



УДК 576.8.095.5

Н. В. ГРИЦ, К. М. БЕЛЯВСКИЙ, Ю. К. ФОМИЧЕВ

ВЛИЯНИЕ СОСТОЯНИЯ *гесА*-СИСТЕМЫ НА КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ ИНТАКТНЫХ И УФ-ОБЛУЧЕННЫХ БАКТЕРИЙ *E. COLI*

Ранее нами было показано [1—4], что введение в мутантные по *гесА*-гену бактерии *гесА*⁺-аллеля частично или полностью восстанавливает ряд свойств бактериальной клетки, утрачиваемых вследствие мутаций в гене *гесА* [5—8]. Причем в зависимости от конкретного изученного признака действие *гесА*⁺-аллеля в сочетании с мутантным аллелем проявлялось от полной доминантности до полной рецессивности.

В задачу данного исследования входило изучить процессы роста и клеточного деления гетерозиготных по *гесА*-гену бактерий *E. coli* в сравнении с изогенными бактериями *гесА*⁺ и *гесА* 13 и установить степень доминирования аллеля *гесА*⁺ над мутантным аллелем в отношении обеспечения указанных процессов.

Материал и методика

Использовали следующие штаммы *Escherichia coli* K-12: АВ 1157 *гесА*⁺ [9], АВ 2463 *гесА* 13 [9] и М 143 *гесА*⁺/*гесА* 13 [10].

Морфологию, рост и деление бактерий исследовали путем микрофотографирования препаратов, приготовленных из живых клеток в Ш-образной камере Пешкова [11], при фазово-контрастном освещении в микроскопе МБИ-6, оборудованном специальной термостатирующей приставкой.

Для УФ-облучения использовали бактерицидную лампу БУВ-30 (максимум испускаемой энергии в диапазоне 253,7 нм, мощность дозы 6 эрг/мм²·с). Бактерии облучали после нанесения на поверхность питательной среды камеры Пешкова.

Результаты и их обсуждение

Визуальное наблюдение за микроорганизмами позволяет наиболее полно изучить детали самого процесса роста и деления клеток и особенности поведения отдельных, генотипически различающихся штаммов, тогда как в жидких культурах подобные исследования провести практически невозможно. Следует отметить, что, хотя характер роста клеток на плотной среде может обладать некоторой спецификой, использование этого метода дает возможность обнаружить особенности поведения каждого штамма в одинаковых условиях и позволяет наблюдать во времени за ростом отдельных изолированных клеток. Фотодокументирование препаратов позволяет проследить общую динамику процесса и обнаружить отдельные его детали.

Результаты проведенных исследований показали, что, по крайней мере, на протяжении 4 ч наблюдения все клетки штамма АВ 1157 *гесА*⁺, находящиеся в поле зрения микроскопа, обладают способностью к делению и формируют микроколонии дочерних клеток нормальных размеров (рис. 1), тогда как наличие *гесА*-мутации резко изменяет

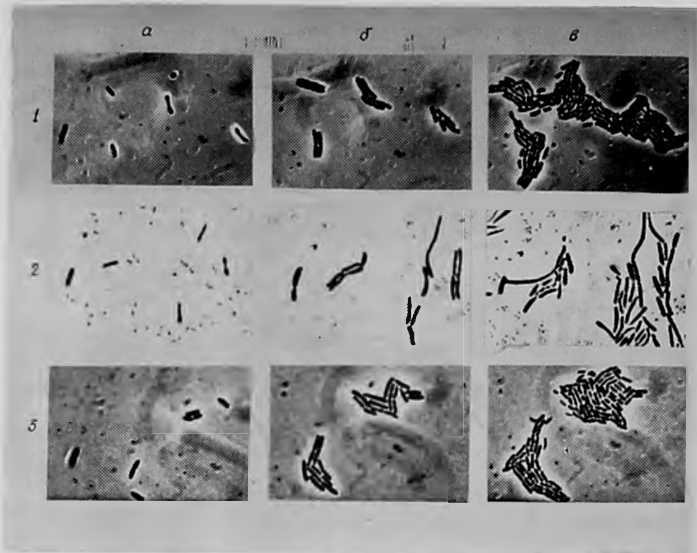


Рис. 1. Рост интактных бактерий штаммов *E. coli* AB 1157 *recA*⁺ (1), AB 2463 *recA*13 (2) и M 143 *recA*⁺/*recA*13 (3) на плотной питательной среде. (Фазово-контрастная микроскопия, объектив 90 $\times$, окуляр 2,5 $\cdot$ 10 $\times$):

