



УДК 576.851.155

## ПОЛУЧЕНИЕ СФЕРОПЛАСТОВ У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ, КЛЕВЕРА, ФАСОЛИ И ГОРОХА

О. В. Баженова, И. Л. Потокши, Б. В. Симаров

**Введение.** Протопласты бактерий широко используются в микробиологии для решения фундаментальных и прикладных проблем. Они являются удобным объектом для изучения строения и функционирования оболочки, выяснения ее роли в синтезе и экскреции биологически активных веществ [1]. С использованием прото- и сферопластов можно значительно повысить эффективность внутри- и межвидовой гибридизации бактерий [2, 3].

Особенно актуальна разработка методов получения сферопластов у микроорганизмов, используемых в практической деятельности человека. К таким микроорганизмам относятся, в частности, клубеньковые бактерии (*Rhizobium*), активно фиксирующие молекулярный азот атмосферы в симбиозе с бобовыми растениями. Несмотря на то, что отдельные авторы наблюдали образование сферопластов у ризобий [4—6], методы их получения, позволяющие широко использовать сферопласты в генетических и биохимических исследованиях, отсутствуют. Ранее нами была разработана методика получения прото- и сферопластов у клубеньковых бактерий люцерны [7]. К сожалению, она оказалась малоприменимой для получения сферопластов у других видов клубеньковых бактерий.

Данная работа посвящена разработке универсального метода, позволяющего получать сферопласты у различных видов быстрорастущих клубеньковых бактерий, что открывает возможности для проведения межвидовой гибридизации этих бактерий.

**Материалы и методы.** Штаммы. В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов из коллекции ВНИИ с.-х. микробиологии: прототрофные штаммы клубеньковых бактерий люцерны — СХМ1, 425а, L5-30; клевера — 348а; фасоли — 682, 695, 696; гороха — 250а, а также ауксотрофные мутанты клубеньковых бактерий фасоли — 682-2 (*met106 trp112*), 682-4 (*met106 trp112, str108*), любезно предоставленные К. М. Злотниковым (Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР), и гороха — 897 (*trp12 phe1 str37*) из коллекции д-ра Дж. Бернджера (Англия).

**Среды.** Бактерии выращивали на обогащенной среде ТУ следующего состава (в г/л): бактотриптон — 5, дрожжевой экстракт — 3 («Difco», США),  $\text{CaCl}_2$  — 0,9, рН 7,2 [8]. Регенерацию оболочки сферопластов проводили в слое 0,6 %-ного агара на среде 79 [9] с 0,4 М сорбитом.

Сферопласты клубеньковых бактерий получали под действием лизоцима и пенициллина. Для этого бактерии выращивали в жидкой среде ТУ без  $\text{CaCl}_2$  (или его количество было уменьшено до 0,09 г/л в зависимости от вида бактерий) с пенициллином при температуре 28 °С до оптической плотности 1,0, которую определяли на спектрофотометре «Спектромом-195» при длине волны 450 нм. Концентрация пенициллина в среде для *R. meliloti* составляла 1,0 ед/мл, а для *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli* — 0,1 ед/мл. Затем бактерии осаждали центрифугированием (15 мин, 4000 об/мин), и осадок ресуспендировали в среде для получения сферопластов. По составу она была аналогична среде с пенициллином, но содержала осмотический стабили-

затор — 0,5 М янтарно-кислый натрий и 0,5 мкг/мл лизоцима. Обработку клеток проводили 1—2 ч при температуре 37 °С и мягком покачивании на качалке. Изменение морфологии клеток в процессе образования сферопластов контролировали под фазово-контрастным и электронным микроскопами. Изучение ультраструктурной организации вегетативных клеток и сферопластов осуществляли на ультратонких срезах клеток по стандартной методике [7].

