

ареколина *in vitro* (рис. 2) в концентрации 10^{-5} — 10^{-7} М. С увеличением концентрации ареколина до 10^{-3} М активность в надосадочной жидкости снижалась до 60 % контрольного уровня. В сердечной мышце отмечается аналогичное изменение активности фермента при действии ареколина (см. рис. 2). Н-холинэстераза активируется независимо от дозы активированного фермента во всех исследуемых фракциях сердечной мышцы.

В опытах *in vitro* прослеживается «чистый» эффект действия холинэстеразы на холинэстеразу, что совпадает с известными представлениями [1]. Это свидетельствует о том, что при выделении субклеточных фракций сохраняется холинэргическое звено, которое четко реагирует на вводимые препараты.

Дальнейшие наблюдения за поведением холинэстеразы в мозге и сердце крыс при введении холинэргических препаратов *in vitro* свидетельствуют о том, что активация М-структур мозга приводит к повышению активности холинэстеразы, а возбуждение М- и Н-структур сердца сопровождается однотипными изменениями активности фермента. Скорость фосфорилирования глюкозы в больших полушариях головного мозга зависит, таким образом, от состояния М-холинорецепторов, тогда как в сердечной мышце лишь возбуждение Н-структур в наибольшей степени способствовало возрастанию гексокиназной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисенко П. П. Фармакологическая регуляция жизнедеятельности организма через холинэргические системы.— Л., 1970.
2. Somogyi E. a.— *Acta physiol.*, 1962, v. 21, p. 295.
3. Long C.— *Biochem. J.*, 1952, v. 50, p. 407.
4. Hestrin S.— *J. Biochem.*, 1949, v. 80, p. 249.
5. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск, 1973.
6. Хрипченко И. П., Кукулянская М. Ф., Маркин В. Л., Панина Т. Н.— *Радиобиология*, 1977, т. 17, вып. 44, с. 520.
7. Елаев Н. Р., Подосиновикова М. П.— *Бюл. экспер. биол. и мед.*, 1973, с. 11.
8. Елаев Н. Р., Карьева М. П., Подосиновикова М. П.— *Фарм. и токсикол.*, 1972, т. 35, вып. 5, с. 632.
9. Геворкян Э. С., Поносян Г. А.— *Ж. exper. и клин. мед.*, 1974, т. 14, вып. 1, с. 49.
10. Михельсон М. Д., Зельман Э. В. Ацетилхолин.— М., 1970.

Поступила в редакцию
14.11.80.

Кафедра биохимии

УДК 579.25

ЧАН ТХИ СЫОНГ, Н. В. ГРИЦ, А. Ю. ФОМИЧЕВ

МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ОЗОНА В СИСТЕМЕ *ESCHERICHIA COLI* K12

Озон обладает выраженным бактерицидным действием на различные виды микроорганизмов [1, 2]. Исследования последних лет показали, что одной из причин гибели подвергшихся обработке озоном бактерий являются индуцированные O_3 повреждения молекулы ДНК. Установление ДНК-тропных свойств озона [3—5] стимулировало изучение его мутагенного действия на бактерии. Однако до настоящего времени о мутагенном эффекте озона известно крайне мало [6, 7], и дальнейшие исследования в этом направлении представляют существенный интерес в связи с все более широким применением озона в различных областях сельского хозяйства.

Материал и методика

Бактерии. В качестве объекта исследования были выбраны изогенные штаммы *Escherichia coli* K12: AB 1157 thr⁺ arg⁺ leu⁺ pro⁺ lac⁺ gal⁺ his⁺

arg thi Str^r и его производный АВ 2463 [8]. Последний отличается от штамма АВ 1157 наличием мутации *hcsA13*.

Среды. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде, приготовляемой на основе препарата аминокептида [9]. Для определения жизнеспособности интактных и обработанных озоном бактерий готовили плотную питательную среду, содержащую 1,5 % агар-агара. Для выявления мутантов использовали водный агар [10], обогащенный всеми необходимыми для роста бактерий факторами, за исключением треонина (для Thr⁺-мутантов), или аргинина (для Arg⁺-мутантов).

