УДК 577.124 5:579.253.4:579.842.11

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОМИЦИНЗАВИСИМОСТИ НА БИОСИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ У ОСЛИЗНЕННЫХ МУТАНТОВ ESCHERICHIA COLI K-12

А. А. БАРСЕГЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН

Изучалось влияние различных стрептомицинзависимых мутаций на сверхсинтез внеклеточных полисахаридов у ослизненных мутантов E. coli K-12. Показано, что наличие стрептомициновых мутаций приводит к понижению уровня биосинтеза внеклеточных полисахаридов и уменьшает величину вязкости культуральной жидкости у исследуемых штаммов. Стрептомицинзависимые мутации влияют также на размер негативных колоний, константу скорости адсорбции и кинетику адсорбции вирулентного бактериофага М 59, специфически связывающегося с внеклеточными полисахаридами.

Ключевые слова: мутанты ослизненные, полисахариды, стрептомицинзависимость, фагочувствительность.

В настоящее время известно много типов полисахаридов микробного происхождения, находящих широкое применение в различных отраслях промышленности. Наиболее перспективными с практической точки зрения являются внеклеточные полисахариды (ВПС), локализованные снаружи клеточной стенки. Их использование позволяет избежать дорогостоящей очистки, необходимой для других типов микробных полисахаридов. ВПС являются объектом детального изучения во многих аспектах. Однако информации о биосинтезе этих полимеров, имеющих большую ценность, чрезвычайно мало.

Обнаружено, что многие штаммы Escherichia coli, Aerobacter cloacae и Salmonella в определенных условиях роста способны продуцировать особый внеклеточный гетерополисахарид—колановую кислоту [7, 9]. Этот полимер состоит из D-галактозы, L-фукозы, D-глюкозы, D-глюкуроновой кислоты, пирувата и ацетата в соотношении 2:2:1:1:1:1 [8]. У E. coli в биосинтез этого полисахарида вовлечены по крайней мере десять ферментов [12]. У диких штаммов синтез данных ферментов, локализованных в четырех пространственно разделенных оперонах, репрессирован, однако можно выделять мутанты с дерепрессией этих оперонов. Мутанты такого типа при высеве на минимальную среду М9 образуют сильно ослизненные колонии [4, 5, 10—12, 15, 16]. Механизмы регуляции биосинтеза колановой кислоты остаются невыясненными. Определенный интерес, в частности, вызывает изучение влияния белоксинтезирующего аппарата на гиперпродукцию этого экзогенного полисахарида.

Настоящая работа посвящена изучению влияния различных стрептомицинзависимых (СМ-з) мутаций, затрагивающих структуру S12 белка рибосом, на биосинтез ВПС у E. coli K-12.

Материал и методика. Характеристики бактериальных штаммов, использованных в работе, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика штаммов E. coli K—12, использованных в работе

Наименование бактериального штамма	Генотип				Примечание
	lac	thi	lon	rpsL	
мук 154–2	—	—	—	+	[4]
19—180	—	—	—	19*	
29—180	—	—	—	29	См-з дериваты
42—180	—	—	—	42	штамма СА180
45—180	—	—	—	45	[6]
77—180	—	—	—	77	
84—180	—	—	—	84	
90—180	—	—	—	90	
92—180	—	—	—	92	

* — тип СМ-з аллеля.

Применялись бактериофаги PIкс из лабораторных штоков и М 59, полученный от Стирма [17]. Использовались синтетическая среда М9 [1] с необходимыми добавками факторов роста и Т-среда [2] для осуществления трансдукции. Трансдукционный перенос СМ-з мутаций из дериватов штамма СА180 в штамм мук154-2 осуществлялся при помощи фага PIкс по Ленноксу [14]. Отбор стрептомициновых трансдуктантов производился по методу Лебоя с соавт. [13].

