

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ ПЛАЗМИДСОДЕРЖАЩЕГО И БЕСПЛАЗМИДНОГО ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ СУЩЕСТВОВАНИЯ

© 2000 г. Т. Ю. Крылова, Л. Ю. Попова, Н. С. Печуркин, Т. А. Кашперова, В. А. Белявская

Институт биофизики СО РАН, Красноярск

Поступила в редакцию 10.09.99 г.

Проведено сравнение гетерогенности популяций рекомбинантного и бесплазмидного штаммов *Bacillus subtilis* при интродукции в водные микрокосмы. Бесплазмидный штамм *B. subtilis* 2335 сохранялся как в форме вегетативных клеток, так и в форме спор, рекомбинантный штамм *B. subtilis* 2335/105 (Km^rInf^r) – преимущественно в форме спор. У “споровых” изолятов рекомбинантного штамма отмечали сохранение исходной копийности плазмиды, а у “вегетативных” изолятов – снижение исходной копийности. У изолятов *B. subtilis* 2335/105, полученных из микрокосмов, и вариантов, полученных после 10 последовательных пассажей (среды М9 и 0.1 × М9 с Km и без Km), отмечали изменения по копийности, устойчивости к Km и максимальному приросту биомассы в зависимости от условий выделения. На среде М9 (независимо от присутствия Km) у 50 и более процентов вариантов наблюдали снижение копийности. На 0.1 × М9 – около 70% на среде с Km и 90% вариантов на среде без Km сохраняли исходную копийность, что в основном коррелировало с устойчивостью к Km. У всех вариантов, выделенных со сред с Km, наблюдали сохранение исходного максимального прироста биомассы. У 70 и более процентов вариантов, выделенных со сред без Km, отмечали увеличение прироста биомассы.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, рекомбинантная плазида, микрокосм, интродукция, гетерогенность.

Рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* 2335/105 входит в состав пробиотического препарата “субалин” [5]. Наличие плазмиды, детерминирующей синтез интерферона и резистентность к канамицину, с одной стороны, обеспечивает его устойчивость к ряду аминогликозидных антибиотиков, с другой – повышает нагрузку на биосинтетический аппарат клеток, поскольку синтезируются продукты клонированных генов (α 2-интерферон человека). В процессе получения пробиотических препаратов отмечается высокая гетерогенность штаммов по уровню экспрессии клонированных генов [6]. Как правило, условия среды, приводящие к такой гетерогенности, обсуждаются недостаточно.

При использовании препаратов, созданных на основе генетически модифицированных микроорганизмов (ГММО), существует вероятность попадания их в окружающую среду, где оценить последствия возникающей гетерогенности в популяциях еще сложнее, чем в лабораторных условиях. Следствием этого процесса может быть возникновение вариантов, которые могут составить конкуренцию природной микрофлоре [7, 8].

Ранее было показано, что в популяции штамма *Bacillus subtilis* 2335/105 при пассажах на полной среде в отсутствие селективного фактора быстро накапливаются бесплазмидные клетки, а при интродукции в микрокосмы клетки сохраняются преимущественно в спорах [3]. При прорастании спор клетки ГММО могут иметь отличные по сравнению с исходно интродуцированным штаммом характеристики (копийность плазмиды, скорость роста). Появление изолятов с измененными признаками может быть обусловлено изменением копийности рекомбинантной плазмиды в клетках. Моделируя определенные условия природных экосистем в “острых” опытах и лабораторных микрокосмах, можно продемонстрировать возможное действие естественного отбора, оценить динамику процессов сохранения и возможной миграции рекомбинантной плазмиды [3, 7–9].

