

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ *

К. В. Квитко

Кафедра микробиологии С.-Петербургского государственного университета

Genetical control of microbial resistance to factors of external media

К. V. Kvitko

Department of Microbiology St. Petersburg State University

The article contains a discussion of mechanisms of forming and persistence of resistance to external media factors of microorganisms. main trait of this populations — they are heterogeneous. This heterogeneity of microbial populations is result of joint action: mutation pressure (convariant genome reduplication in huge populations of microorganisms), plasmids exchange, sharp changes in populations scales, and different forms of selection. An exception: the unique uniformity of isoenzyme spectrums, surface antigen specificity and virus sensitivity was found for two groups of zoochlorellas, isolated from Northern and Southern clones of *Paramecium bursaria*, what one can explain as results of the exclusive stability of biotic factors (external media) in case of endosymbionts. In forming the biotechnology programs is important to understand the variability mechanisms in microbial populations, as approved by nature

Литература, посвященная генетическому контролю устойчивости микроорганизмов к факторам среды, необозрима. Поэтому здесь я попытаюсь рассмотреть лишь один аспект проблемы — как возникает и сохраняется эта устойчивость в условиях антропогенного загрязнения.

Определим вначале, что такое микроорганизмы? Чаще всего имеются в виду бактерии, а термин «бактериология» считают синонимом «микробиологии». В последнее время начали говорить о «протистах», или «протоктистах», объединяя микроорганизмы и протозоа [18].

Традиционное для меня деление протистов на группы позволяет относить к микроорганизмам, кроме бактерий, еще микроскопические грибы и водоросли, ибо их объединяет существенная особенность размножения — оно в клоновых культурах практически не связано с половым процессом.

Модель популяции. Особи в микробных популяциях (отдельные клетки) делятся каждый час (через несколько часов, раз в сутки и реже) кратно 2, 4, 8, 16 числу потомков, и после десятка циклов удвоений число особей возрастает тысячекратно. На богатом органическом субстрате бактериальная клетка за сутки может осуществить 30–40 циклов удвоений, т. е. даст миллиард или триллион потомков, клетка дрожжей даст то же потомство за двое суток. Соответственно при средней скорости мутаций ($a = 1$ на 10 млн делений клетки) по любому из генов в таком клоновом потомстве может появиться 100–100 000 новых мутантных алелей. Тем самым давление мутаций в результате «конвариантной ре-

* Работа поддержана грантом РФФИ № 98–04–49842.
© К. В. Квитко, 1999

дупликации» будет подставлять под действие отбора любое разнообразие аллелей отдельных генов, образуя первичный резерв мутационного разнообразия, а позднее в популяции, состоящей из таких субклонов, появятся сочетания (комбинации) мутаций.

Наличие мобильных генетических элементов (нестабильность генома, по Роману Бешминовичу Хесину) увеличивает популяционную изменчивость в клонах микроорганизмов [10] и позволяет описывать в терминах популяционной генетики изменчивость в череде генераций даже у агамных микроорганизмов [6]. Мобильные генетические элементы бактерий и эукариотических микробов устроены по сходному плану и осуществляют аналогичные функции: повышение частот мутаций в отдельных участках генома и горизонтальный перенос генов в популяции и внутри ценоза. До определенной степени это компенсирует уменьшение вклада полового процесса в поддержание популяционной изменчивости у микроорганизмов.

