Доклады Академии наук СССР
1970. Том 194, № 6

УДК 576.8.095.332

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. В. КОВАЛЬСКИЙ, С. В. ЛЕТУНОВА, Р. Д. АЛТЫНБАЕВА

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕЛЕНУ И ОБРАЗОВАНИЯ СЕЛЕНРЕДУКТАЗЫ У BACILLUS MEGATERIUM

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 21 I 1970)

При изучении геохимической экологии почвенных микроорганизмов установлена характерная приспособляемость их к определенным концентрациям в почве микроэлементов Co, Cu, Mo, V, U, B, Se ([1–3]).

Получение информации о генетической природе процессов приспособления представляется важной экологической задачей.

Целью данного исследования была попытка генетической трансформации у Bac. megaterium признака устойчивости к высокому содержанию селена в среде и образования селенредуктазы.

Методика. Исследования проводились с двумя штаммами Bac. megaterium. Штамм 8, изолированный из почвы с высоким содержанием Se ($4{,}9\cdot10^{-5}$%, Тувинская АССР), приспособлен к избытку Se в естественной среде обитания. Предельная концентрация этого элемента для роста 500 мг/л, оптимальная — в пределах от 10 до 100 μг/л. Штамм 101, выделенный из почвы с низким содержанием Se ($1{,}2\cdot10^{-6}$%, Московская обл.) и адаптированный к этой концентрации, растет при предельной концентрации 180 мг/л с оптимумом роста при 5 μг/л. Известно, что микроорганизмы обладают способностью с помощью фермента селенредуктазы восстанавливать растворимые соединения Se до нерастворимого элементного состояния ([3], [4]).

Ранее нами было показано, что штамм 8, выращенный на среде Чапека без добавления Se, при последующем инкубировании с селенитом восстанавливает его. Редуцирующая способность возрастает по мере увеличения содержания Se в среде. Таким образом, у штамма 8 селенредуктаза обнаруживается постоянно, независимо от наличия селена в питательной среде, и, по-видимому, является конститутивным ферментом. Очевидно, штамм 8 приспособился к избытку Se в почве путем его восстановления до элементарного состояния.

У штамма 101, выделенного из почвы, бедной селеном, селенредуктаза появляется только при выращивании на среде с добавлением Se и является адаптивным индуцируемым ферментом.

Таким образом, два штамма Bac. megaterium, изолированные из почв с различным содержанием селена, характеризуются неодинаковыми устойчивостью к селену и активностью селенредуктазы. Представляло интерес трансформировать эти признаки у штамма 101 (реципиент) путем прибавления к среде ДНК, выделенной из штамма 8 (донор). Выделение трансформационной ДНК проводилось по методу Кирби в модификации Георгиева ([5]). Культура выращивалась 18 час. на МПБ, после чего центрифугировалась при 3 тыс. об/мин. в течение 20 мин. Клетки, промытые на холоде раствором 0,1 *M* NaCl и 0,01 *M* лимоннокислого натрия в фосфатном буфере, лизировались яичным лизоцимом в течение 20 мин. при 37°. Для разрушения протопластов применялся дюпанол (конечная концентрация 1%). Депротеинизация проводилась смесью водонасыщенного фенола (pH 8) и хлороформа (2 : 1), осаждение ДНК — абсолютным этиловым спиртом. Очи-

щенная ДНК растворялась в 0,015 *M* NaCl. Хранился раствор ДНК в 2 *M* NaCl при —4°. Концентрация ДНК определялась по Бартону ([6]).

Компетентные клетки получали по методу, описанному Прозоровым ([7]). Вместо среды Спицайзена нами применялась среда Чапека. Штамм-реципиент выращивался 18 час. на косяке Чапека. Затем налет смывался 10 мл этой среды, суспензия переносилась в стерильную коническую колбу на 250 мл и прогревалась в водяной бане при 37° 10 мин. Культура выращивалась при аэрации в течение 4 час., после чего разводилась в 10 раз свежей средой Чапека, к которой добавляли Se 0,5 мг/л. После прогревания при 37° 10 мин. культура снова выращивалась 90 мин., затем смешивались одинаковые объемы компетентных клеток и раствора трансформационной ДНК (5 μг/мл) и инкубировались 30 мин. После инкубации добавляли

Таблица 1

Рост Bacillus megaterium (число колоний) при различном содержании селена в питательной среде Чапека

№№ штаммов Bac. megaterium	№№ опытов	При 0 мг/л	При 180 мг/л	При 200 мг/л	При 500 мг/л
8	1	+++	+++	+++	36
	2	+++	+++	+++	20
	3	+++	+++	+++	5
101	1	+++	57	0	0
	2	+++	17	0	0
	3	+++	41	0	0

Примечание. +++ — сплошной рост.