Целью данного исследования являлось изучение гетерогенности популяции рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* 2335/105 в условиях модельных водных экосистем, различающихся длиной трофической цепи, и при последовательных пассажах на твердых средах разного состава.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали штаммы *B. subtilis* 2335 и *B. subtilis* 2335/105, содержащий рекомбинантную плазмиду (Km^rInf^+) размером 5.6 тпо, предоставленный лабораторией ГНЦ ВБ “Вектор” (Бердск) [4]; изоляты рекомбинантного штамма, выделенные из модельных водных экосистем, и варианты, полученные в результате последовательных пассажей (после 300 генераций) на твердых средах различного состава: буферная среда М9 [10] с добавлением пептона в количестве 5 г/л (полная) и на этой же среде, разбавленной в 10 раз ($0.1 \times M9$) (голодная), в присутствии и в отсутствие канамицина.

Микрокосмы. Использовали водные модельные экосистемы (МЭС) [1], различающиеся длиной трофической цепи [3]: МЭС IA, IB, IC содержали консументов первого порядка (простейших), МЭС ПА, ПВ, ПС – консументов первого и второго (дафнии) порядков. Микрокосмы до интродукции функционировали в течение трех месяцев. К этому времени численность звеньев в результате сукцессии стабилизировалась по качественному и количественному составу в парных микрокосмах. После этого была проведена интродукция гомогенных культур изучаемых штаммов, в результате чего численность клеток бесплазмидного (IA, ПА) и плазмидного (IB, ПВ) штаммов в микрокосмах составила по 2×10^6 кл/мл. Микрокосмы IC и ПС являлись контрольными. Все МЭС находились при одинаковой освещенности и температуре.

Анализ численности микрофлоры (КОЕ) и условия культивирования описаны ранее [3]. Максимальную биомассу при периодическом культивировании клеток исследуемых штаммов определяли в процентах к контролю. В качестве контроля использовали рекомбинантный штамм *B. subtilis* 2335/105 (максимальное накопление биомассы по достижении стационарной фазы роста – 100%). Для обнаружения спор пробы объемом 10 мл прогревали 10 мин при 80°C , затем фильтровали через бактериальный мембранный фильтр диаметром 0.1 мкм (Владипор МФА, Россия). Фильтр помещали в чашку Петри с агаризованной полной средой для прорастания спор. В качестве селективного фактора использовали канамицин в концентрациях 0.5, 5, 50 мкг/мл.

Оценка количества плазмидной ДНК. Выделение плазмидной ДНК проводили на базе ГНЦ “Вектор” по стандартной методике [2]. Для количественной оценки копийности анализируемые образцы вместе со стандартным образцом плазмиды рВМВ105 с известным числом копий плазмиды анализировали с помощью агарозного электрофореза с последующим окрашиванием гелей бромистым этидием, фотографированием и сканированием полученных негативов. Вариан-