Моделью клона после G -удвоений может служить уравнение, записанное в логарифмах по основанию 2: $\log N_t = \log N_0 + G$, что соответствует делению клеток на две особи в каждом поколении. Отбор в последовательных генерациях микроорганизмов, достигших численности (N_t) большей, чем величина, обратная частоте мутаций (a), т. е. при $N_t \gg 1/a$, оценивает фитнес $[S$ — селективная ценность каждой мутации, вычисляемая как соотношение времени удвоения клеток мутанта T_m по отношению к T_n исходного клона, $Sm = (T_n/T_m) - 1$]: снижая частоту мутантов ($R_t = M/N$) с летальными и сублетальными ($Sm < 0$) до частоты мутирования ($R_t = a/2$); накапливая нейтральные ($Sm = 0$) мутанты ($R_t = G_i \times a/2$) как сумму частот возникших в последовательных поколениях (G) мутантных клонов и увеличивая через G_i -поколений в геометрической прогрессии исходную частоту (R_0) адаптивных мутантов ($Sm > 0$) [$\log R_t = \log R_0 + G_i Sm$]. С учетом вновь возникающих мутаций модель приобретает вид $R_t = R_0 2^{GS} + a(2^{GS} - 1)/(2^{S+1} - 2)$, предсказывая вытеснение исходной аллели, замену ее мутантной, с большей фитнесом, уже через десятки удвоений.

Периодический отбор и накопление мутаций. В реальных ситуациях смена состава микробной популяции есть результат сочетанного действия микроэволюционных факторов: давления мутаций (конвариантная редупликация), нестабильности генома, волн жизни (спады и подъемы численности в результате действия факторов среды) и отбора.

В модельных популяциях на проточных культурах эта смена состава приводит к периодическому отбору — очистке от нейтральных и летальных мутантов, в результате появления субклона с лучшей фитнесом на основе исходного генотипа (клона с максимальной численностью и соответственно наибольшими шансами на появление в нем мутанта с $Sm > 0$).

Периодический отбор позволяет управлять составом проточных клоновых культур микроорганизмов [3, 8, 9], сохранять высокую степень гомогенности потомства исходной культуры. Это возможно при условиях, оптимальных для культивируемых штаммов. Смена условий приводит к смене состава популяции, клон нового генотипа вытесняет исходный клон. Но иногда в таких модельных популяциях возникает стойкая гетерогенность, основанная или на уменьшении скорости выноса клеток мутанта в результате оседания их на стенках и в пене ферментера, или в результате формирования симбиоза мутанта и исходной формы, когда мутант использует продукты метаболизма своего родителя и, тем самым, не только избавляет родительский штамм от аутоингибирования его собственными отходами, но и сам он зависит от продуктов, накапливаемых родительским штаммом.

В переменных условиях фитнес выше у клонов с генами мутаторами. Суммирование эффектов фитнеса мутаций не происходит, так как всегда $S_0 < S_1, S_1 < S_2, S_2 < S_3$, но при этом часто $S_0 > S_2, S_1 > S_3$; т. е. процесс отбора, приведя к некоей, оптимальной для данных условий приспособленности, далее идет по кругу, сохраняя генотип исходного

клона с минимальными отклонениями. Указанные выше особенности популяционной динамики можно принять для описания активно делящихся поколений в ценозах. Эволюция микроорганизмов предопределила огромный запас адаптаций, ошествленных в виде кластеров генов в гаплондном геноме и в его факультативной части, в плазмидах, комплексы генов которых могут быть представлены в клетках в разном количестве (от 0 до сотен копий) и выявляются нами как преадаптации, хотя это результат мутаций, ступенчатого отбора и последующей рекомбинации.

Манипуляция этими факторами микроэволюции может осуществить любую перестройку генома микроорганизмов, как это, например, сделал Б. Холл [13]. Штамм кишечной палочки с делецией *lacZ* — ключевого гена лактозного оперона был практически неспособен расти на средах с этим сахаром. Но многократные пассажи этого штамма на таких средах позволили получить мутант, у которого совсем другой ген (*ebgA*) в результате мутации *ebgA*⁻ стал замещать функцию гена *lacZ*, но активность его составляла 0,05% от *lacZ*. Тесно сцепленный с этой мутацией ген *ebgR* позволял синтез только 3–5 молекул *ebg*-энзима на клетку, но на средах с аналогами лактозы удалось отобрать мутацию этого гена *ebgR*⁻, которая устранила репрессию и увеличила в 2000 раз синтез энзима *ebgA*⁻. Другие мутации гена репрессора позволяли увеличить индуцируемую лактозой продукцию энзима в 1000 раз, что также было вполне достаточно для роста на лактозе. Так ступенчатым отбором в 2–3 шага были созданы аналоги дикого типа — генотипы *ebgA*⁻ *ebgR*⁻, компенсирующие делецию гена *lacZ* [13].