а — через 0 мин; б — через 2 ч; в — через 4 ч

процесс роста и деления клеток штамма AB 2463 *recA*13. Часть клеток удлиняется без деления, образуя нитевидные формы. Последние либо вообще не делились на протяжении всего времени наблюдения, либо отделяли на полюсах дочерние клетки крупных размеров. Кроме того, обнаруживались неделящиеся клетки нормальной длины, а также бактерии, которые осуществляли лишь два — три цикла деления, после чего дочерние клетки прекращали делиться. Резюмируя, можно с полным основанием заключить о высокой гетерогенности популяции бактерий штамма AB 2463 *recA*13 и выделить в ней несколько фракций: 1) клетки нормальных размеров и способные к делению; 2) клетки нормальных размеров, но дефектные по способности к делению; 3) клетки нормальных размеров, деление которых ограничено несколькими циклами; 4) неделящиеся филаменты и 5) филаменты, способные отделять дочерние клетки на полюсах.

Введение в бактерии штамма AB 2463 *recA*13 аллеля *recA*⁺ (штамм M 143) приводит к восстановлению клеточного деления и морфологической однородности популяции. Существенных различий в этом отношении между штаммами AB 1157 *recA*⁺ и M 143 *recA*⁺/*recA*13 не обнаружено. Таким образом, визуальное наблюдение за ростом и делением бактерий с различным состоянием *recA*-системы позволяет сделать вывод о доминировании *recA*⁺ над *recA*⁻-аллелем по признаку контроля деления и роста интактных бактерий.

С целью усиления нарушений в клеточном делении на последующем этапе бактерии облучали малыми дозами УФ-света. Оказалось, что в отличие от интактных бактерий у облученных ультрафиолетом в дозе 180 эрг/мм² клеток штамма AB 1157 *recA*⁺ имела место задержка деления, которое возобновлялось не ранее второго часа после обработки (рис. 2). При этом клетки удлинялись, а при делении отделяли дочер-



Рис. 2. Рост облученных ультрафиолетовым светом бактерий штаммов *E. coli* AB 1157 *гесA*⁺ (1), AB 2463 *гесA13* (2) и M 143 *гесA*⁺/*гесA13* (3) на плотной питательной среде. (Фазово-контрастная микроскопия, объектив 90 $\times$, окуляр 2,5 $\cdot$ 10 $\times$): а — через 0 мин; б — через 2 ч; в — через 4 ч

ние особи нормальных размеров, которые продолжали делиться и формировали микроколонии. Кроме того, в популяции УФ-облученных клеток штамма AB 1157 *гесA*⁺ встречались нитевидные и нормальные по внешнему виду бактерии, неспособные делиться.

Принимая во внимание крайне высокую чувствительность к УФ-лучам *гесA*-мутантов [12], клетки штамма AB 2463 облучали втрое меньшей дозой УФ-света. Тем не менее, и указанная доза полностью блокировала деление и рост мутантных бактерий. Однако после облучения в дозе 12 эрг/мм² бактерии штамма AB 2463 увеличивались в размерах, образуя филаменты различной длины (см. рис. 2). Деление их полностью блокируется, так что большая часть популяции клеток штамма AB 2463 нежизнеспособна. За время наблюдения только две клетки разделились через час после облучения их УФ-светом, однако дочерние клетки дальше не увеличивались в размере и не делились. Следует указать, что одна из клеток по истечении 3 ч роста целиком лизировалась (см. рис. 2). Таким образом, и доза 12 эрг/мм², как и доза 60 эрг/мм², оказалась летальной для мутантных по гену *гесA* бактерий штамма AB 2463, хотя при дозе 12 эрг/мм² наблюдается удлинение бактерий и, отчасти, остаточная способность к делению.