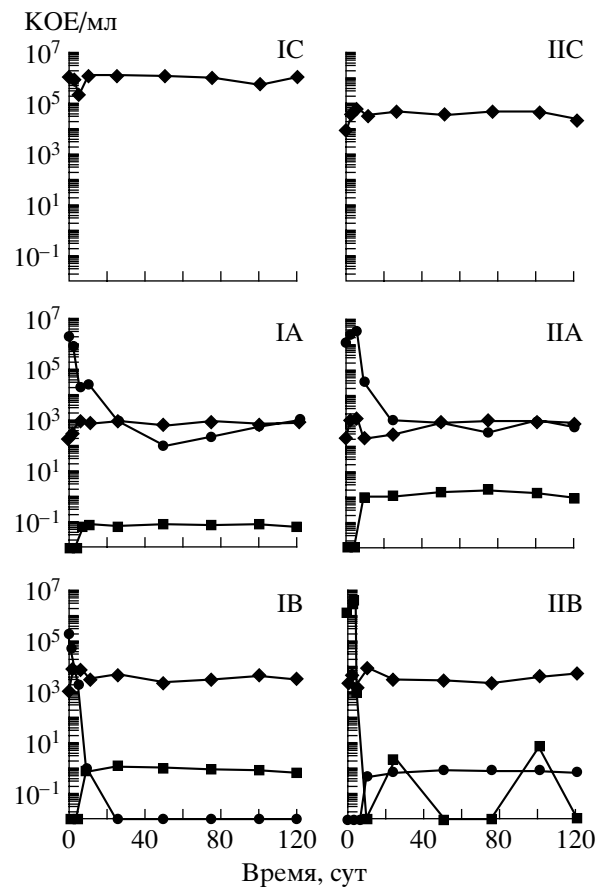


Рис. 1. Динамика численности бесплазмидного (IA, ПА) и плазмидного (IB, ПВ) штаммов *Bacillus subtilis*, вегетативных клеток (●) и спор (■) и автохтонной микрофлоры (◆) в экспериментах с микрокосмами, содержащими консументов 1-го порядка (IA, IB, IC) и консументов 1-го и 2-го порядков (ПА, ПВ, ПС).

ты, имеющие копийность, сравнимую (70–100%) с исходным рекомбинантным штаммом (40–50 копий плазмиды на клетку), обозначены как высококопийные, 20–70% копий – среднекопийные, менее 20% – низкокопийные. Для исключения влияния количества биомассы на сравнение результатов по копийности проводили нормирование по оптической плотности клеточной суспензии (D_{550}) и контроль за эффективностью лизиса на стадии выделения ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гетерогенность штаммов при интродукции в микрокосмы. При интродукции плазмидного и бесплазмидного штаммов в водные микрокосмы отмечены значительные различия в соотношении вегетативных клеток и спор. Бесплазмидный штамм длительное время сохраняется преимущественно в форме вегетативных клеток, в то время как у рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2335/105 уже через 10 сут после интродукции

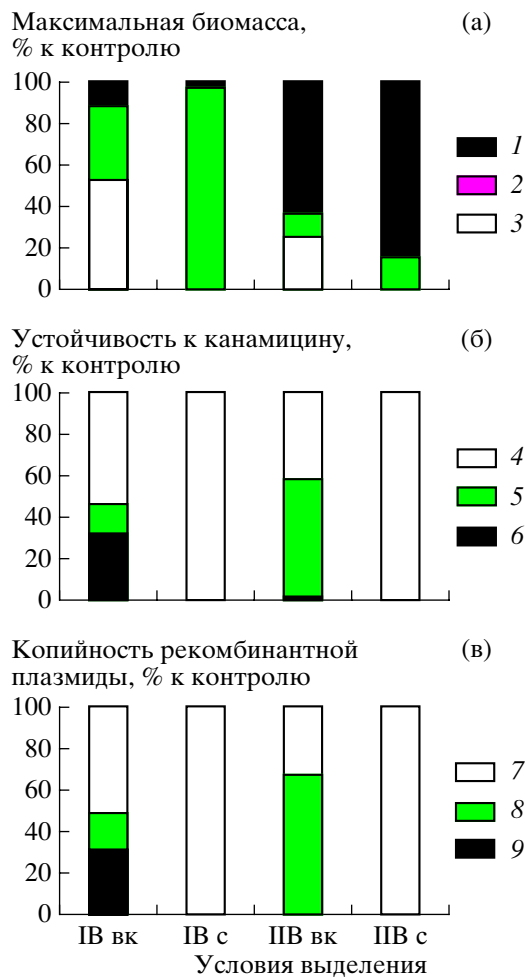


Рис. 2. Гетерогенность штамма *B. subtilis* 2335/105 после интродукции в модельные водные экосистемы (МЭС): а – максимальная биомасса, % к контролю (1 – 95–120; 2 – 120–170; 3 – 170–210%); б – устойчивость к канамицину, % к контролю (4 – 0,5; 5 – 5; 6 – 50 мкг/мл); в – копияность рекомбинантной плазмиды, % к контролю (7 – менее 20; 8 – 20–70; 9 – 70–100%). IV вк – “вегетативные” клетки из IV-микросома, IV с – “споровые” клетки из IV-микросома, ПВ вк – “вегетативные” клетки из ПВ-микросома, ПВ с – “споровые” клетки из ПВ-микросома.