**Результаты и обсуждение.** Одним из способов получения сферопластов у грам-отрицательных бактерий является нарушение биосинтеза оболочки бактерий под действием ингибиторов и последующий лизис дефектной клеточной стенки лизоцимом [1]. В качестве ингибитора в нашей работе выбран пенициллин, который, как известно, препятствует нормальному биосинтезу пептидогликана — компонента, придающего основную прочность бактериальной оболочке [10]. Кроме того, показано, что на процесс образования сферопластов у грам-отрицательных бактерий [11] и морфологию клеток ризобий [12] оказывает существенное влияние концентрация дивалентных катионов в среде, в частности кальция. Поэтому свою работу мы начали с изучения действия различных концентраций пенициллина и  $\text{CaCl}_2$  на рост в жидкой среде и морфологию клеток различных видов быстрорастущих клубеньковых бактерий. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 1. Было установлено, что форма клеток ризобий зависит от концентрации в среде как пенициллина, так и  $\text{CaCl}_2$ . Добавление в среду для выращивания клеток 0,09 г/л  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 ед/мл пенициллина вызывало у клубеньковых бактерий клевера, фасоли и гороха образование форм «несбалансированного роста», т. е. клеток овальной или неправильной формы с нарушенным биосинтезом оболочки. При уменьшении концентрации  $\text{CaCl}_2$  в 10 раз форма клеток менялась в зависимости от снижения концентрации пенициллина в среде (табл. 1).

Таблица 1

Характеристики формы клеток ризобий при выращивании их на среде, содержащей пенициллин и  $\text{CaCl}_2$

The morphology of the Rhizobium cells grown on the medium containing penicillin and  $\text{CaCl}_2$

Вид	Штамм	Концентрация в среде $\text{CaCl}_2$ , г/л								
		0			0,009			0,9		
		Концентрация пенициллина, ед/мл								
		0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
<i>R. meliloti</i>	CXM1	П	НР	НР	П	П	П	П	П	П
»	L5-30	П	П	НР	П	П	П	П	П	П
»	425a	П	НР	НР	П	П	П	П	П	П
<i>R. phaseoli</i>	682	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
»	682-2	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
»	682-4	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
»	695	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
»	696	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
<i>R. trifolii</i>	348a	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
<i>R. leguminosarum</i>	250a	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—
»	897	—	—	—	НР	—	—	П	НР	—

Примечание. П—нормальный рост на среде, палочковидные клетки; НР—несбалансированный рост, клетки деформированы; (—)—отсутствие роста.

Клубеньковые бактерии люцерны оказались более устойчивыми к применяемому воздействию. В отличие от других видов ризобий они, во-первых, были способны к росту в среде без добавления  $\text{CaCl}_2$  и, во-вторых, нарушение биосинтеза оболочки у них происходило при более высокой концентрации пенициллина — 1,0 ед/мл. Таким образом, мы наблюдали различия в условиях образования форм «несбалансиро-

важного роста» между клубеньковыми бактериями люцерны, с одной стороны, и клубеньковыми бактериями клевера, фасоли и гороха, с другой.

Для выяснения характера изменений, происходящих в клетках клубеньковых бактерий при образовании морфологически атипичных форм,