В контрольном эксперименте установлено, что облучение в дозах 12 и 60 эрг/мм² бактерий штаммов AB 1157 *гесA*⁺ и M 143 *гесA*⁺/*гесA13* не вызывает заметных изменений в их росте или делении. Облучение же гетерозиготных бактерий штамма M 143 в дозе 180 эрг/мм² дает эффект, аналогичный УФ-облучению в той же дозе клеток штамма AB 1157 *гесA*⁺, но в отличие от штамма AB 1157, удлинившиеся особи гетерозиготного штамма M 143 делятся, как правило, только по полюсам (см. рис. 2).

Справедливость результатов приведенных наблюдений подтвердилась при просмотре большого количества полей зрения микроскопа у нескольких независимо приготовленных препаратов. В результате мож-

но вполне обоснованно заключить, что аллель дикого типа гесА-гена доминирует над аллелем гесА 13 в отношении обеспечения роста и деления интактных и УФ-облученных бактериальных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гриц Н. В., Белявский К. М.— В сб.: Биология и научно-технический прогресс. Пушкино, 1974, с. 347.
2. Гриц Н. В.— Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2, хим., биол., геогр., 1976, № 2, с. 49.
3. Гриц Н. В.— Там же, № 3, с. 38.
4. Белявский К. М.— Там же, 1977, № 1, с. 32.
5. Clark A.— Ann. Rev. Microbiol., 1971, v. 25, p. 437.
6. Clark A.— 10th Int. Congr. Microbiol., 1971, p. 257.
7. Clark A.— Ann. Rev. Genetics, 1973, v. 7, p. 67.
8. Clark A.— Genetics, 1974, v. 78, p. 259.
9. Howard-Flanders P., Theriot L.— Genetics, 1966, v. 53, p. 1137.
10. Былинский А. Ф., Белявский К. М., Гриц Н. В.— В сб.: Микроорганизмы — продуценты биологически активных веществ. Минск, 1973, с. 217.
11. Пешков Н. А. Цитология бактерий.— М.— Л., 1955.
12. Clark A., Margulies A.— J. Mol. Biol., 1965, v. 19, p. 442.

Поступила в редакцию
12.11.81.

Проблемная НИЛ экспериментальной биологии

УДК 576.8.095.58 : 663.1

Т. А. РЯБУШКО, Л. Ф. ИГНАТОВИЧ, Т. Г. ДУБИКОВСКАЯ

ИЗОЛИРОВАНИЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ МУТАНТОВ ЭТАНОЛ- И МЕТАНОЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ ПСЕВДОМОНАД

Дефицит высококачественного белка в мире стимулирует развитие исследований по увеличению его ресурсов как традиционным путем, так и с помощью микроорганизмов. Созданию продуцентов белка, утилизирующих окисленные углеводороды, посвящена обширная литература в нашей стране и за рубежом. Недостатком всех разработок является низкая продуктивность культур, устранить его можно путем изолирования мутантов с производственно ценными качествами (высокой скоростью роста и значительным содержанием белка в биомассе).

Целью нашей работы является выделение быстрорастущих мутантов псевдомонад, утилизирующих низшие спирты.

Материал и методика

Объектом исследования служили клоны музейных этанол- и метанолутилизирующих псевдомонад.

Питательную среду для культивирования культур в периодическом процессе (на качалке 120 кач/мин) подбирали по прописи [1]. Метанол и этанол добавляли непосредственно перед посевом культуры в 1%-ной концентрации по объему.

Селективную среду для отбора мутантов готовили по прописи [2] с добавлением селективирующих агентов — моноидуксусной кислоты (МИУ) и формальдегида (Ф) в 0,01 %-ной концентрации.

Культуры выращивали в 250 мл колбах 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.

Для определения удельной скорости роста ($\mu, \text{ч}^{-1}$) культуры доводили на качалках до логарифмической стадии, затем пересеивали на свежую питательную среду, подогретую до 28 °С, и культивировали на качалках в течение 7 ч. Для получения статистически достоверных данных при вычислении удельной скорости роста пользовались методом наименьших квадратов [3]. Рост культур регистрировали, измеряя оптическую плотность культуральной жидкости на ФЭК-56М (Е $\frac{0,5 \text{ см}}{540 \text{ нм}}$). Накопление биомассы исследуемыми штаммами определяли весовым методом [4], а белок биомассы — методом Лоури [5]. Содержание бел-