вегетативные клетки практически не обнаруживались (рис. 1). Однако в микросомае ПВ (с более длинной трофической цепью) периодически наблюдалось незначительное появление вегетативных клеток (рис. 1).

Из микросомаем выделены изоляты вегетативных клеток и спор. У полученных изолятов изменялись следующие характеристики: максимальный прирост биомассы по достижении стационарной фазы роста, устойчивость к канамицину, копияность рекомбинантной плазмиды (рис. 2).

У большей части изолятов рекомбинантного штамма, выделенных из модельных экосистем (в

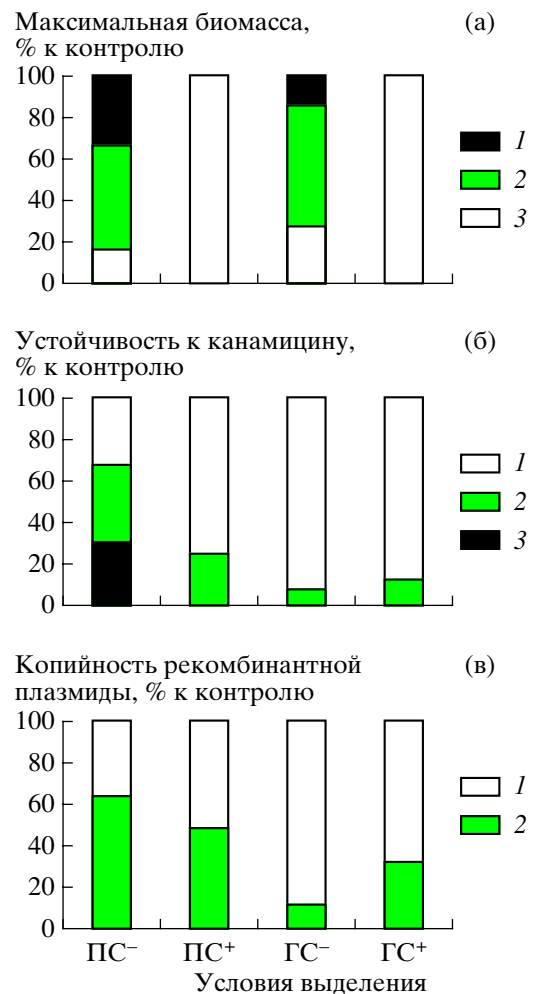


Рис. 3. Гетерогенность штамма *B. subtilis* 2335/105 после пассажей на средах разного состава: а – максимальная биомасса, % к контролю (1 – 95–120; 2 – 120–170; 3 – 170–210%); б – устойчивость к канамицину, % к контролю (1 – 0,5; 2 – 5; 3 – 50 мкг/мл); в – копияность рекомбинантной плазмиды, % к контролю (1 – менее 20; 2 – 20–70%). ПС- – полная среда без канамицина, ПС+ – полная среда с канамицином, ГС- – полная среда, разведенная в 10 раз, без канамицина, ГС+ – полная среда, разведенная в 10 раз, с канамицином.

основном “споровых”), наблюдали значительное увеличение максимальной биомассы при периодическом культивировании по сравнению с контрольным штаммом (рис. 2а). Сохранение этого параметра, близкого к контролю (около 50% изолятов в микросомае IV и до 12% – в микросомае ПВ), отмечено только среди “вегетативных” изолятов.

Среди исследуемых изолятов (как “вегетативных”, так и “споровых”) не обнаружено потери рекомбинантной плазмиды (рис. 2б). У “споровых” изолятов отмечено сохранение плазмиды в полном объеме во всех случаях. Низкая копия-

ность плазмиды (менее 20% копий рекомбинантной плазмиды по отношению к контролю) была обнаружена только у “вегетативных” изолятов, выделенных из микрокосма IV.