Биосинтез ВПС проводился в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл с объемом питательной среды 60 мл на качалке 180—200 об/мин при 37° в течение 72 часов. В качестве питательной среды использовались минимальная среда М9 с содержанием 10% глюкозы и 200 мкг/мл стрептомицина при ферментации СМ-з трансдуктантов. Для получения водных растворов ВПС, синтезированных исследуемыми штаммами, ферментационная жидкость освобождалась от бактерий 3-минутным кипячением с последующим центрифугированием в течение 20—30 мин при 3500—4000 об/мин. Надосадочная жидкость обрабатывалась двухкратным объемом ацетона и центрифугировалась при 3000 об/мин 10—15 мин. Осадок ресуспендировали в 60 мл воды и диализовали против дистиллированной воды. Полисахариды вновь осаждались 2-кратным объемом ацетона, и осадок ресуспендировался в исходном объеме воды. Динамическая вязкость этих растворов определялась вискозиметром по методу Гепплера и выражалась в сантипаузах (спз). Количество синтезированных ВПС определялось после лиофилизации водных растворов полисахаридов по сухой массе.

Кинетика зависимости адсорбции фага М59 от времени оценивалась по титру неадсорбированного фага в культуральной жидкости исследуемых штаммов. Для определения титра неадсорбированного фага к 10 мл культуры, выращенной в среде М9 и достигшей логарифмической фазы роста (3—5$\times 10^8$ кл/мл), добавлялось 10 мл предварительно оттитрованного фага (конечная концентрация 1×10^5 ч/мл). Смесь инкубировалась в ультратермостате при 37°, и через каждые две минуты брались пробы для титрования фага, куда добавлялись 2—3 капли хлороформа. Титр неадсорбированного фага определялся подсчетом количества образованных негативных колоний (НК). Константа скорости адсорбции вычислялась по Адамсу [1].

Результаты и обсуждение. В качестве исходного штамма использован выделенный нами ранее продуцент колановой кислоты мук 154-2. Сверхсинтез ВПС у этого штамма обусловлен мутационным изменением

в lon гене, который, как предполагается, участвует в регуляции синтеза колановой кислоты [4]. Для изучения влияния различных СМ-з мутаций на продукцию ВПС методом трансдукции были сконструированы изогенные варианты штамма мук 154-2, отличающиеся только по типу СМ-з мутаций. У сконструированных штаммов проводился сравнительный количественный анализ биосинтеза ВПС с применением глубинного способа культивирования. Проверялась также величина вязкости водных растворов полисахаридов. Результаты исследования вязкости и продукции ВПС у СМ-з трансдуктантов штамма мук 154-2 представлены в табл. 2, из которой следует, что наличие СМ-з мутаций при-

Таблица 2

Сравнительное определение биосинтеза ВПС у СМ-з трансдуктантов штамма мук 154-2

Наименование СМ-з трансдуктантов	Тип МС-з мутаций	Титр бактерий в конце ферментации, $\times 10^8$ кл/мл	Количество ВПС, мг/мл	Вязкость, сиз
мук 154—2	+	88,0	11,0	6,9580
Д 219	19	4,7	4,1	2,2806
Д 229	29	6,9	3,1	1,7892
Д 242	42	4,8	4,0	2,2092
Д 245	45	8,7	4,7	2,4948
Д 277	77	6,2	5,8	3,0038
Д 284	84	4,8	5,1	2,5452
Д 290	90	9,1	6,0	2,9980
Д 292	92	5,2	3,5	2,0412

водит к понижению уровня биосинтеза ВПС. При этом соответственно уменьшается и величина вязкости водных растворов. Обнаружено также, что титр жизнеспособных клеток к концу ферментации у СМ-з штаммов более чем на порядок ниже по сравнению с таковым исходного штамма мук 154-2, хотя строгой корреляции между титром и выходом ВПС у СМ-з штаммов не наблюдается. Не исключено, что единичная клетка мутантных культур синтезирует колановую кислоту на уровне клеток штамма мук 154-2 и низкий уровень количества ВПС может быть обусловлен их малой численностью у СМ-з штаммов.

Для выяснения этого вопроса проверялись степень адсорбции, морфология НК и эффективность посева вирулентного для E. coli бактериофага М59, специфически связывающегося с колановой кислотой (табл. 3). Этот фаг способен размножаться лишь на ослизненных штаммах, образуя при этом специфические НК, окруженные ободком, и не размножается на диких штаммах E. coli. Колановая кислота является не только рецептором для фага М59, но и субстратом для специфической деполимеразы, которой буквально нашпигован отросток фага. После проникновения фага в бактериальной клетке индуцируется биосинтез этой деполимеразы. Ободок НК образуется в результате разложения полисахаридов, окружающих истинно негативные колонии фага, сво-