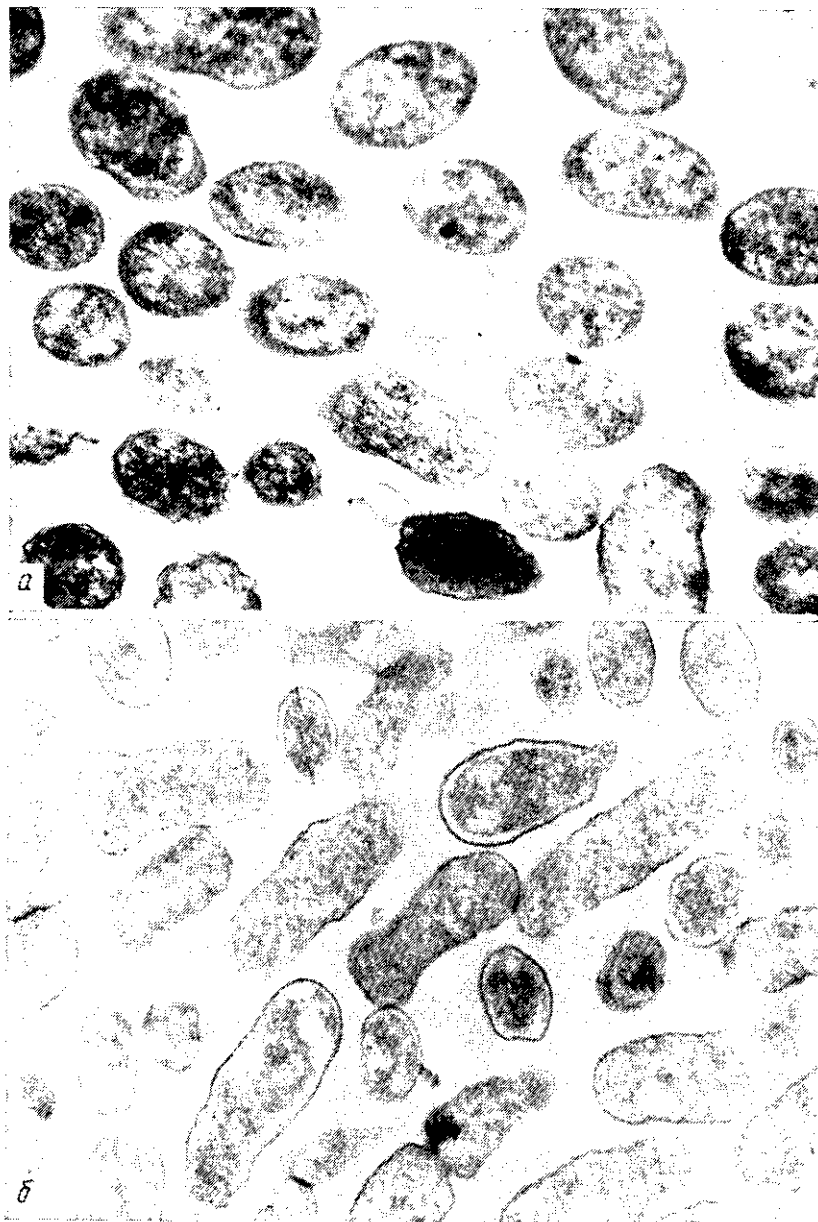


Рис. 1. Ультратонкие срезы вегетативных клеток клубеньковых бактерий люцерны, штамм CXM1 (а) и фасоли, штамм 682-2 (б). Ув. 15000

Fig. 1. Electron micrographs of thin sections of vegetative cells of *R. meliloti*, strain CXM1 (a) and *R. phaseoli*, strain 682-2 (b). Magnification 15000X

было проведено их цитологическое изучение до и после обработки пенициллином. На рис. 1 представлены ультратонкие срезы вегетативных клеток клубеньковых бактерий фасоли и люцерны, являющихся типичными палочковидными грам-отрицательными бактериями с мюгослойной клеточной стенкой.

После культивирования бактерий на среде с пенициллином и ограниченным количеством  $\text{CaCl}_2$  у них происходили значительные морфологические изменения (рис. 2). Оболочка клеток становится тоньше. Нарушение структуры пептидогликана приводит к отслоению наруж-