Устойчивость к канамицину в большинстве случаев коррелировала с копийностью рекомбинантной плазмиды. Все споровые изоляты были устойчивы к высоким концентрациям канамицина (50 мкг/мл), а среди “вегетативных” изолятов из микрокосма IV отмечено появление клеток, чувствительных к канамицину (рис. 2в).

Гетерогенность штаммов при последовательных пассажах на твердых средах. Различия в гетерогенности рекомбинантного штамма в микрокосмах, различающихся длиной трофической цепи, могут быть обусловлены различными факторами, в частности различной концентрацией питательных и токсичных веществ [3]. Исследовано проявление гетерогенности у плазмидного штамма при последовательных пересевах на твердых средах разного состава с учетом ключевых факторов природных экосистем (полные и разбавленные среды, в присутствии или в отсутствие селективного фактора). Для оценки гетерогенности штамма из каждого варианта опыта отбирали случайным образом около 300 колоний, у которых оценивались те же критерии, что и в опытах с изолятами, выделенными из микрокосмов (рис. 3).

В условиях полной среды без антибиотика в популяции *B. subtilis* 2335/105 накапливались варианты, характеризующиеся более высоким максимальным приростом биомассы по достижении стационарной фазы роста и значительным снижением копийности рекомбинантной плазмиды (до 65%). При этом отмечали корреляцию между копийностью плазмиды и устойчивостью клеток к канамицину (рис. 3). У вариантов с высоким максимальным приростом биомассы копийность плазмиды составляла менее 20% от контроля (вариант 10-22, 10-101; рис. 4, таблица). Однако при значительном снижении копийности плазмиды не всегда наблюдали восстановление максимального прироста биомассы до уровня бесплазмидного штамма (вариант 10-15, рис. 4, таблица).

Как полная, так и голодная среды с селективным фактором (канамицином) способствовали сохранению в популяции *B. subtilis* 2335/105 вариантов, устойчивых к высоким концентрациям антибиотика (рис. 3в). Несмотря на снижение копийности рекомбинантной плазмиды у значительной части исследованных вариантов, устойчивость к канамицину сохранялась на уровне контроля (варианты 10-201, 10-207, рис. 4, таблица). При этом у вариантов наблюдали сохранение максимальной биомассы, характерной для исходного рекомбинантного штамма (рис. 3).

Анализ вариантов, выделенных при пассажах на голодной среде без антибиотика показал, что у

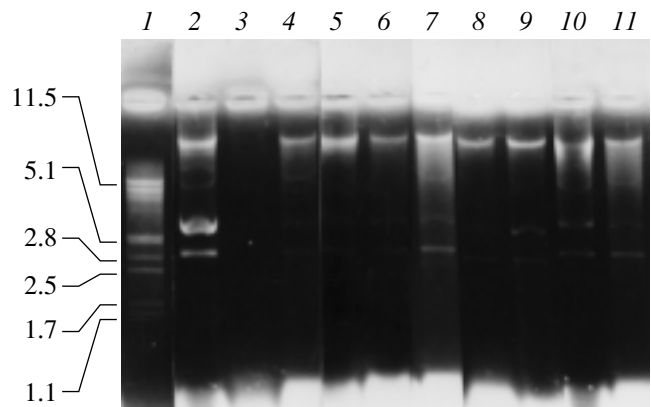


Рис. 4. Данные электрофореза лизата клеток вариантов рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2335/105, выделенных после пассажей в различных условиях. Дорожки: 1 – фаг λ ; 2 – *B. subtilis* 2335/105; 3 – *B. subtilis* 2335; 4 – вариант 10-15; 5 – вариант 10-22; 6 – вариант 10-101; 7 – вариант 10-54; 8 – вариант 10-183; 9 – вариант 10-207; 10 – вариант 10-48; 11 – вариант 10-201.