Таблица 3

Кинетика адсорбции и эффективность посева бактериофага М 59 на исследуемых штаммах

Штаммы	Эффективность посева фага*	Размер НК фага, мм	Константа скорости адсорбции фага $\gamma \frac{1}{10^9}$ кл/мл
мук 154—2	1,00	12—14	9,1
Д 219	0,95	6—7	3,9
Д 229	0,96	5—6	2,4
Д 242	0,99	6—7	3,8
Д 245	1,00	6—7	4,9
Д 277	1,00	7—9	6,9
Д 284	0,97	7—9	5,4
Д 290	1,00	7—9	6,1
Д 292	1,00	5—6	2,5

* — рост фага М 59 на исходном ослизненном штамме мук 154-2 принят за 1,00.

бодной, не связанной с фагом деполимеразой. Предполагается, что размер и форма НК фага, а также скорость его адсорбции зависят от количества экзогенного полисахарида в капсуле клетки. Как видно из табл. 3, на всех исследуемых нами штаммах фаг М59 образует более мелкие НК, чем на исходном ослизненном штамме.

Можно заметить также, что СМ-з мутации существенно влияют на константу скорости адсорбции М59. Эффективность же посева при этом не меняется.

Кинетика адсорбции фага М59 также существенно изменяется в зависимости от типа СМ-з мутаций (рис.), но независимо от этого все кривые адсорбции имеют экспоненциальный характер, что свидетельствует о стабильности синтезируемых полисахаридов. При этом максимальный уровень адсорбции не изменяется, чем и обусловлена одинаковая эффективность посева М59 на этих штаммах. Сопоставление вышеприведенных данных о количестве синтезируемых ВПС с адсорбцией фага М59 при одинаковой эффективности посева говорит о том, что СМ-з мутации приводят к уменьшению количества ВПС, синтезированных каждой клеткой, а следовательно, и культурой в целом.

Изучаемые СМ-з мутации, затрагивающие структуру S12 белка рибосом, обладают широким плейотропным проявлением [3, 6]. Они приводят к изменению морфологических и физиолого-биохимических свойств клетки. В настоящей работе удалось показать, что СМ-з мутации наряду с известными свойствами могут приводить к снижению уровня биосинтеза ВПС как каждой клеткой, так и культурой в целом. Обнаруженные закономерности регуляции биосинтеза ВПС под действием мутаций, приводящих к устойчивости к стрептомицину, могут иметь важное практическое значение, так как этот антибиотик и устой-

чивые к нему штаммы широко применяются при конструировании штаммов продуцентов.

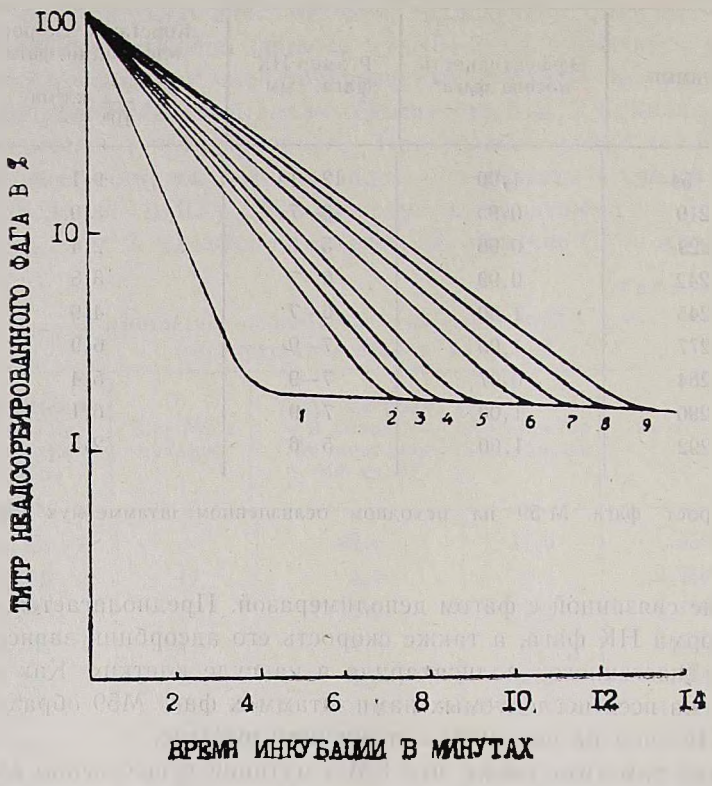

Рис. Кинетика адсорбции фага М59 на исследуемых штаммах. Обозначение штаммов: 1—мук154-2, 2—Д277, 3—Д290, 4—Д284, 5—Д245, 6—Д219, 7—Д242, 8—Д292, 9—Д229.

