



УДК 581.14.582.288.42

Т. А. РЯБУШКО, И. И. НОВИК

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТА И ИСХОДНОЙ КУЛЬТУРЫ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*

Среди продуцентов белка бактерии рода *Acinetobacter* наиболее перспективны. Они растут на средах с этанолом без витаминов и накапливают до 10 г/л [1], а в некоторых случаях до 24 г/л биомассы [2]. Для бактерий этого рода характерен более полноценный с физиологической точки зрения аминокислотный состав, чем у большинства бактерий других родов. Особенно ценным и редким качеством является высокое содержание метионина. Однако в микробиологическом производстве белка бактерии рода *Acinetobacter* используются еще в ограниченном размере [3], так как их некоторые производственно-ценные качества ниже потенциально возможных. Поэтому эти бактерии как продуценты белка нуждаются в улучшении, что может быть достигнуто с помощью методов генетики и селекции.

Целью данной работы является выделение и характеристика мутанта и исходной культуры *Acinetobacter calcoaceticus* по производственно-ценным признакам.

Материал и методика

В работе использован штамм *Acinetobacter calcoaceticus* 179/2 к-н, выделенный из сточных вод Минского завода медпрепаратов.

Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, необходимых для идентификации выделенной бактерии, проводили согласно методикам, описанным в [4].

Родовая и видовая принадлежность исследуемой культуры устанавливалась в соответствии с определителем Берги [5].

Питательную и селективную среду для выращивания культуры в периодическом процессе (на качалке 120 кач./мин) и чашках Петри готовили по прописи [6]. В качестве селектирующего агента использовали монофодуксунную кислоту (МИУ — специфический ингибитор алкогольдегидрогеназы), которую добавляли перед посевом к питательной среде в концентрации 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 %. Этанол вносили непосредственно перед посевом культуры в 1 % концентрации по объему.

Культуры инкубировали в колбах 250 мл с 40 мл жидкой питательной среды на качалках при 28 °С 24 ч. На чашках Петри посевы выдерживали в течение 5—7 дней при 28 °С.

Удельную скорость роста определяли, как описано в [7]. Для получения статистически достоверных данных при вычислении удельной скорости роста пользовались методом наименьших квадратов [8].

Рост культур регистрировали, измеряя оптическую плотность культуральной жидкости на ФЭК-56М ($E_{540}^{0,5\text{ см}}$). Концентрацию биомассы (X) определяли весовым методом [9], белок биомассы — методом Лоури [10]. Содержание белка в испытуемой пробе устанавливали по калибровочной кривой для бычьего альбумина и выражали в процентах от количества сухой биомассы.

Индукцию мутаций под действием УФ-лучей осуществляли общепринятым методом [11].

Параметры роста (удельную скорость роста μ , ч.⁻¹; продуктивность по биомассе P , г/л·ч; экономический коэффициент Y , %) рассчитывали по формулам, описанным в [12].

Результаты и их обсуждение

Для идентификации культуры, выделенной из сточных вод Минского завода медпрепаратов, проводилось исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств.

Изучаемая культура — грамотрицательная коккобацилла $1,0—1,5 \times 1,5—2,5$ мкм, располагающаяся парами или короткими цепочками по 3—4 клетки. На мясо-пептонном агаре образует непрозрачные бесцветные колонии с ровным краем, гладкой поверхностью и плотной консистенцией; при росте на мясо-пептонном бульоне (МПБ) вызывает помутнение с образованием пленки и осадка.

Изучение биохимических свойств показало, что исследуемая культура не восстанавливает нитраты до нитритов и, вероятно, не синтезирует фермент нитратредуктазу. При росте в МПБ не выделяет сероводорода, аммиака и индола. Рост на молоке сопровождается образованием сгустка и сыворотки. Штамм не гидролизует крахмал и желатину, не образует ацетилметилкарбинол из глюкозы, не обладает оксидазной активностью, но синтезирует фермент каталазу; устойчив к пенициллину.

В качестве единственного источника углерода и энергии культура использует галактозу, лактозу, глюкозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, рафинозу, арабинозу, сорбит и маннит с образованием кислоты; не утилизирует органические кислоты (янтарную и молочную), сахароспирт, дульцит и глицерин. Так как в качестве единственного источника углерода и энергии, кроме этанола, штамм утилизирует и другие органические соединения, его можно отнести к факультативным этилотрофам.

Исследуемая культура не ферментирует углеводы в анаэробных условиях и, следовательно, может быть отнесена к строгим аэробам. Оптимальной для роста культуры является температура 30—35 °С, рН 7,0. Спор, жгутиков и капсулы культура не образует.

На основании комплекса изученных признаков и согласно определителю Берги [5] исследуемый штамм 179/2 к-и отнесен к роду *Acinetobacter*, виду *calcoaceticus*, который является хемоорганотрофом с окислительным метаболизмом. Штамм характеризуется отсутствием специфических потребностей в факторах роста, разносторонностью в использовании органических веществ как источников углерода и энергии.