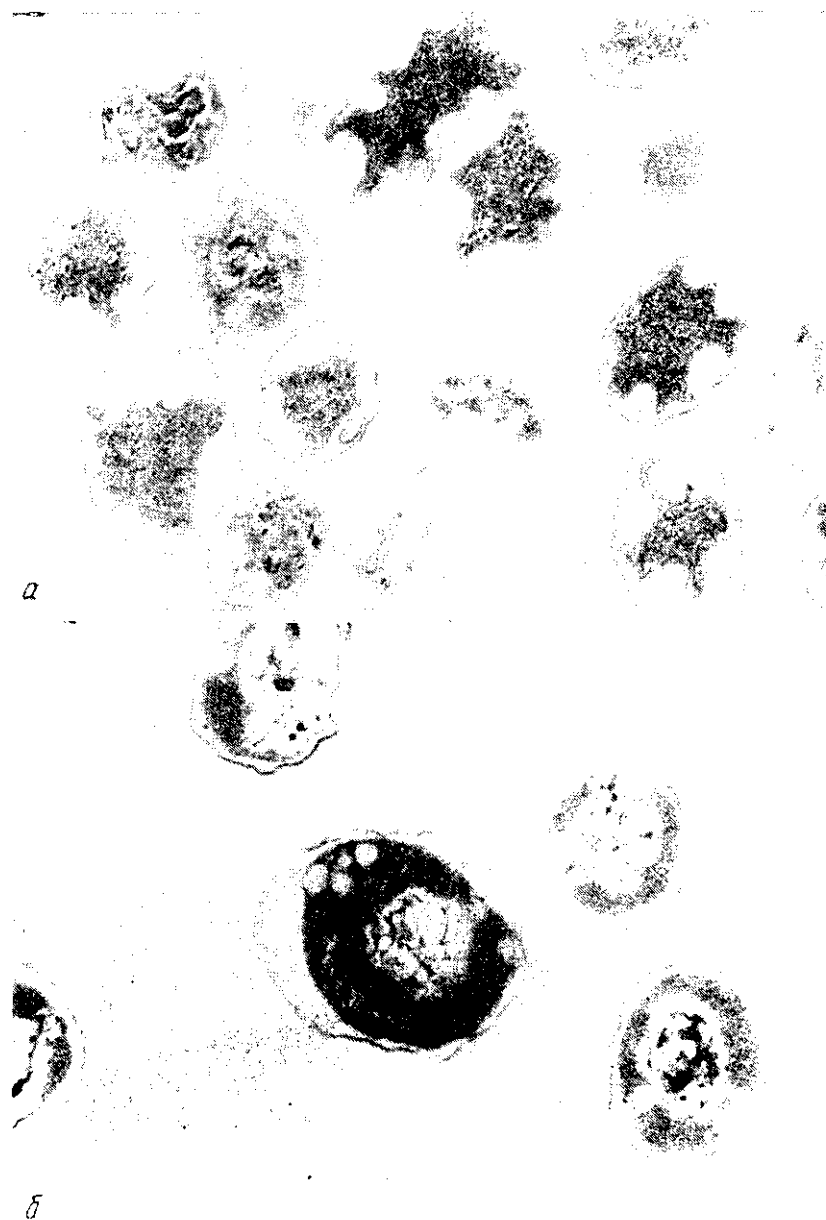


Рис. 2. Ультратонкие срезы вегетативных клеток клубеньковых бактерий люцерны, штамм CXM1 (а) и фасоли, штамм 682-2 (б), выращенных на среде с пенициллином и ограниченным количеством  $\text{CaCl}_2$ . Ув. 35000

Fig. 2. Electron micrographs of thin sections of vegetative cells of *R. meliloti*, strain CXM1 (a) and *R. phaseoli*, strain 682-2 (b) grown on the medium with penicillin and limited content of  $\text{CaCl}_2$ . Magnification 35 000X

ной мембраны от цитоплазматической, расширению периплазматического пространства и сжатию протоплазмы клеток. Большинство бактерий приобретает неправильную, часто сферическую форму.

Действие лизоцима на формы «несбалансированного роста» клубеньковых бактерий вызывает образование сферопластов. При этом сначала происходит локальный лизис оболочки бактерий и образова-

ние в ней брешей. Расширение периплазматического пространства приводит затем к отслоению оболочки от цитоплазматической мембраны и отделению ее от сферопластов. Сферопласты клубеньковых бактерий люцерны и фасоли представлены на рис. 3.