Вторая важная для популяционной генетики особенность микроорганизмов — большой диапазон длительности индивидуальной жизни, от доли часа при активном делении до миллионов лет благодаря анабиозу [5]. Последнее обстоятельство приводит к тому, что ледники в полярных областях и в горах, грунт в области вечной мерзлоты являются тем «Ноевым Ковчегом», который хранит микробный потенциал суши и моря в виде законсервированной во льду микробной пыли и может обеспечивать непрерывность популяций в глобальном масштабе на тысячи и миллионы поколений, времена сопоставимые со сроками эволюции видов и более крупных таксонов. Более краткие периоды покоя — сохранение жизнеспособности неделяющимися клетками способствуют переживанию в неблагоприятные для размножения периоды всей исходной гетерогенной популяции.

Факторы среды. По В. В. Ковальскому [7], эволюцию среды следует подразделить на стадии: протобиосфера, биосфера, ноосфера. Прокариотические микроорганизмы, например синезеленые водоросли (цианобактерии), известны палеоботаникам из осадков и строматолитов протобиосферного периода, внешне они мало изменились, т. е. творческая роль отбора проявилась прежде всего в суммировании полезных мутаций в пределах достигнутого уровня организации. Г. А. Заварзин считает [4, с. 178], что бактерии действительно персистентны, т. е. на протяжении рассматриваемого периода, с 3,5 млрд лет назад, их морфологическая эволюция выражена слабо. Многообразие бактерий формировалось путем обмена относительно небольшими участками генома, несущими экологически важные признаки.

Адаптация к физическим и химическим факторам у микроорганизмов, вероятно, происходила на этапе протобиосферы, когда уровни мутагенных эффектов (ультрафиолет, ионизирующие излучения, тяжелые металлы) были высоки и еще не существовало буферных компонент современной среды (например, озонового слоя, защищающего от УФ, гумуссодержащей примеси в водах и гумуса почвы с его поглощающей тяжелые металлы функцией); когда началось увеличение концентрации кислорода до уровня, способствующего дыханию клетки. Видимо, в это время сложилась система защиты клетки от избыточной радиации, репарационные системы, сохраняющие отобранные ранее варианты аллел-

лей. Первичные ценозы создали биологическую компоненту факторов среды, определившую разделение функций и дифференцировку микроорганизмов в ценозах, направившую микроэволюцию таксонов прокариот на реализацию разнообразия, заложенного в системе их генотипа. Это явилось фактором, открывшим возможность появления гетеротрофных микроорганизмов; форм, использующих субстраты, накопленные фотосинтезирующими организмами. Симбиоз прокариотических микроорганизмов — это путь, приведший к возникновению и эволюции эукариотической клетки, формированию разнообразия эукариотических микробов, растений и животных.

Симбиотические взаимоотношения у эукариотических организмов остаются важным фактором канализации микроэволюции. Известны примеры эндосимбиоза фотосинтетиков и гетеротрофов, например симбиоз зоохлорелл и инфузории *Paramecium bursaria*, позволивший резко увеличить приспособленность партнеров к факторам среды и определивший космополитизм данного вида. Зоохлорелла (*Chlorella sp.*) — агамный организм, и под влиянием разнообразия физических условий должна была дать огромное разнообразие мутантных клонов. Но проанализированное нами множество штаммов зоохлорелл, изолированных из трех американских и трех европейских популяций *Paramecium bursaria* распадается как бы на два клона: Южный и Северный. Все Северные штаммы гибнут при 32 °С, а Южные размножаются [Квитко и др., неопубл.]. По белковым маркерам в каждой из этих групп найдено единообразие спектров семи изоферментов, сходство специфичности поверхностных антигенов и чувствительности к весьма разнообразным вирусам [17]. Из это-