большинства вариантов (около 90%, рис. 3) сохранялась высокая копийность плазмиды (варианты 10-54, 10-48 рис. 4, таблица) и соответственно устойчивость к высоким концентрациям антибиотика в среде (50 мкг/мл). Было также отмечено появление вариантов, максимальный прирост биомассы которых был такой же, как и у бесплазмидного штамма *B. subtilis* 2335, однако при этом сохранялась высокая копийность плазмиды и устойчивость к высоким концентрациям канамицина (вариант 10-54, рис. 4, таблица).

Таким образом, проведенные эксперименты по сравнительной интродукции бесплазмидного *B. subtilis* 2335 и рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2335/105 выявили различия между ними в способе выживания в различных условиях среды. Клетки рекомбинантного штамма сохранялись преимущественно в виде спор, в то время как бесплазмидный штамм сохранялся и в форме вегетативных клеток, и в спорах. Такие различия могут быть следствием дополнительной нагрузки (продукция интерферона) на биосинтетический аппарат клеток. Тот факт, что популяции бесплазмидного штамма, полученные как из спор, так и из вегетативных клеток, не являются гетерогенными в отличие от популяций рекомбинантного штамма, может служить подтверждением того, что клетки стремятся снизить экспрессию гетерологичных генов, не нужных им для выживания в данных условиях. Однако потери рекомбинантной плазмиды среди исследованных изолятов (как “вегетативных”, так и “споровых”) обнаружено не было. У “споровых” изолятов во всех случаях было отмечено сохранение исходной копийности плазмиды. Среди “вегетативных” изолятов”, выделенных из микрокосма IV, обнаружено

Характеристика некоторых вариантов рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* 2335/105, выделенных после пассажей в различных условиях

№ п/п	Вариант	Условия выделения*	Максимальная биомасса (D_{540}), опт. ед.	Максимальная концентрация канамицина, к которой резистентен вариант, мкг/мл	Копийность плазмиды
1	2335/105	Исходный плазмидный штамм	0.7 ± 0.1	50	Высококопийный
2	2335	Исходный бесплазмидный штамм	1.15 ± 0.22	0.5	Бесплазмидный
3	10-15	ПС ⁻	0.65 ± 0.05	0.5	Низкокопийный
4	10-22	ПС ⁻	1.1 ± 0.17	0.5	Низкокопийный
5	10-101	ПС ⁻	1.07 ± 0.11	0.5	Низкокопийный
6	10-201	ПС ⁺	0.73 ± 0.1	50	Среднекопийный
7	10-183	ПС ⁺	0.82 ± 0.09	5	Низкокопийный
8	10-207	ГС ⁺	0.87 ± 0.13	50	Среднекопийный
9	10-48	ГС ⁻	0.67 ± 0.08	50	Среднекопийный
10	10-54	ГС ⁻	1.21 ± 0.15	50	Высококопийный

* ПС⁻ – полная среда без канамицина, ПС⁺ – полная среда с канамицином, ГС⁻ – полная среда, разбавленная в 10 раз, без канамицина, ГС⁺ – полная среда, разбавленная в 10 раз, с канамицином.

появление низкокопийных клеток (менее 20% копий плазмиды по отношению к контролю). Повидимому, у вегетативных клеток, образующихся из спор при прорастании в условиях микрокосмов, будет также наблюдаться тенденция к снижению копииности рекомбинантной плазмиды.

Анализ вариантов *B. subtilis* 2335/105, полученных в ходе последовательных пассажей (около 300 генераций), показал, что голодная среда в большей степени, чем полная, способствовала сохранению копииности плазмиды и устойчивости к высоким концентрациям антибиотика. Наиболее ярко эти различия наблюдались при отсутствии селективного фактора в среде. Пока трудно предполагать, какой механизм способствует проявлению такой гетерогенности в популяции плазмидсодержащего штамма. Это может быть обусловлено тем, что в условиях голодной среды снижается активность биосинтетических процессов и происходит изменение регуляции отдельных оперонов, что способствует сохранению плазмиды [11]. Именно в условиях голодной среды без селективного фактора отмечено появление единичных вариантов, характеризующихся повышенным максимальным приростом биомассы, исходной копииностью плазмиды и устойчивостью к высоким концентрациям канамицина. Однако не следует ожидать доминирования таких клеток в популяции рекомбинантного штамма, так как при его длительном пребывании (4 мес) в микрокосмах подобные варианты не были обнаружены.