Рис. 3. Сферопласты клубеньковых бактерий люцерны, штамм СХМ1 (а) и фасоли, штамм 682-2 (б). Ультратонкие срезы. Ув. 90000  
Fig. 3. Electron micrographs of thin sections of spheroplasts of *R. meliloti*, strain СХМ1 (а) and *R. phaseoli*, strain 682-2 (б). Ultrathin sections. Magnification 90 000X

При детальном рассмотрении строения оболочки клеток, обработанных лизоцимом, было установлено, что большая часть из них — от 90 до 100 %, являлась сферопластами, т. е. сохраняла незначительные фрагменты оболочки. Доля протопластов среди них составляла не более 1—10 %.

Кроме морфологического анализа строения оболочки, образование сферопластов подтверждалось изучением осмотической чувствительнос-

Таблица 2

Эффективность регенерации сферопластов различных штаммов быстрорастущих клубеньковых бактерий

The effectiveness of spheroplast regeneration in different strains of fastgrowing *Rhizobia*

Вид	Штамм	Эффективность регенерации, %			
		1-й опыт	2-й опыт	3-й опыт	Среднее значение
<i>R. meliloti</i>	СХМ1	6,4	1,3	5,7	4,4±1,60
<i>R. phaseoli</i>	682	4,8	3,3	6,9	5,0±1,04
»	682-2	5,4	1,4	2,7	3,2±1,17
<i>R. trifolii</i>	348a	1,0	1,8	1,5	1,4±0,23
<i>R. leguminosarum</i>	250a	0,8	3,1	2,5	2,1±0,46
»	897	3,2	2,0	4,4	3,2±0,69

ти клеток. Бактерии, обработанные лизоцимом и пенициллином, после суспендирования в дистиллированной воде теряли жизнеспособность и не формировали колоний при высеве на агаризованные среды.

Для проведения генетических экспериментов со сферопластами необходимо было изучить их способность к восстановлению оболочки. Оказалось, что эффективность регенерации сферопластов составляла в среднем 1,4—5,0 % (табл. 2). Она была несколько ниже у клубеньковых бактерий клевера (штамм 348a) и гороха (штамм 250a). Отмечена большая изменчивость в способности сферопластов восстанавливать свою оболочку в различных опытах.

Известно, что эффективность регенерации сферопластов у грам-отрицательных бактерий зависит от способа их получения и, как правило, составляет 1—10 % [1]. Часто сферопласты получают при ферментативном лизисе оболочки лизоцимом и ЭДТА [1, 4, 7, 13], так как этот метод обеспечивает наиболее полное удаление бактериальной оболочки [14, 15]. При его использовании эффективность регенерации сферопластов не превышает 1 % [7, 14]. Результаты наших исследований, выполненных на различных видах быстрорастущих клубеньковых бактерий, подтверждают вывод о том, что сферопласты, полученные с помощью пенициллина [1, 11, 13], обладают более высокой способностью восстанавливать оболочку, чем сферопласты, полученные под действием ЭДТА. Как известно, ЭДТА может экстрагировать дивалентные катионы из цитоплазматической мембраны, окружающей сферопласты [16], и понижать жизнеспособность бактерий [17].

Таким образом, в результате проделанной работы нам удалось разработать универсальный метод получения сферопластов у быстрорастущих видов клубеньковых бактерий. Его использование позволяет приступить к проведению как внутри-, так и межвидовой гибридизации бактерий рода *Rhizobium*.

#### OBTAINING OF SPHEROPLASTS IN NODULE BACTERIA OF LUCERNE, CLOVER, BEAN AND PEA

O. V. Bazhenova, I. L. Potokin, B. V. Simarov

All-Union Research Institute of Farm Microbiology, Leningrad, Pushkin

#### Summary

A simple universal procedure has been developed for obtaining stable spheroplasts from the fast-growing species of *Rhizobium* (*R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*). Spheroplasts were prepared by culturing cells in the osmotically stable medium with a decreased content of calcium cations in the presence of penicillin, followed by treatment with lysozyme. The electron-microscopic analysis of the process of spheroplasts formation was performed. The average effectiveness of the cell wall regeneration is 1.4-5.0 %.