Радиорезистентность штаммов *Chlorella*, изолированных из почв ВУРСА с различным уровнем загрязнения [по: 11, табл. 55, 56]

Радиоактивность почвы, 10 ⁶ расп. ⁹⁰ Sr ⁹⁰ Y/мин/кг	Число клонов	Выживаемость при облучении 30 кР			
		средняя	lim	ЛД50, кР	CV
Контроль, < 1	18	19,6±1,5	—	12,7	32,5
5 лет экспозиции:					
1-10	8	25,2±3,6	—	15,1	40,0
11-50	32	27,2±1,4	—	15,9	29,1
51-100	9	30,3±2,1	—	17,4	20,8
101-500	23	33,5±1,5	—	19,1	21,5
501-1000	18	29,9±2,1	—	17,1	29,8
>1000	14	27,0±2,5	—	16,3	34,6
6 лет экспозиции:					
10-50	17	36,0±1,7	—	20,1	19,5
51-100	26	32,9±2,3	—	18,7	35,6
101-500	19	29,4±2,0	—	17,0	29,4
501-1000	5	30,1±4,5	—	17,3	33,4
>1000	3	25,8±8,1	—	15,4	54,4
11 лет экспозиции:					
<1	23	12,2±2,2	0,5-35,8	—	85
5-10	21	16,1±2,6	1,2-35,0	—	69
11-50	25	18,4±2,3	1,3-39,9	—	62
51-100	21	20,3±2,6	6,9-40,2	—	52
101-500	17	23,1±3,0	9,2-42,0	—	52
>500	17	30,1±3,4	6,7-58,4	—	45

го примера следует, что биотический фактор (симбиоз) — эффективный фактор, сохраняющий единообразие клоновых популяций зоохлорелл.

Изменение адаптации популяций свободноживущих микроорганизмов к физическим факторам было исследовано при изучении последствий недавних аварий. В. А. Шевченко и соавторами [11] приведен пример смены состава почвенных микропопуляций *Chlorella*, вызванной радиационным загрязнением в Зауралье, в районе так называемого ВУРСА (Восточно-Уральский радиационный след кыштымской аварии в 1957 г.). Начиная с 1962 г. в этих популяциях изолировали клоны водорослей и затем определяли их радиорезистентность. В таблице приведено сопоставление средних величин этого признака для популяций после 5, 6 и 11 лет постоянного воздействия разных по уровню доз бета-излучения. Обращает на себя внимание увеличение к 5–6-му году радиорезистентности форм хлореллы по всем уровням радиоактивности среды. Характерен максимум устойчивости изолятов из средних по уровню загрязнения участков почв (75–250 млн распадов в мин/кг на 5-й год), одновременно там снижается изменчивость (CV , %). При больших дозах средний уровень устойчивости снижается, а CV признака увеличивается, причем после 6 лет экспозиции более четко видно действие избыточных доз радиации, увеличивающих генетический груз. Через 11 лет, когда общий уровень загрязненности понизился, соответственно снизился и средний уровень радиорезистентности, но размах изменчивости отдельных клонов был еще высок. CV признака радиорезистентности в 2–3 раза выше спустя 11 лет, хотя и снижается при максимальных дозах с 85 до 52–45%.

Адаптация к антибиотикам. Одним из хорошо изученных примеров адаптации микроорганизмов к биотическим факторам является устойчивость к антибиотикам [1, 16], в том числе особо опасных микробов, инфекция которыми возможна как в госпиталях, так и на фермах. Универсальным механизмом этой адаптации явилось распространение R-плазмид, передача их осуществляется как внутрипопуляционное изменение, так и в форме межвидового и межродового горизонтального переноса.