Обработка озоном. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде до концентрации $2 \cdot 10^8$ кл/мл (экспоненциальная фаза роста), осаждали центрифугированием и ресуспендировали фосфатным буфером. Ресуспендированные суспензии в объеме 5 мл каждая обрабатывали озоном путем продувания озонированного воздуха в течение разных промежутков времени (до 20 мин). Генератором озона служил трубчатый озонатор, сконструированный на кафедре биофизики физического факультета БГУ имени В. И. Ленина. Концентрация озона на выходе озонатора составляла 0,35 мг/л воздуха, скорость пропускания через бактериальную суспензию — 0,1 л/мин.

Определение летального и мутагенного эффектов озона. В контрольной и обработанной в течение разного времени пробах определяли число жизнеспособных бактерий, формирующих колонии на плотной питательной среде через 24 ч при 37°C. За показатель летального эффекта при-

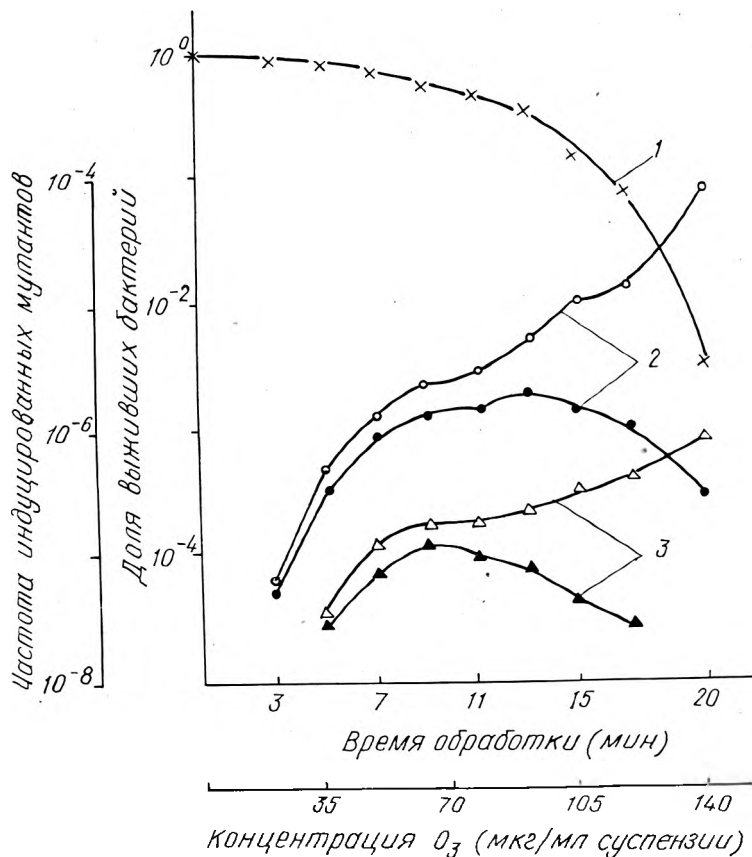


Рис. 1. Выживаемость и мутагенез обработанных озоном бактерий штамма *E. coli* K 12 AB 1157:

1 — выживаемость бактерий; 2 — частота индуцированных мутантов Thr⁺ в пересчете на выжившую (незакрашенные символы) и на обработанную (закрашенные символы) клетку; 3 — частота индуцированных мутантов Arg⁺ в пересчете на выжившую (незакрашенные символы) и на обработанную (закрашенные символы) клетку

нимали отношение числа жизнеспособных после воздействия озоном бактерий к числу жизнеспособных клеток в контрольной пробе.

Учет мутантных бактерий производили через 72 ч роста на плотной селективной среде при температуре 37 °С. Частоту индуцированных мутантов определяли по формулам:

$$F_1 = \frac{M_t - M_0}{N_t}; F_2 = \frac{M_t - M_0}{N_0},$$

где F_1 — частота индуцированных мутантов на одну выжившую клетку; F_2 — частота индуцированных мутантов на одну обработанную клетку; N_0 и N_t — число жизнеспособных бактерий соответственно в контрольной и обработанной в течение времени t пробах; M_0 и M_t — число мутантов соответственно в контрольной и обработанных пробах.

На графиках (рис. 1, 2) и в таблице представлены средние значения результатов, полученных минимум в трех независимых экспериментах.