С точки зрения экологической безопасности препарата, созданного на основе *B. subtilis*, следует иметь в виду вероятность длительного сохранения в природных экосистемах клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду в виде спор (копийность плазмиды сохраняется достаточно высокой) или в форме вегетативных клеток (сниженный уровень экспрессии плазмидных генов).

Работа выполнена при поддержке гранта Красноярского фонда науки 8F0006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 288 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
3. Попова Л.Ю., Каргатова Т.В., Максимова Е.Е., Белявская В.А. Адаптация штамма *Bacillus subtilis*, содержащего рекомбинантную плазмиду с геном интерферона- $\alpha 2$ человека, к разным условиям существования // Микробиология. 1997. Т. 66. № 6. С. 761–766.
4. Смирнов В.В., Белявская В.А., Сорокулова И.Б. Штамм *Bacillus subtilis* – антивирусный и антимикробный агент: Патент РФ 1839459, заявка 4767350/13/129532.
5. Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Жасычева В.И., Смирнов В.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования для медицины и ветеринарии // Вести РАМЖ. 1997. № 3. С. 46–49.

6. Филин В.А., Харечко А.Т., Поберий И.А. и др. Выбор показателей характеризующих рост и спорообразование антагонистически активных бактерий *Bacillus subtilis* 3 и *Bacillus licheniformis* 31 в глубинных культурах // Биотехнология. 1998. № 1. С. 73–78.
7. Angle J.S., Levin M.A., Gagliardi J.V., McIntosh M.S. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) in soil // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 8. P. 2835–2839.
8. Awong J., Bitton G., Chaudhry G.R. Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 4. P. 977–983.
9. Krimsky Sh., Wrubel P.P., Naess I.G. et al. Standardized microcosms in microbial risk assessment // BioScience. 1995. V. 45. № 9. P. 590–599.
10. Miller J.H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor, 1972. 450 p.
11. Postgate J. Microbial way of death // New Sci. 1989. № 1665. P. 43–47.

Population Heterogeneity of Plasmid-bearing and Plasmid-Free *Bacillus subtilis* Strains under Different Environmental Conditions

T. Yu. Krylova, L. Yu. Popova, N. S. Pechurkin, T. A. Kashperova, and V. A. Belyavskaya

Institute of Biophysics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia¹

Abstract—The population heterogeneity of recombinant and plasmid-free *Bacillus subtilis* strains introduced into aquatic microcosms was studied. After introduction, the population of the plasmid-free strain *B. subtilis* 2335 in microcosms has long been represented by both vegetative cells and spores, whereas, already ten days after introduction, the population of the recombinant strain *B. subtilis* 2335/105 (Km^rInf⁺) was represented only by spores. The number of plasmid copies in the spore isolates of the recombinant strain was the same as before introduction, but the plasmid abundance in the vegetative isolates of this strain decreased. The isolates of *B. subtilis* 2335/105 obtained from microcosms and the variants of this strain obtained by ten successive subcultures on M9 and 0.1 × M9 media with and without kanamycin (Km) differed in the number of plasmid copies, Km resistance, and maximum biomass yield during batch cultivation. Irrespective of the presence of Km, more than 50% of the variants subcultured on M9 medium showed reduced plasmid abundance. At the same time, about 70% of the variants subcultured on 0.1 × M9 medium with Km and 90% of the variants subcultured on the same medium without Km retained the initial number of plasmid copies. The variants subcultured on media with Km retained the initial biomass level. In more than 70% of the variants isolated from media without Km, the biomass yield increased.

Key words: *Bacillus subtilis*, recombinant plasmid, microcosm, introduction, heterogeneity.

¹ E-mail for correspondence: lubg@post.krascience.rssi.ru