Можно ли принять, что эта вспышка формообразования — результат возникновения новых генетических элементов (плазмид) в ответ на антибиотикотерапию? Были обследованы коллекции патогенных микроорганизмов, собираемые в Институте Пастера с прошлого века. Оказалось, что плазмиды в штаммах, собранных до «эпохи антибиотикотерапии», столь же часты, как и у нынешних изолятов, но не несут кластеров генов устойчивости к антибиотикам. Откуда появились эти кластеры? Ответ на этот вопрос дан в работе Д. Хопвуда [14]. Генетический контроль биосинтеза антибиотиков у модельного штамма АЗ(2) *Streptomyces coelicolor* и у ряда производственных штаммов имеет общие черты: гены эти организованы в кластеры, последние состоят из структурных и регуляторных генов, выполняющих две функции, — биосинтез антибиотика и детерминацию резистентности клетки, продуцирующей его. Возможен перенос кластеров и как следствие — образование гибридных антибиотиков.

Биологический смысл продукции антибиотиков актиномицетами можно объяснить следующим образом: на стадии вегетативного роста колонии накапливается большая биомасса в виде мицелия, периферия которого затем автолизирована и используется для формирования пропагул в виде спор. Для охраны этих запасов нужны антибиотики — продуцируемые колонией вторичные метаболиты; одновременно с синтезом продукта осуществляется и защита продуцента, видимо, гены резистентности возникли давно, одновременно с генами синтеза антибиотика. Как правило, кластеры эти локализованы в хромосоме, не в плаزمиде, дальнейшее их перемещение — работа мобильных генетических элементов. Кластеры генов биосинтеза антибиотиков сходны с генами биосинтеза поликетидов, причем черты сходства этих генов находят не только в геноме актиномицетов, но и в геномах

мицелиальных грибов, дрожжей, растений и животных. Д. Хопвуд и Д. Шерман предполагают [15], что гены биосинтеза поликетидов стали прародителями большой группы генов биосинтеза вторичных метаболитов.

Ноосфера или антропогенный принцип? Ноосфера — этап эволюции, начавшийся с момента, когда человек разумный (*Homo sapiens*) стал в своих интересах менять окружающую среду, биосферу, причем выгодным для некоего индивида или сообщества, но не самым разумным для биосферы образом, по Н. В. Глотову так называемый антропоцентричный принцип [2].

Антропоцентричный принцип преобразования биосферы предопределяет ситуацию локального обеднения микрофлоры (специализацию ее) из-за монокультуры высших растений на производственных площадях, определяемой соображениями «экономии» механизированного труда и энергии; увеличения доз вредных химических и физических факторов в результате промышленной деятельности и рекреационной активности. Ситуация в какой-то мере напоминает ранние этапы формирования биосферы, в первую очередь по степени упрощения ценозов. Не случайно в водоемах сейчас наблюдается цветение — массовое размножение синезеленых водорослей, их преадаптация к загрязнениям позволяет им выжить в условиях, губительных для большинства микроорганизмов.

Наиболее поразительный факт такого массового размножения цианобактерий описан недавно микробиологами в Кувейте. Гибель прибрежных ценозов в Арабском Заливе после войны с Ираком была спровоцирована разлитием в море нефти, прибитой затем к берегу и покрывшей прибрежный песок и скалы слоем до 20 кг/м². Через год такие отравленные нефтью прибрежные полосы залива в Кувейте и в Саудовской Аравии покрылись матами синезеленых водорослей, до 5 кг биомассы на квадратный метр прибрежной полосы [20]. Анализ таких матов выявил, что это сложный ценоз, нитчатые синезеленые водоросли составляют основную часть биомассы; на поверхности этих нитей, в слизи ими выделяемой содержатся примеси весьма активных в разрушении нефтепродуктов бактерий *Rhodococcus*, актиномицеты и иные гетеротрофы, каждый из них способен разлагать «свои» фракции нефтепродуктов.

Для составляющих большую часть этих матов клеток нитчатых цианобактерий родов *Microcoleus* и *Phormidium* авторы доказали способность усваивать нефтепродукты и поставлять кислород для нефтеразрушающих гетеротрофов [12]. Подобный ценоз был впервые описан ими в микробиологической литературе. Наши попытки найти сходные ценозы в нефтезагрязненных водах и почвах подтвердили необычную устойчивость к нефти ряда цианобактерий и эукариотических водорослей. Их размножение под мазутной пленкой существенно ускоряется в искусственной ассоциации с алканотрофными бактериями [19].