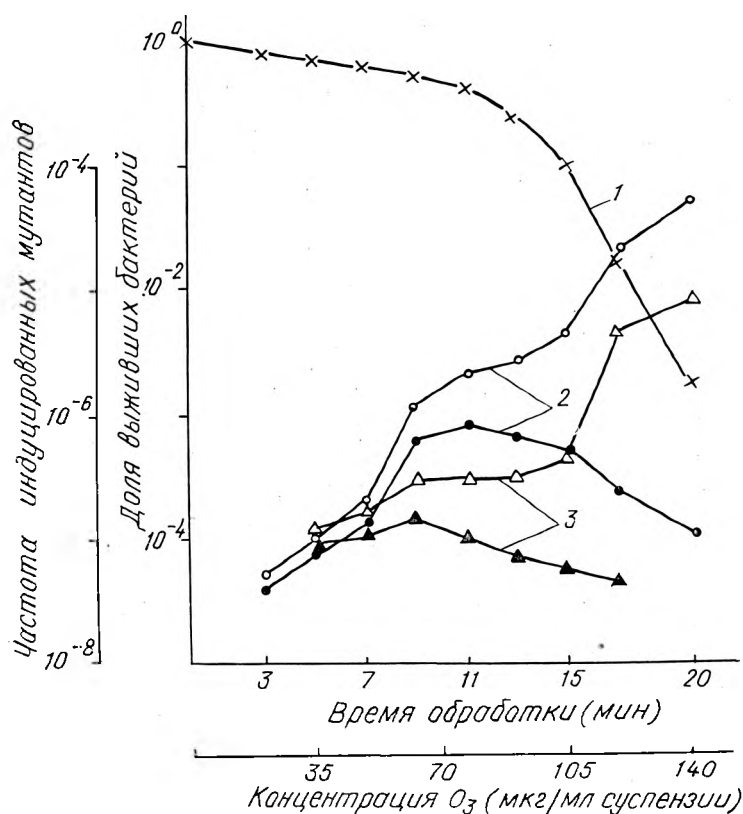


Рис. 2. Выживаемость и мутагенез обработанных озоном бактерий штамма *E. coli* К 12 АВ 2463 гесА13 (обозначения, как на рис. 1)

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что озон в концентрации 0,35 мг/л воздуха обладает выраженным мутагенным действием как в отношении бактерий штамма АВ 1157, так и в отношении рекомбинационно-дефектных бактерий штамма АВ 2463 гесА13 (рис. 1, 2). Причем реверсии к треониннезависимости индуцируются с большей вероятностью по сравнению с реверсиями к аргининнезависимости, и эта закономерность прослеживается на протяжении всего эксперимента. У штамма АВ 2463 гесА13 наблюдаемые различия в эффективности воз-

**Максимальные значения частот
индуцированных Thr^+ -мутантов
на одну обработанную клетку
при разных pH среды в момент обработки озоном**

pH	Штамм АВ 1157		Штамм АВ 2463 гесA13	
	Частота мутантов	Выживаемость бактерий, %	Частота мутантов	Выживаемость, бактерий, %
5,0	$2,84 \cdot 10^{-6}$	25,70	$1,98 \cdot 10^{-6}$	20,52
7,0	$2,07 \cdot 10^{-6}$	42,39	$1,12 \cdot 10^{-6}$	37,33
9,0	$1,49 \cdot 10^{-6}$	52,28	$0,93 \cdot 10^{-6}$	36,72

никновения индуцированных мутаций Thr^+ и Arg^+ выражены в меньшей степени.

Следует отметить, что, если частота индуцированных ревертантов, приходящихся на одну выжившую клетку (F_1), непрерывно возрастает с увеличением времени воздействия озоном, F_2 (частота индуцированных мутантов в пересчете на одну обработанную клетку) достигает своего максимального значения, после чего последовательно снижается. Причем частота индуцированных мутантов Thr^+ (на обработанную клетку) у штамма АВ 1157 достигает максимума при суммарной концентрации озона 90 мкг/мл бактериальной суспензии (у штамма АВ 2463 максимум частоты Thr^+ -мутантов достигается при воздействии озоном в концентрации 80 мкг/мл суспензии). Для обоих штаммов частота индуцированных Arg^+ -мутантов понижается при суммарных концентрациях озона, превышающих 65 мкг/мл суспензии.

