

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. Пушино, 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 — моноiodуксусной 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 ($E_{540 \text{ нм}}^{0,5 \text{ см}}$). Накопление биомассы исследуемыми штаммами определяли весовым методом [4], а белок биомассы — методом Лоури [5]. Содержание бел-

ка в испытуемой пробе устанавливали по калибровочной кривой для бычьего альбумина и выражали в процентах от количества сухой биомассы.

В качестве мутагенов использованы N-нитро-N-метил-N'-нитрозогуанидин (НГ) и нитрозо-метил-мочевина (НММ) в концентрации 300 и 600 мкг/мл соответственно. Индукцию мутаций под действием НГ и НММ осуществляли общепринятым методом [6].

Результаты и их обсуждение

Путем обработки некоторых этанол- и метанолутилизирующих псевдомонад химическими мутагенами получены мутанты, отличающиеся от исходных культур более высокой удельной скоростью роста. НГ и НММ индуцируют устойчивые к селекционирующим агентам (МИУ и Ф) мутации с частотой $4 \cdot 10^{-3}$ — $2,5 \cdot 10^{-5}$ и $6,5 \cdot 10^{-3}$ — $3 \cdot 10^{-4}$ соответственно.

Использование селективной среды, содержащей в качестве селективных агентов МИУ-ингибитора активности алкогольдегидрогеназы (ключевой фермент при метаболизме этанола), и повышенной концентрации промежуточного метаболита (Ф) при метаболизме метанола, позволило сократить выборку до трех десятков вариантов и изолировать мутанты с повышенной скоростью роста. Превышение лучших мутантов над исходными культурами по удельной скорости роста соответствовало 38—83 % этанолутилизирующих и 12—30 % метанолутилизирующих псевдомонад, а по урожаю биомассы в экспоненциальной фазе роста на 96—320 и 18—43 % соответственно.

Таблица 1

Удельная скорость роста мутантов исследуемых культур (процент вариантов), отобранных на селективных средах

$\mu, ч^{-1}$	МИУ		Формальдегид	
	Исходная культура			
	179	22	1	19
0,15—0,20	6,2	0	0	25
0,20—0,25	9,4	33,3	0	25
0,25—0,30	43,7	50,0	46,6	45
0,30—0,35	16,0	16,6	53,3	0
0,35—0,40	3,0	0	0	0
0,40—0,45	9,0	0	0	0
0,45—0,50	6,0	0	0	0
0,10—0,15	0	0	0	0

Питательные среды, содержащие в качестве селективных агентов антиметаболиты, ингибиторы ключевых ферментов метаболизма и повышенные концентрации промежуточных метаболитов, широко используются в разных лабораториях мира для выделения продуцентов аминокислот и других биологически активных соединений. С. П. Коваленко [7] впервые исследовал возможность приложения метода селекции на устойчивость к антиметаболитам для выделения более активных этанолутилизирующих продуцентов кормового белка. В качестве селек-

тирующего агента автором [7] использована монофторуксусная кислота (МФУ) — структурный аналог ацетата.

Причиной повышения продуктивности полученных мутантов, по мнению авторов [8, 9], является более высокая алкогольдегидрогеназная активность, обусловленная дерепрессией биосинтеза этого фермента в клетках мутантов.

Повышенная скорость роста изолированных нами этанолутилизирующих мутантов, вероятно, связана с увеличением продукции алкогольдегидрогеназы по сравнению с исходной культурой. Для доказательства этого предположения необходимы эксперименты по изучению указанного фермента у полученных мутантов и их исходной культуры.

Повышенная скорость роста изолированных нами метанолутилизирующих мутантов, по-видимому, объясняется более высокой скоростью

переработки формальдегида в менее токсичные для клетки вещества. Однако биохимическая природа этой способности мутантов нами не исследовалась.