Известно [13], что для большинства представителей вида *Acinetobacter calcoaceticus* характерна удельная скорость роста 0,25—0,5 ч.⁻¹, но

Производственно ценные показатели *Acinetobacter calcoaceticus* и его мутанта 1/0,04

Показатели	Исследуемые культуры	
	исходная 179/2 к-и	мутант 1/0,04
Удельная скорость роста μ , ч. ⁻¹	0,40	0,52
Биомасса X , г/л	4,20	5,36
Экономический коэффициент Y , %	55	70
Продуктивность по биомассе P , г/л·ч	1,68	2,78
Концентрация белка в биомассе, %	65,4	69,2
Рост при:		
температуре, °С,	28—37	28—42
рН,	6,0—8,0	6,0—8,0
концентрации этанола, об. %	1—7	1—7

некоторые штаммы могут иметь удельную скорость роста до $0,7 \text{ ч}^{-1}$ [1].

Выделенный нами штамм 719/2 к-и имеет удельную скорость роста $0,4 \text{ ч}^{-1}$, концентрацию биомассы $4,2 \text{ г/л}$, продуктивность по биомассе $1,68 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$, экономический коэффициент 55% , содержание белка в биомассе $65,4 \%$ (см. таблицу).

Однако для того чтобы бактерии можно было рекомендовать для использования в качестве продуцентов в производстве кормового белка, необходимо, чтобы их экономический коэффициент был около $70\text{--}80 \%$, удельная скорость роста $0,5\text{--}0,6 \text{ ч}^{-1}$, а содержание белка в биомассе не ниже 70% [14].

Нами была предпринята попытка с помощью методов генетики и селекции улучшить исследуемый штамм по признаку увеличения скорости роста и содержанию белка в биомассе.

Повышения скорости роста у этанолутилизирующих бактерий можно добиться путем выделения мутантов, устойчивых к умеренным концентрациям МИУ — специфическому ингибитору ключевого фермента метаболизма этанола алкогольдегидрогеназы. При обработке исходной культуры УФ лучами наибольшее число мутантов выделяется при степени выживаемости культуры $0,1\text{--}1,0 \%$ [11]. В нашем эксперименте степень выживаемости $0,1 \%$ соответствовала дозе облучения УФ лучами, полученной в течение 125 с . При обработке исходной культуры этой дозой УФ лучей на селективной среде с $0,04 \%$ МИУ был отобран мутант $1/0,04$. Необработанная УФ лучами культура (контроль) на селективной среде не росла.

Для промышленного производства белка важно, чтобы продуценты не только обладали высокой скоростью роста и содержанием белка в биомассе, не менее важны такие характеристики, как термотолерантность, ацидофильность и устойчивость штамма к высоким концентрациям спирта (в случае этанолутилизирующих микроорганизмов). Это обеспечивает конкурентоспособность культур при нестерильном производстве, помогает получать не только наибольший выход биомассы, но и организовать производство с наименьшими материальными и трудовыми затратами, а значит, и с наименьшей стоимостью кормового белка.

Результаты изучения перечисленных производственно ценных характеристик исследуемых культур (исходная и ее мутант) представлены в таблице. Отобранный мутант превосходит исходную культуру не только по удельной скорости роста ($0,52 \text{ ч}^{-1}$ против $0,4$), но и по концентрации биомассы ($5,36 \text{ г/л}$ против $4,2$) и содержанию в ней белка ($69,2 \%$ против 65). Мутант характеризуется более высоким экономическим коэффициентом (70% против 55) и продуктивностью по биомассе ($2,78 \text{ г/л}\cdot\text{ч}$ против $1,68$) по сравнению с исходной культурой.

Итак, обработка УФ лучами и селекция на устойчивость к МИУ не влияли на такие показатели, как ацидотолерантность и устойчивость к повышенным концентрациям спирта в среде (см. таблицу).

Выделенный нами мутант менее чувствителен к высоким значениям температуры и способен к росту при 42°C , тогда как исходная культура при этой температуре не растет.

Таким образом, в результате использования УФ облучения получен мутант *Acinetobacter calcoaceticus*, устойчивый к МИУ. Мутант характеризуется наиболее высокими производственно-ценными показателями по сравнению с исходной культурой: повышенной удельной скоростью роста ($0,52 \text{ ч}^{-1}$), более высокой концентрацией сухой биомассы ($5,36 \text{ г/л}$) и содержанием в ней белка ($69,2 \%$), высоким экономическим коэффициентом (70%). Отобранный мутант не уступает по этим качествам лучшим из уже известных мутантов *Acinetobacter calcoaceticus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbott B., Laskin A., Mc Coy C.—Appl. Microbiol., 1973, v. 25, 5, p. 87.
2. Квасников Е. И., Гавриленко М. М., Павленко М. И. Сумневич В. Г., Соломко Е. Ф., Руда С. П.—Мікробіол. ж., 1976, вып. 38, № 6, с. 683.
3. Laskin A. S.—Biotechnol. Bioeng. Symp., 1977, v. 7, p. 91.