Могут ли водоросли в чистых культурах окислять углеводороды, еще предстоит выяснить, для цианобактерий принципиально не исключено наличие в их геноме плазмид, определяющих такие способности.

Подведем итог нашего анализа примеров автоселекции микробов в условиях интенсифицированного давления мутаций и направленного отбора, сохраняющего лишь резистентные клоны. Популяция даже у агамной водоросли адаптируется, сохраняя при этом большое разнообразие субклонов, ослабление давления отбора способствует возврату к исходному состоянию. Симбиоз позволяет резко снизить давление внешних факторов, решающим для эндосимбионта является стабильность биотической среды. Гонка «Общество и микроорганизмы» будет проиграна нами, выход лишь в максимальном приближении к биосферным закономерностям, заложенном в постулате: биотехнология — это максимальное приближение к популяционным процессам, это отказ от «покорения природы» при дос-

тижении любых целей, в том числе и в осуществлении программы — накормить человечество.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брода П. Плазмиды. М., 1982. 224 с.
2. Глотов И. В. От антропоцентризма к биосферному мышлению // ВЕЧЕ. 1996. Вып. 6. С. 182–190.
3. Гуревич Ю. Л. Устойчивость и регуляция размножения в микробных популяциях. Новосибирск, 1984. 161 с.
4. Заварзин Г. А. Бактерии и состав атмосферы. М., 1984. 199 с.
5. Звягинцев Д. Г. Микроорганизмы в вечной мерзлоте // Успехи микробиологии. Вып. 25. 1992. С. 3–27.
6. Квитко К. В. Относительная роль мутаций и отбора в микробных популяциях // Успехи современной генетики. 1974. Вып. 5. С. 101–113.
7. Ковальский В. В. Геохимическая экология и ее эволюционные направления // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1963. № 6. С. 830–851.
8. Печуркин Н. С., Терсков И. А. Автоселекционные процессы в непрерывной культуре микроорганизмов. Новосибирск, 1973. 63 с.
9. Печуркин Н. С., Брильков А. В., Марченкова Т. В. Популяционные аспекты биотехнологии. Новосибирск, 1990. 173 с.
10. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1985. 472 с.
11. Шевченко В. А., Печуренков В. Л., Абрамов В. И. Радиационная генетика природных популяций. М., 1992. 221 с.
12. Al-Hasan R. H., Al-Bader D. A., Sorkhof N. A., Radwan S. S. Evidence for N-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coast of the Arabian gulf // Marine Biology. Vol. 130, № 3. 1998. С. 521–527.
13. Hall B.G. Evolution of a regulated operon in the laboratory // Genetics. 1982. Vol. 101. P. 335–344.
14. Hopwood D. A. Cloning and analysis of antibiotic biosynthetic genes in *Streptomyces* // Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of *Actinomyces* / Ed. by G Szabo et al. Budapest, 1986. P. 3–14.
15. Hopwood D. A., Sherman D. H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis // Annu. Rev. Genet. 1990. Vol. 24. P. 37–66.
16. Koch A. L. Evolution of Antibiotic Resistance Gene Function // Microb. Rev. Vol. 45, № 3. P. 355–378
17. Linz B., Linz A., Chernysheva A. V., Kvitko K. V. Correlation between virus-sensitivity and isoenzyme spectrum in symbiotic *Chlorella*-like algae // Protistology. 1999. Vol. 1, N 2. P. 80–85.
18. Margulis L. Introduction to Handbook of Protoctista. Boston, 1991. P. xi-xxiii.
19. Safonova E. Th., Dmitrieva I. A., Kvitko K. V. The interaction of algae with alcanotrophifi bacteria in black oil decomposition // Resources, Conservation and Recycling. 1999. Vol. 27. P. 193–201.
20. Sorkhof N., Al-Hasan R., Radwan S., Hoepner Th. Self-cleaning of the gulf // Nature (London). 1990. Vol. 359. P. 109.