раствор ДНКазы (конечная концентрация 150 μг/мл) для разрушения ДНК, не проникшей в клетки. Полученная суспензия высевалась на среду Чапека с добавлением Se 0; 100; 160; 180; 200 мг/л. Бактерии выращивались 3 суток при 28°.

Трансформанты подсчитывались на среде с добавлением Se 200 мг/л, так как при этой концентрации штамм-реципиент не растет. Подсчет общего числа клеток проводился из этой же суспензии на среде Чапека без добавления селена (при разведениях: 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000), а также методом прямого счета в камере Тома.

Культуры трансформантов отсевались в пробирки со скошенной агаризованной средой Чапека. Для проверки селенредуктазной активности донор, реципиент и трансформанты выращивались 5 суток при 25° на жидкой среде Чапека без добавления Se. Затем по методу Фальконе и Никерсона ([4]) определялась их редуцирующая способность при различных концентрациях селена в инкубационной смеси (0; 2; 10; 20; 100; 200; 1000 μг/мл ([3]) *. В опытах по трансформации очень важны контроли. В наших опытах постоянно контролировали стерильность ДНК (высев ДНК без добавления клеток реципиента), а также присутствие загрязнений и клеток ревертантов в культуре реципиента (высев клеток из культуры реципиента без добавления ДНК).

Результаты. В начале работы были определены концентрации селена, при которых возможен рост исследованных штаммов Bac. megaterium (табл. 1). Из табл. 1 видно, что штамм 8, выделенный из почвы, обогащенной селеном (Тувинская АССР), способен расти при предельной концентрации селена в среде 500 мг/л, в то время как штамм 101, изолированный из почвы с низким содержанием селена (Московская обл.), переносит лишь 180 мг/л. При 200 мг/л роста нет, почему в дальнейших исследованиях для подсчета числа трансформантов использовалась жидкая питательная среда Чапека с добавлением Se 200 мг/л.

* Метод основан на определении увеличения оптической плотности за счет восстановления селенита (появление розовой окраски).

Нами была сделана попытка наведения метки устойчивости к Se у штамма 101 с помощью ДНК штамма 8. Известно ([8], [9]), что при трансформации устойчивости к бактериоцидным и бактериостатическим веществам следует делать засев суспензии (ДНК + реципиент) на среды для подсчета трансформантов не сразу после обработки ее ДНКазой, а спустя 1,5—2 часа. Поскольку высокие концентрации селена являются для реципиента (штамма 101) бактериоцидными, в первых четырех опытах засев суспензии

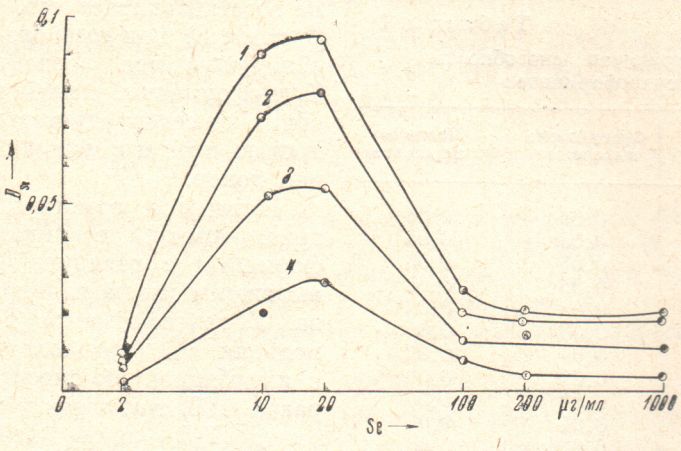

Рис. 1. Восстановление селенита Bacillus megaterium. *1* — донор (штамм 8), *2—4* — трансформанты (соответственно Т-8, Т-6, Т-5)

проводился через 5 мин. и через 2 часа после обработки ДНКазой. Установлено, что наибольшее число трансформантов появляется после двухчасовой инкубации:

Продолжительность инкубации, мин.	Число трансформантов на одну чашку в четырех опытах
5	183; 432; 330; 213
120	332; 735; 1320; 395

В последующих опытах засев суспензии на агаризованную среду Чапека с добавлением 200 мг селена на литр для подсчета колоний трансформантов проводился через 2 часа после добавления ДНКазы. В табл. 2 представлены данные, иллюстрирующие трансформацию устойчивости к селену.