4. Егоров Н. С. Практикум по микробиологии.— М., 1976, с. 125.
5. Бергн. Краткий определитель бактерий / Под ред. Дж. Хоулта — М., 1980.
6. Горнак Н. М., Коваленко С. П., Идельчик М. С., Замбрыцкий О. Н.— Прикл. биохим. микробиол., 1979, т. 15, № 3, с. 350.
7. Рябушко Т. А., Игнатович Л. Ф., Дубиковская Т. Г. Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2, хим. биол., геогр., 1982, № 2, с. 29.
8. Плохинский Н. А. Биометрия.— М., 1970, с. 227.
9. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии.— М., 1971, с. 138.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. S.— J. Biol. Chem. 1951, v. 193, p. 265.
11. Миллер Дж. Эксперименты по молекулярной генетике.— М., 1976, с. 116.
12. Перт Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток.— М., Мир., 1978, с. 14.
13. Коваленко С. П.— В сб.: Химические факторы в селекции промышленных микроорганизмов.— Минск, 1980, с. 96, 99.
14. Коваленко С. П. Химические факторы в селекции продуцентов микробных белков.— Минск, 1980, с. 114.

УДК 521,5(476)

А. В. КАЗЮЧИЦ, А. Д. ПИСАНЕНКО

НОВЫЕ ДЛЯ БЕЛОРУССИИ ВИДЫ ЖУКОВ-ДРОВОСЕКОВ (Coleoptera, Cerambycidae)

До настоящего времени на территории БССР было отмечено 116 видов жуков-дровосеков (Cerambycidae) [1—5]. Наши исследования, начатые в 1970 г., позволили добавить к этому числу еще 18 видов. Ниже приводится перечень новых для республики видов жуков-дровосеков с указанием их общего ареала.

1. *Megopis scabricornis* Scop. Брестская обл., Кобринский р-н, пионерлагерь «Салют», VII. 1970 (Карасев), 1 экз.; г. Брест, на тополе, 20.VII. 1972 (Казючиц), 1 экз.

Распространение: Юг Европейской части, Кавказ, Закавказье, Иран, Малая Азия, Сирия, Зап. Европа.

2. *Rhamnusium gracilicorne* Thery. Витебск, 15.VI. 1980 (Донов), 2 экз.; Шемьслица, окр. г. Минска, VII. 1980 (Зуенок), 1 экз.; г. Старые Дороги, VII. 1978 (Чумаков), 1 экз.; Вилейский р-н, Биостанция БГУ, 27.VI.1980 (Тищенко), 1 экз.; г. Брест, 20.VII.1972 (Казючиц), 1 экз.; большие серии личинок из разных пунктов БССР (Казючиц).

Распространение: Западная и Восточная Европа.

3. *Pachyta lamed* L. Витебская обл., Шарковщинский р-н, д. Ручей, на цветах, 17.VII.1970 (Казючиц), 1 экз.

Распространение: Голаркт.

4. *Asmaeops angusticollis* Gebl. Минская обл., Воложинский р-н, хутор Печище, 4.VII.1982 (Салук), 1 экз.; Витебская обл., Полтево, 3.VI—7.VII.1981 (Роменко), 7 экз.

Распространение: Ранее отмечен для Сибири, Северной Монголии, Северного Китая, Северной Кореи. Нахождение этого вида в БССР значительно расширяет его ареал.

5. *Judolia sexmaculata* L. Минская обл., Налибокская пуша, оз. Кромань, 20.VII.1983 (Казючиц), 2 экз.; Витебская обл., Шарковщинский р-н, д. Ручей, 21.VII.1970 (Казючиц), 1 экз.

Распространение: Голаркт.

6. *Pachytodes erraticus* Dalm. Гродненская обл., Дятловский р-н, дом отдыха «Реченька», 8.VII.1983 (Казючиц), 1 экз.

Распространение: На восток до Енисея, южнее 58-й параллели.

7. *P. cerambyciformis* Schrank. Гомельская обл., Мозырский р-н, окр. д. Стрельск, 11.VII.1981 (Жуковец), 7 экз.; Могилевская обл., окр. г. Могилева, 15.VII.1979 (Казючиц), 2 экз.

Распространение: Европа, Кавказ, Закавказье.

8. *Nothorhina punctata* F. Гродненская обл., Дятловский р-н, дом отдыха «Реченька», 21.VI.1982 (Скорород), 1 экз.; Там же, 8.VII.1983 (Казючиц), 2 экз.