Таким образом, индуцируемые озоном предмутационные повреждения ДНК способны реализоваться в мутации к треонин- и аргининнезависимости бактерий *E. coli* К 12 АВ 1157 и АВ 2463 гесA13. Число выявляемых мутантов возрастает по мере увеличения продолжительности обработки от 3 до ~ 10 мин, что соответствует увеличению концентрации O_3 от 20 до 70 мкг/мл обрабатываемой суспензии. Характерно, что в данных условиях жизнеспособность сохраняют 50—90 % обработанных бактерий (см. рис. 1, 2). Похожие результаты получены при индукции озоном у *E. coli* К 12 Met^+ и Mal^+ реверсий [6]. Наблюдаемое уменьшение числа индуцированных мутантов при воздействии озоном в высоких дозах, по-видимому, обусловлено двумя причинами. Во-первых, при продолжительной обработке бактерий в молекуле ДНК накапливаются повреждения в таком количестве, что клетка становится нежизнеспособной, и значительная доля потенциальных мутаций не выявляется (практически все известные мутагены, применяемые в больших дозах, приводят к аналогичному эффекту). Однако уменьшение числа индуцированных мутантов при длительном воздействии O_3 обуславливается как летальными повреждениями ДНК, так и в значительной мере нарушением проницаемости клеточной стенки, приводящим к лизису отдельных бактерий, в том числе и мутировавших. Последнее объяснение подтверждается установленным фактом существенного уменьшения оптической плотности бактериальных суспензий по мере увеличения продолжительности обработки.

Нами исследована также эффективность O_3 -мутагенеза бактерий *E. coli* при разных pH среды в момент обработки; в результате установлено, что с увеличением значений pH среды (5,0—9,0) наблюдается уменьшение числа индуцированных Thr^+ -ревертантов как у штамма АВ 1157, так и у АВ 2463 гесA13. Эта закономерность сохранялась всегда и не зависела от продолжительности озонирования. В таблице суммированы значения частот индуцированных мутантов, а также жизнеспособность обработанных бактерий, соответствующие максимальному мутагенному эффекту озона. Эти данные свидетельствуют, что при разных

pH среды число индуцированных O_3 мутантов достигает максимальных значений при различных уровнях жизнеспособности бактерий.

Таким образом, pH среды в момент обработки озоном оказывает существенное влияние на мутационный процесс у бактерий *E. coli* K 12. Существует мнение, что снижение мутагенного действия O_3 при повышении pH обусловлено его тенденцией к разложению [7]. Это предположение основано на экспериментально установленном факте снижения скорости распада озона в водных растворах путем подкисления последних [11]. Сопоставление максимальных частот мутантов и жизнеспособности бактерий (см. таблицу) указывает, что подобное объяснение влияния pH среды на мутагенез не представляется правомочным, так как предполагает максимальный выход мутантов при одинаковом летальном эффекте (при разных значениях pH среды одинаковый летальный эффект озона достигается изменением продолжительности озонирования суспензий), чего не наблюдается в экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Manning W. J.— Microbiol. Aerial Plant Surfaces, London e. a., 1976, p. 160.
2. Чан Тхи Сыонг, Евтушенко А. Н.— Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2, хим., биол., геогр., 1981, № 1, с. 52.
3. Scott D. B. M.— Aquatic application of ozone, N. Y., 1975, p. 226.
4. Hamelin C., Sarhan F., Chung Y. S.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, № 1, p. 220.
5. Hamelin C., Sarhan F., Chung Y. S.— Experientia, 1978, v. 34, № 12, p. 1578.
6. Hamelin C., Chung Y. S.— Mutat. Res., 1974, v. 24, № 3, p. 271.
7. Hamelin C., Chung Y. S.— Mutat. Res., 1975, v. 28, № 1, p. 131.
8. Howard-Flanders P., Theriot L.— Genetics, v. 53, № 6, p. 1137.
9. Гриц Н. В.— Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2, хим., биол., геогр., 1976, № 3, с. 38.
10. Клаус Р., Хейс У.— Сборник методик по генетике микроорганизмов. М., 1970, с. 200.
11. Fetner R. H., Ingols R. S.— G. Gen. Microbiol., 1956, v. 151, p. 381.

Поступила в редакцию
14.05.82.

Кафедра микробиологии,
Проблемная НИЛ экспериментальной биологии