Таблица 2

Сравнение исходных культур псевдомонад и их мутантов по биомассе и удельной скорости роста

Исследуемые штаммы	μ		Биомасса в экспоненциальной фазе роста	
	$ч^{-1}$	% от исходной культуры	E_{540} мм	% от исходной культуры
Исходный 179	0,25	100	1,00	100
Мутант 179/2	0,43	178	4,20	420
179/14	0,49	196	4,00	400
179/21	0,44	176	1,86	186
Исходный 22	0,13	100	0,46	100
Мутант 22/4	0,18	138	0,90	196
Исходный 19	0,28	100	0,85	100
Мутант 19/1	0,32	114	1,02	120
Исходный 1	0,27	100	0,82	100
Мутант 1/12	0,35	129	1,02	127
Исходный 68	0,23	100	1,10	100
Мутант 68/16	0,30	130	1,30	118

Как видно из табл. 1, удельная скорость роста большинства отобранных вариантов (44—53 %) находится в пределах 0,25—0,30 $ч^{-1}$. Для лучших мутантов этанолутилизирующих псевдомонад (табл. 2) характерна удельная скорость роста 0,43—0,49 $ч^{-1}$, в то время как для исходных культур — 0,25 $ч^{-1}$.

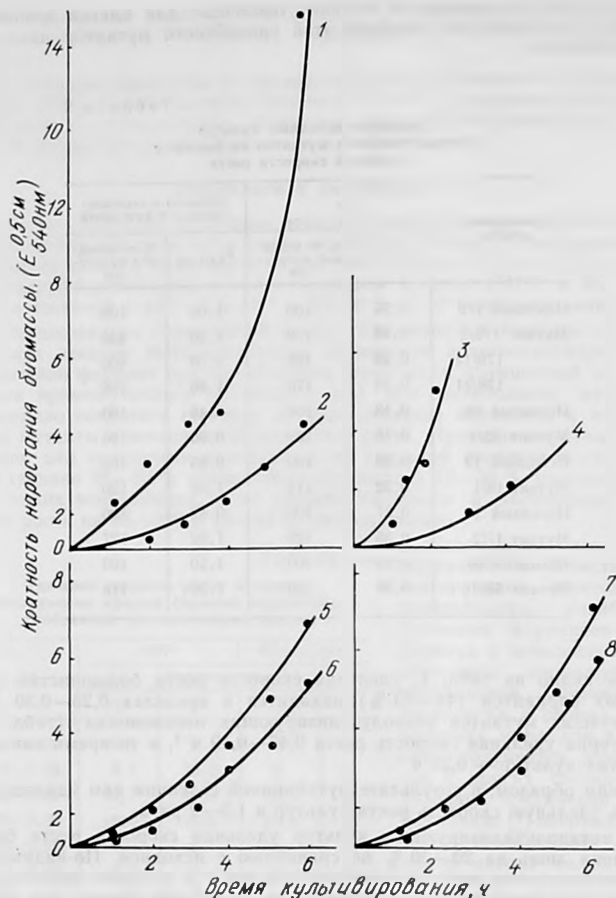
Таким образом, в результате мутационной селекции нам удалось повысить удельную скорость роста культур в 1,5—2 раза.

У метанолутилизирующих культур удельная скорость роста была повышена лишь на 20—30 % по сравнению с исходной. По-видимому, в условиях нашего эксперимента использование в качестве селекционирующих агентов промежуточных метаболитов менее эффективно, чем ингибиторов активности ключевых ферментов метаболизма низших спиртов.

Как видно из рисунка, выделенные нами мутанты в отличие от исходных культур растут в экспоненциальной фазе значительно быстрее. Содержание белка в биомассе мутантов на этой стадии развития сохраняется на уровне исходных культур и находится в пределах 60 % веса сухой биомассы.

Итак, путем обработки некоторых бактерий рода *Pseudomonas* химическими мутагенами и выращивания на селективных средах с экспериментально подобранными концентрациями промежуточного метаболита (формальдегид) и ингибитора активности алкогольдегидрогеназы (монодооуксусная кислота) получены устойчивые к селекционирующим агентам мутанты.

