регенерационную среду.

1. Состав используемых сред

1. СММ (рН ≈ 6,5):	
0,5 М сахараза	
0,02 М малеиновая кислота	
0,02 М хлористый магний	
2. ГКЯ (: расчет на 1 л)	
Гидролизат казеина	5 г
K_2HPO_4	3,5 г
K_2HPO_4	1,5 г
Янтарно-кислый натрий	135 г
Хлористый магний ($MgCl_2$)	4,06 г
Глюкоза	10 г
$FeSO_4 \cdot 6H_2O$	2 мг
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2 мг
3. ДМ-3 (жидкая)	на 1 л
Сукцинат Na	0,25М (рН-7,4)
Гидролизат казеина	5%
Дрожжевой экстракт	10%
K_2HPO_4	3,5%
K_2HPO_4	1,5%
Глюкоза	50%
$MgCl_2$	1 М
4. Среда Алфолди	на 1 л
NH_4Cl	1 г
Трис-НCl	12 г
KCl	35 г
NaCl	58 г
Na_2SO_4	300 мг
Сахароза	68,5 г
$MgCl_2$	4,26 г

Образование протопластов контролировали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Чувствительность протопластов к осмотическому шоку определяли следующим образом: суспензию протопластов

дважды центрифугировали по 15 минут при 4000 об/мин с ресуспандированием после каждого раза в дистиллированной воде. Затем из соответствующих разведений делали высевы на МПА. Результаты учитывали через 24 часа инкубирования при 37°C.

Учитывая исходную концентрацию клеток, число клеток, выросших на МПА после осмотического шока, и количество клеток, образовавшихся на регенерационной среде, определяли процент образования протопластов и процент их реверсии в исходную форму.

Выход протопластов был высоким при использовании в качестве сред для протопластирования среды СММ и составлял 99,5% и среды Алфолди, где он достигал 99,8% при концентрации лизоцима 1 мг/мл.

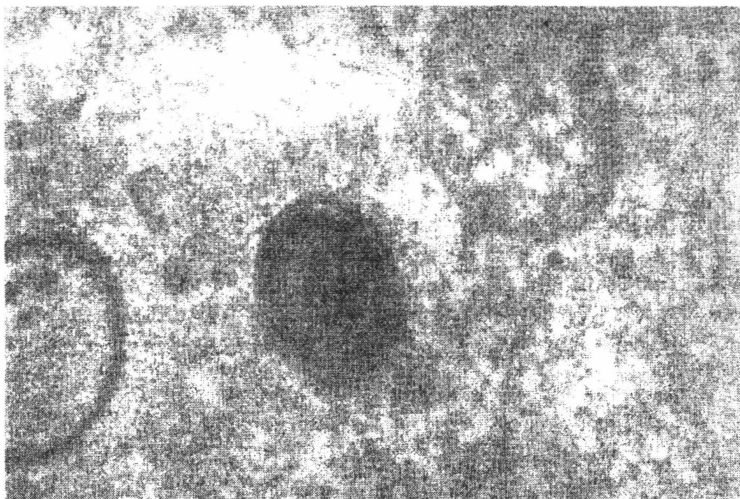
При использовании среды ГКЯ протопласты не образовывались совсем при концентрациях лизоцима 1 и 2 мг/мл. Процент образующихся протопластов составлял 70% при применении лизоцима в концентрации 5 мг/мл и 91% - 10 мг/мл.

В связи с этим в своих последующих опытах среда ГКЯ нами не использовалась.

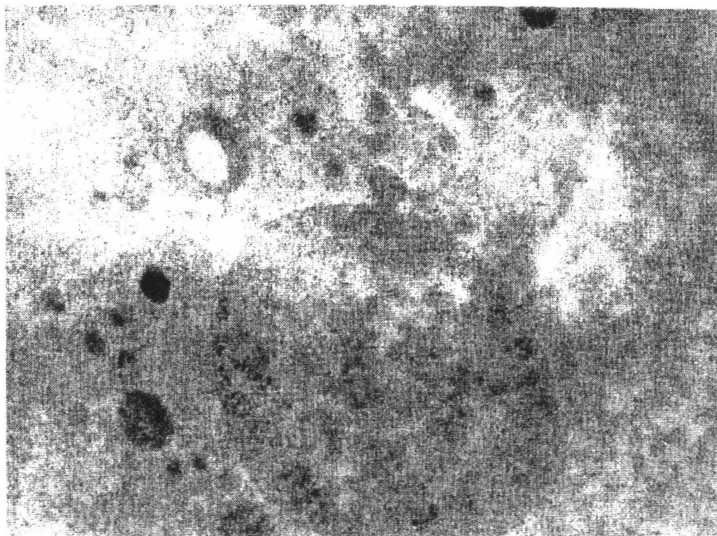
На рисунках 1, 2, 3, 4 показаны протопласты *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, полученные на среде Алфолди, где хорошо видно отсутствие клеточной стенки грамположительных бацилл.



Рис.1. Протопласты *Bacillus cereus* при увеличении $\times 16000$



**Рис.2. Протопласты *Bacillus anthracis*
при увеличении $\times 16000$**



**Рис.3. Протопласты штамма *Bacillus anthracis* 34 F2
при увеличении $\times 40000$**



Рис.4. Протопласты *Bacillus cereus* при увеличении $\times 60000$

УДК 57

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДНЫХ ШТАММОВ БАЦИЛЛ

С.В.Мерчина, Г.Ф.Архипова, Д.А.Васильев

В дальнейших исследованиях необходимо было выяснить возможность феномена межвидового слияния протопластов штаммов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*. В качестве одного из родителей использовали вакцинный сибиреязвенный штамм 34F2. Другим родителем был выбран штамм *Bacillus cereus* GP-7.

Помимо устойчивости к антибиотикам, о чем указывалось выше, эти бактериальные культуры имеют следующие свойства.

Штамм 34F2, обладает биологическими свойствами, характерными для штамма возбудителя сибирской язвы: типичным ростом на МПА и в МПЕ, клетки его неподвижны, соединены в цепочки, чувствителен к сибиреязвенным бактериофагам "К-ВИЭВ" и (-МВА, не лизирует эритроциты барана, не обладает способностью к росту при 45°C).

Штамм *Bacillus cereus* GP-7 способен расти при 45°C, клетки его подвижны и не соединены в цепочки, гемолитически активен и не чувствителен к сибиреязвенным бактериофагам. Штамм не содержит термостабильных антигенов, характерных для *Bacillus anthracis*.

Вышеперечисленные свойства являлись теми маркерами, по кото-