Из табл. 2 видно, что в наших опытах процент трансформантов (от общего числа клеток) колеблется от 0,05 до 1,08%. Прозоров ([7]) и Парийская ([10]) получили у Bac. subtilis от 0,05 до 0,08% трансформантов, Мацелюх ([11]) у актиномицетов — от 0,1 до 0,74%.

Таблица 2

Трансформация устойчивости к селену.
Контроли: ДНК — нет роста на среде Чапека; донор — хороший рост на среде Чапека без селена и с добавлением Se 200 мг/л; реципиент — хороший рост на среде без селена; при содержании Se 200 мг/л рост отсутствует

№№ опытов	Число клеток (в млн/мл)	Число трансформантов (в тыс/мл)	В процентах	№№ опытов	Число клеток (в млн/мл)	Число трансформантов (в тыс/мл)	В процентах
1	3,68	6 640	0,18	7	6,43	15 600	0,24
2	7,28	14 700	0,22	8	4,52	4820	0,10
3	2,43	26 400	1,08	9	4,06	3500	0,08
4	5,96	7 900	0,13	10	7,09	4000	0,05
5	7,10	19 300	0,27	11	4,01	5750	0,14
6	4,63	21 000	0,45	12	4,40	6400	0,14

Таким образом, нам удалось получить культуры трансформантов, устойчивые к высокому содержанию селена в среде (200 мг/л). Трансформанты отсевались на косяки Чапека. Представляло интерес изучить их способность синтезировать селенредуктазу на среде без добавления селена.

На рис. 1 представлены данные по определению редуцирующей способности у донора и трансформантов. Реципиент (штамм 101), выращенный на среде Чапека без селена, при последующем инкубировании с селенитом не восстанавливает его. У донора (штамм 8) при этих же условиях обнаруживается селенредуктаза. Трансформанты, подобно донору, обладают селенредуктазной активностью, хотя и в меньшей степени, чем донор.

Таблица 3

Редуцирующая способность трансформантов

№№ трансформантов	Сразу после выделения	После 50 пересевов
Т-3	0,09	0,08
Т-5	0,03	0,05
Т-6	0,05	0,03
Т-8	0,08	0,07
Т-9	0,08	0,08
Т-10	0,05	0,05
Т-24	0,06	0,07
Т-25	0,09	0,08
Т-27	0,07	0,07
Т-28	0,04	0,05
Т-29	0,09	0,08
Т-31	0,06	0,06
Контроль (донор)	0,09	0,08

Интересно отметить, что при трансформации возникают трансформанты с различной степенью выраженности наведенного свойства. У трансформанта Т-8 максимальная D_{Se} (при содержании Se в инкубационной смеси 20 μг/мл) равна 0,09, тогда как у трансформанта *Т*-5 — лишь 0,03. Селенредуктазная активность сохранялась в течение длительного времени (к настоящему времени они пересевались уже 50 раз) (табл. 3).

Таким образом показано, что в основе регуляции приспособленности Bac. megaterium к экстремальным геохимическим факторам среды — повышенному содержанию селена в почве — и образования селенредуктазы лежат генетические особенности организма.

Биогеохимическая лаборатория
Института геохимии и аналитической химии
им. В. И. Вернадского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
16 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. В. Ковальский, С. В. Летунова, Усп. совр. биол., 57, в. 1 (1964). [2] В. В. Ковальский, С. В. Летунова, Агрохимия, № 7 (1966). [3] С. В. Летунова, В. В. Ковальский, В. В. Ермаков, Тр. биогеохимич. лаб., 12 (1968). [4] G. Falcone, W. J. Nickerson, J. Bacteriol., 85, 4 (1963). [5] Г. П. Георгиев, Биохимия, 24, 472 (1959). [6] R. Burton, Biochem. J., 62, 315 (1956). [7] А. А. Прозоров, Генетическая трансформация у микроорганизмов, М., 1966. [8] V. I. Iyer, J. Bacteriol., 84, 326 (1962). [9] I. Stuy, D. Stern, J. Gen. Microbiol., 35, 391 (1964). [10] А. Н. Парийская, Микробиология, 36, в. 2, 222 (1967). [11] Б. П. Мацелюх, Трансформация у актиномицетов с помощью ДНК, Кандидатская диссертация, Киев, 1963.