В результате одноступенчатой селекции с испытаниями 1—3 десятков устойчивых мутантов удельная скорость роста повышена на 11—30 % метанолутилизирующих и на 20—96 % этанолутилизирующих псевдомонад по сравнению с удельной скоростью роста исходных куль-



Рост исходных культур псевдомонад и их мутантов на питательной среде с этанолом или метанолом:

1, 3 — этанолутилизующие мутанты (штаммы 179/2, 22/31); 2, 4 — исходные культуры (штаммы 179к, 22к); 5, 7 — метанолутилизующие мутанты (штаммы 19/1, 1/9); 6, 8 — исходные культуры (штаммы 19к, 1к)

тур. Содержание белка в биомассе мутантов сохраняется на уровне исходных культур и находится в пределах 60 % веса сухой биомассы.

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук С. П. Коваленко за любезно предоставленный реактив МИУ, состав селективной среды и консультации по исследуемому вопросу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamada S., Nabe K., Wada M.— J. Ferment. Technol., 1977, v. 55, № 5, p. 436.
2. Горнак Н. М., Коваленко С. П., Идельчик М. С., Замбрицкий О. Н.— Прикл. биохим. микробиол., 1979, т. 15, № 3, с. 350.

3. Плохинский Н. А. Биометрия.— М., 1970, с. 227.
4. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии.— М., 1971, с. 138.
5. Loury O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Raudall R. S.— J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М., 1976, с. 116.
7. Коваленко С. П.— В сб.: Микробный синтез биохимически активных соединений.— Минск, 1976, с. 159.
8. Коваленко С. П., Полупанов В. С., Замбржидский О. Н. и др. Микроорганизмы в промышленности, с. х., медицине.— Тез. докл. науч. конф. БМО, 1979, с. 23.
9. Шевчук В. С., Коваленко С. П., Полупанов В. С.— Там же, с. 25.

Поступила в редакцию
03.10.80.

Кафедра микробиологии

УДК 581.4+582.4/9

Т. А. САУТКИНА, О. А. ЛЕВКЕВИЧ

СРАВНИТЕЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ *GLUCERIA FLUITANS* (L.) R. BR. И *GLUCERIA Plicata* (FRIES) FRIES

Glyceria R. Br.— Манник — относительно небольшой, но широко распространенный род семейства Poaceae. Общее число видов в роде около 50 [1, 2], в СССР — 15 [2], в БССР — 6 [3].

Многие виды манника имеют большое практическое значение [2, 4, 5]. Манники интересны и в систематическом плане. Видовые признаки многих из них изучены недостаточно, что затрудняет идентификацию. Особенно это касается *Glyceria fluitans* (L.) R. Br. и *Glyceria plicata* (Fries) Fries, которые в гербарных сборах различить бывает весьма трудно.

Цель данной работы — найти более четкие диагностические признаки, которые можно использовать при определении видов.

Материал для морфологических исследований собран в 1978—1979 гг. на территории Березинского заповедника. Морфологические особенности вегетативных органов во многом зависят от экологических факторов. Поэтому, чтобы получить сопоставимые данные, образцы *Glyceria fluitans* и *Glyceria plicata* брались из одних и тех же или близких по экологическим условиям мест произрастания. Загербаризировано свыше 200 экземпляров *Glyceria fluitans* и *Glyceria plicata*. Кроме того, просмотрен материал Гербариев БГУ имени В. И. Ленина и Института экспериментальной ботаники АН БССР. При сравнительном изучении манников проанализировано 37 морфологических признаков. Данные обработаны статистически [6].

Морфологический анализ образцов манников показал, что они имеют ряд отличительных признаков, по которым можно довольно четко отличить *Glyceria fluitans* от *Glyceria plicata*.

Таблица 1

Морфометрические показатели стебля
Glyceria fluitans и *Glyceria plicata*

Название вида	Диаметр стебля на уровне почвы, мм, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Диаметр стебля в средней части, мм, $x \pm \bar{S}_{\bar{x}}$	Длина стебля, см, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
<i>Glyceria fluitans</i>	3,8±0,1	2,3±0,1	59,0±2,8
<i>Glyceria plicata</i>	4,6±0,1	3,2±0,1	49,0±2,4
<i>t</i>	4,21	5,28	2,67