



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-

рым определялось эффективность появления межвидовых рекомбинантных штаммов.

Метод слияния протопластов, детально описанный выше, заключается в следующем: равные объемы суспензии протопластов, полученных по вышеуказанному методу, смешивали и обрабатывали 40% полиэтиленгликолем (ПЭГом) с молекулярным весом 6000 (ПЭГ-6000), приготовленным на гипертонической среде СММ, содержащей двойные количества сахарозы и хлористого магния.

Обработку ПЭГ проводили при комнатной температуре в течение короткого промежутка времени (1-2 минут), так как адгезия протопластов происходит почти мгновенно, а увеличение времени инкубации свыше 20 минут негативно сказывается на последующем выходе рекомбинантного потомства.

После экспозиции суспензию с ПЭГом разбавляли гипертонической средой, СММ, содержащей сахарозу, малеиновую кислоту, хлористый магний, Penassay бульон и центрифугировали в шадящем режиме (10 минут при 2600 q). Следует отметить, что этап центрифугирования в данном случае благоприятно сказывался на конечных результатах слияния протопластов. Затем протопласты переводили в небольшой объем гипертонической среды (СММ) и инкубировали 1,5-2 часа при 37°C до завершения этапа слияния. После этого высевали бактериальную взвесь на селективные среды с антибиотиками.

На рисунке 1 представлены слияния и в последствии обмен генетической информацией протопластов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*.

Реверсию протопластов в исходные бактериальные формы и осуществляли инкубацией их в жидкой СММ и на твердых регенерационных средах.

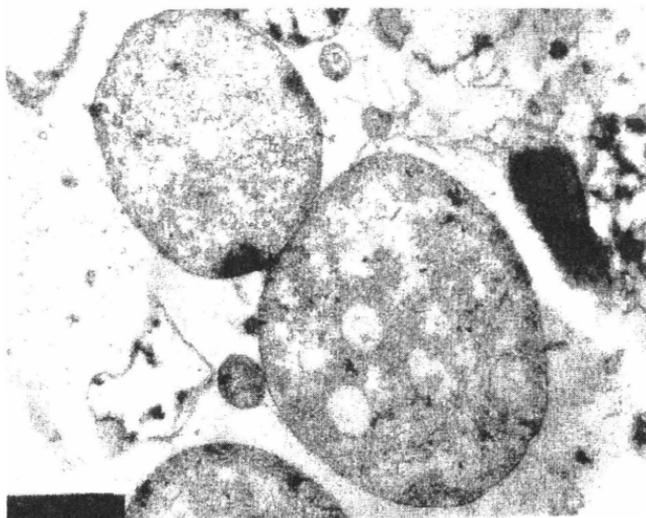
Селекцию гибридных колоний проводили 2-мя способами:

1 - прямая селекция - смесь протопластов обоих родителей после обработки ПЭГом высевали на чашки Петри с регенерационной средой, содержащей антибиотиками - стрептомицин и тетрациклин.

2 - непрякая селекция - смесь протопластов высевали на регенерационную среду без антибиотиков, инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов и после реверсии пересевали на МПА с антибиотиками для отбора рекомбинантных клонов.

С помощью метода непрякой селекции были получены рекомбинанты, которые после реверсии на твердой регенерационной среде и посева на МПА, содержащего смесь 2-х антибиотиков, образовывали колонии через 24 часа культивирования при 37°C.

Методом прямой селекции не удалось получить рекомбинантные клоны.



**Рис. 1. Слияние протопластов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*.
Увеличение $\times 30000$**

Рекомбинантные клоны, полученные методом непрямой селекции, устойчивы в 2-м антибиотикам – стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Культуральные, морфологические, биохимические и антигенные свойства всех рекомбинантов исследовали с использованием 11 тестов, принятых для идентификации и дифференциации штаммов *Bacillus anthracis* от штаммов *Bacillus cereus*.

Рекомбинантные клоны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам можно разделить на 3 группы.

К 1-ой группе были отнесены рекомбинанты, имеющие сходные культуральные, морфологические и некоторые биохимические свойства с исходным штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА и в МПБ, морфологии клеток и их подвижность, способность к росту при 45°C.)

Для рекомбинантов 2-ой группы характерно наличие как подвижных одиночных клеток, так и неподвижных, соединенных в длинные цепочки, способность к росту при 45°C.

Рекомбинанты 3-ей группы характеризовались отсутствием подвижности, по морфологии клеток они обнаруживали сходство с исходными штаммом *Bacillus anthracis*, но обладали способностью к росту при 45°C, характерной для *Bacillus cereus*.

Рекомбинанты всех 3-х групп имели более низкую гемолитическую активность по сравнению с исходным штаммом *Bacillus cereus* и были не

чувствительны к сибиреязвенным фагам.

Таким образом, путем слияния протопластов, штаммов *Bacillus anthracis* 34F2, устойчивых к стрептомицину (1000 мкг/мл) и *Bacillus cereus* GP-7, устойчивых к тетрациклину (150 мкг/мл) получены рекомбинантные клоны, устойчивые к 2-м антибиотикам - стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Они имеют большое сходство по биологическим свойствам с родительским штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА, способность к росту при 45°C, отсутствие чувствительности к сибиреязвенным фагам, отсутствие антигенных структур, характерных для *Bacillus anthracis*) и некоторое сходство с исходным штаммом *Bacillus anthracis* по морфологии клеток, отсутствию подвижности и гемолитической активности.

В результате проведенных исследований доказана возможность появления межвидовых рекомбинантов путем слияния протопластов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*. Рекомбинантные клоны имели свойства обоих родителей.

УДК 57

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ БАЦИЛЛ К РЕВЕРСИИ

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

Следующая серия экспериментов была посвящена определению способности протопластов, получившихся из клеток *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, реверсировать в нормальные бактериальные формы. Для определения способности протопластов реверсировать в исходные бактериальные формы суспензию разводили в гипертонической среде и из различных разведений делали высева на плотную агаризованную среду (ДМ-3).

По данным литературы, способность протопластов к регенерации определяется степенью гидратации среды. Регенерацию протопластов мы проводили в условиях полужидкого (0,8%) агара, так как при этом наблюдается более интенсивная аэрация и более мягкое прорастание регенерированных протопластов. Подсчет образующихся бактериальных колоний производили через 24 часа инкубирования при t° 37°C.

Уровень реверсии мы определяли, исходя из разницы в числе колоний, образовавшихся на регенерационной среде и формирующихся на МПА после осмотического шока, отнесенной к первоначальному количеству бактерий в культуре.

Было установлено, что наиболее высокий процент регенерации протопластов наблюдали при применении среды Алфолди, использовании лизоцима в концентрации 1 мг/мл, и он достигал 6,5%. Более высокие