1. Яковенко К. Н., Троицкий Н. А. Протопласты микроорганизмов.— Минск: Наука и техника, 1985.—159 с.
2. Chang S., Cohen S. N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA // Mol. and Gen. Genet.—1979.—168, N 1.— P. 111—115.
3. Akamatsu T., Sekiguchi J. Selection methods in bacilli for recombinants and transformants of intra- and interspecific fused protoplasts // Arch. Microbiol.—1983.—134, N 4.— P. 303—308.
4. Staniewski R., Rugala A. Frequency of infection and efficiency of transfection of *Rhizobium meliloti* cells and spheroplasts // Acta microbiol. pol. A.—1975.— N 3.— P. 151—160.
5. Berry J., Atherley A. G. Spheroplasts of *Rhizobium japonicum* // Can. J. Microbiol.—1984.—30, N 2.— P. 415—419.
6. Child J. J., Sietsma J. N. Spheroplasts from *Rhizobium japonicum* // Plant Sci. Lett.—1975.—4, N 3.— P. 267—271.
7. Получение протопластов у клубеньковых бактерий люцерны *Rhizobium meliloti* / О. В. Филатова, Б. В. Симаров, В. В. Кучко и др. // Изв. АН СССР.—1982.— № 1.— P. 140—142.
8. DNA sequences homology in *Rhizobium meliloti* plasmids / L. Jouanin, P. de Lajudie, S. Bazetoux, T. Huguet // Mol. and Gen. Genet.—1981.—182, N 2.— P. 189—195.
9. Allen O. N. Experiments in soil bacteriology.—Minneapolis: Burgess publ. co., 1959.—59 p.
10. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия.— М.: Мир, 1984.— 238 с.
11. Максимова Н. П., Желдакова Р. А., Фомичев Ю. К. Получение протопластоподобных структур *Pseudomonas putida* и их реверсия в бактериальные формы // Микробиология.—1982.—51, № 4.— С. 628—631.
12. Bergersen F. J. The growth of *Rhizobium* on synthetic media // Austr. J. Biol. Sci.—1961.—14, N 1.— P. 349—360.
13. McQuillen K. Bacterial protoplasts // The Bacteria.— New York: Acad. press, 1981.— Vol. 1.— P. 249—360.
14. Ценин А. Н., Каримова Г. А., Рыбчин В. Н. Рекомбинация при слиянии протопластов *E. coli* // Докл. АН СССР.— 1978.—243, № 4.— С. 1066—1068.
15. Weiss R. L. Protoplast formation in *Escherichia coli* strains // J. Bacteriol.—1976.—128, N 2.— P. 668—670.
16. Leive L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment *Escherichia coli* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1965.—21, N 1.— P. 290—296.
17. Goldschmidt M. C., Wyss O. Chelation effects on *Azotobacter* cells and cysts // J. Bacteriol.—1966.—91, N 1.— P. 120—124.

ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград

Получено 27.08.86

УДК 575.24

## ОТСУТСТВИЕ У ПРИРОДНЫХ САХАРОМИЦЕТОВ Ту ЭЛЕМЕНТОВ И 2 мкм ДНК

С. А. Булат

**Введение.** В геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* присутствуют локализованные в хромосомах перемещающиеся элементы — *Tu* транспозоны [1—3] и экстрахромосомный элемент специфической структуры — 2 мкм плазида [4, 5]. Первая группа элементов (транспозоны) является, по-видимому, обязательной компонентой генома всякой эукариотической клетки, вторая же — 2 мкм ДНК, может рассматриваться как элемент, специфичный для дрожжей [4—8]. Поскольку биологическая роль этих элементов в дрожжах остается нераскрытой, несмотря на интенсивные исследования, мы будем называть их крипточескими генетическими элементами дрожжей.

Для решения проблемы биологической значимости крипточеских генетических элементов представляется важным дополнить молекулярно-генетическое их изучение в дрожжах *S. cerevisiae* филогенетическим и экологическим аспектами, т. е. расширить круг организмов — объектов исследования с учетом их родства и биологических связей и использовать метод трансгенеза элементов. В соответствии с этим планом нами начата работа по изучению распространения известных крипточе-