Научно-исследовательский технологический институт
аминокислот, НИТИА, г. Ереван

Поступило 23.III 1983 г.

ՍՏՐԵՊՏՈՄԻՑԻՆԻՑ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊՈԼԻՍԱԽԱՐԻԴՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ ESCHERICHIA COLI K—12 ԼՈՐՁԱՎՈՐ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա. Հ. ԲԱՐՍԵՂՅԱՆ, Հ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Ստրեպտոմիցինից կախվածություն ունեցող մուտացիաների առկայության դեպքում E. coli-*ի լորձավոր մուտանտների մոտ իջնում է պոլիսախարիդների սինթեզման մակարդակը։ Այդ պատճառով փոփոխություններ են առաջանում նաև պոլիսախարիդների հանդեպ սպեցիֆիկություն ունեցող* M59 *բակտերիոֆագի ադսորբցիայի արագության և նրա առաջացրած նեգատիվ գաղութների ձևի և մեծության մեջ։*

THE INFLUENCE OF STREPTOMYCIN-DEPENDENCE ON THE BIOSYNTHESIS OF POLYSACCHARIDES IN MUCOUS MUTANTS OF *ESCHERICHIA COLI* K-12

A. H. BARSEGYAN, H. G. OGANESSIAN

It has been shown that the presence of streptomycin-dependent mutations decreases the level of biosynthesis of extracellular polysaccharides and viscosity of cultural liquid of mucous strains of *E. coli*. The mutations influence also on the size of negative colonies and the adsorption kinetics of the phage M59, which is in specific connection with extracellular polysaccharides.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адамс М.* Бактериофаги. М., 1961.
2. *Барсегян А. А., Оганесян Г. Г., Оганесян М. Г.* Биолог. ж. Армении, *36*, 6. 1983.
3. *Кудлай Д. Г., Чубуков В. Ф., Оганесян М. Г.* Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М., 1972.
4. *Оганесян Г. Г.* Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, Ереван, 1970.
5. *Оганесян Г. Г., Барсегян А. А., Паглеванян Г. Р.* Тез. докл. IV съезда ВОГиС, Кишинев, 1, 348, 1982.
6. *Оганесян М. Г., Барегамян И. Н.* Биолог. ж. Армении, *27*, 16, 1974.
7. *Anderson E. S., Rogers A. H.* Nature, *198*, 714, 1963.
8. *Goebel W. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *49*, 464, 1963.
9. *Grant W. D., Sutherland I. W., Wilkinson J. F.* J. Bacteriol., *100*, 1187, 1969.
10. *Hamelin C., Chung Y. S.* Bacteriol., *122*, 19, 1975.
11. *Howard-Flanders P., Symson E., Theriot L.* Genetics, *49*, 237, 1964.
12. *Hua S., Markovitz A.* J. Bacteriol., *100*, 1089, 1972.
13. *Leboy R., Cox E. L., Flaks I.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *52*, 1967, 1964
14. *Lennox E.* Virology., *1*, 190, 1955.
15. *Markovitz A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *51*, 239, 1964.
16. *Molnar J., Holland J. B., Mandi J.* Genet. Res., *30*, 13, 1977.
17. *Stirm S., Bessler W., Fehmel F., Freund-Molbert E., Thurow H.* Zenbralblatt Bacteriologi scheu Hygiene I. Abt. Orig. *A*, *266*, 26, 1974.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 12, 1983

УДК 611.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИОРГАННОГО КРОВЕНОСНОГО РУСЛА ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА

Дж. Г. ИСААКЯН, А. В. АЗНАУРЯН, Л. А. МАНУКЯН

Приводится описание внутриорганного кровеносного русла лимфатического узла, отличительных особенностей строения внутриорганного кровеносного русла коркового и мозгового отделов, связанного с функциональными особенностями данных отделов, отмечается связь внутриорганных сосудов лимфатического узла.

Ключевые слова: лимфатический узел, кровеносное русло, строма.