

СЕЛЕКЦИЯ ПОЛИСАХАРИДСВЕРХСИНТЕЗИРУЮЩИХ МУТАНТОВ У *ESCHERICHIA COLI* K-12 С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ

Г.Г. ОГАНЕСЯН, Л.С. ХАЧАТРЯН, С.С. ОГАНЕСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, Абовян

Разработан высокоэффективный метод селекции полисахаридсверх-синтезирующих мутантов у *Escherichia coli* K-12 с помощью бактериофагов P1, T2 и T4. Мутанты, сохраняя чувствительность к соответствующим бактериофагам, приобрели способность синтезировать гетерополисахарид - коланиковую кислоту с выходом более 6 мг/мл.

Մշակվել է *E. coli* K-12-ի քաղաքացուր գերսինթեզող մուտանտների ստացման արդյունավետ եղանակ P1, T2 և T4 բակտերիոֆագերի օգնությամբ: Ստացված մուտանտները, մնալով զգայուն համապատասխան ֆագերի նկատմամբ, ձևացնում են բերույթ ունակություն արտադրություն կոլանիկային թթու կազմող բազմաշաքարը մինչև 6 մգ/մլ:

The efficient method has been worked out for selection of polysaccharide overproducing mutants of *E. coli* K-12 by bacteriophages P1, T2 and T4. The mutants, possessed the sensitivity to mentioned bacteriophages, were able to synthesize the colanic acid polysaccharide with yield of 6mg/ml.

Escherichia coli K-12 - селекция слизистых мутантов - бактериофаг

Микробные полисахариды (ПС) благодаря своему качеству менять реологические свойства воды находят широкое применение в самых различных отраслях промышленности [4,5]. Полисахаридпродуцирующие штаммы обнаружены у многих видов микроорганизмов. Они были выделены главным образом из природных источников или из лабораторных коллекций. Единой стратегии селекции продуцентов не существует из-за сложного, многоступенчатого механизма регуляции биосинтеза полисахаридов. Гены, участвующие в этом процессе, кроме индивидуальной регуляции подвергаются также глобальной координированной регуляции типа регулона. Единичная мутация способна повысить активность десятков разрозненных генов, участвующих в биосинтезе ПС [8]. У *E.coli* K-12 обнаружены, по крайней мере, три локуса *capR* (*lon*), *capS* и *capT*, мутации в которых приводят к обильному биосинтезу ПС [4,8]. Слизистая морфология колоний является главной отличительной чертой этих мутантов. Мутации, приводящие к обильному синтезу ПС, можно индуцировать с помощью УФ-лучей [8], антибиотиков [5,9] и термшока [4]. Однако все они индуцируют мутации главным образом *capR* (*lon*) типа.

С целью получения новых продуцентов полисахаридов у кишечной палочки в качестве индуцирующих агентов нами применялись вирулентные и умеренные бактериофаги.

Материал и методика. Бактерии и бактериофаги. В работе использованы штаммы *E.coli* C4154 *lppH* (*lacZ*, *la*), вирулентные бактериофаги T2 и T4, умеренный бактериофаг P1,

бактериофаг М59, вирулентный по отношению к слизистым штаммам *E. coli*, - все из музея лаборатории генетики Института микробиологии НАН Армении.

Питательные среды. Полноценный бульон фирмы "Seriva" (ФРГ), полноценная твердая среда с содержанием 1,5 и 0,6% агара. Ферментационные среды (г/л): а) синтетическая: KH_2PO_4 - 3, Na_2HPO_4 - 6, NH_4Cl - 1, MgSO_4 - 0,13, тиамин - 0,001, глюкоза - 20, CaCO_3 - 20; б) неполноценная: дрожжевой экстракт - 8, пептон - 3, NaCl - 5, глюкоза - 20, CaCO_3 - 20, pH 7,2. Пептонная вода (г/л): пептон - 10, NaCl - 5. Фосфатный буфер - pH 6,8.

Фаголизаты были получены методом агаровых слоев [1].

Получение слизистых мутантов. Культуру выращивали в пептонном бульоне (ПБ) до экспоненциальной фазы роста ($1-3 \times 10^8$ кл/мл), заражали фагом и высевали методом агаровых слоев. Чашки инкубировали двое суток при 37°. Выросшие на фоне сплошного лизиса слизистые колонии переносили отколом в жидкую среду, встряхивали для отделения клеток от фага и высевали на полноценный агар.

Чувствительность к фагам определяли спот-тестом, нанесением суспензии 10^6 инфекционных единиц (ИЕ) на газон индикаторной культуры.

Чувствительность к УФ-облучению определяли по ранее описанной методике [2].

Биосинтез полисахаридов производили в 250 мл колбах Эрленмейера, содержащих 20 мл питательной среды, на реципрокной качалке (150 об/мин) при 30° в течение 72 часов.

Количество биомассы определяли взвешиванием, после осаждения клеток центрифугированием, по общепринятой методике.

Определение выхода ПС. После завершения ферментации культуральную жидкость (КЖ) выдерживали в кипящей бане в течение 3 мин и подвергали центрифугированию (3000 об/мин). К супернатанту добавляли двойной объем охлажденного ацетона и смесь выдерживали при комнатной температуре 18 ч. образовавшийся преципитат отделяли, промывали 67%-ным ацетоном, затем осадок ресуспендировали в деионизированной воде. Обливи сахар в осадке определяли фенол-сернокислым методом, а вязкость водных растворов ПС - по Геплеру [3].

Результаты и обсуждение. Для получения слизистых мутантов были использованы бактериофаги *E. coli* P1, T2 и T4. Множественность заражения (МЗ) изменялась от 0,01 до 10. В каждом случае высея инфицированных фагом бактерий производили методом агаровых слоев на 10 чашках. Частоту выхода мутантов определяли делением всего количества обнаруженных слизистых колоний на суммарный титр бактерий, нанесенных на чашки (табл. 1).

Таблица 1. Выход слизистых колоний на фоне сплошного лизиса культуры CA154, вызванный бактериофагами P1, T2 и T4

Бактериофаг	МЗ	Количество выросших колоний на 10 чашках	Количество слизистых колоний на 10 чашках	Титр бактерий в каждой чашке	Чистота выхода слизистых мутантов
P1кс	10	2	0	$4,1 \times 10^5$	0
	1	183	134	—	$2,6 \times 10^{-6}$
	0,1	270	263	—	$3,7 \times 10^{-6}$
	0,01	5	0	—	0
T2	10	0	0	$5,7 \times 10^5$	0
	1	124	124	—	$2,2 \times 10^{-6}$
	0,1	161	154	—	$2,8 \times 10^{-6}$
	0,01	2	0	—	0
T4	10	3	0	$6,5 \times 10^5$	0
	1	180	178	—	$2,7 \times 10^{-6}$
	0,1	214	210	—	$3,2 \times 10^{-6}$
	0,01	4	0	—	0

Как видно из табл. 1, слизистые колонии образуются только при МЗ 0,1 и 1,0. При 0,01 и 10 они не были обнаружены. Средний спонтанный

выход мутантов при МЗ 0,1 был в 1,5 раза выше, чем при 1,0. Частота получения слизистых мутантов $(2-4) \times 10^{-6}$ была в 100 раз выше, чем обычных фагоустойчивых мутантов. Индукция мутантов не зависела от природы бактериофага.

Слизистые мутанты были выделены и после многократной очистки определен их иммунитет к фагам, с помощью которых они были получены, а также к УФ-лучам и фагу М59, лизирующему только капсулированные клетки, продуцирующие коланиковую кислоту (табл.2) [10].

Таблица 2. Чувствительность слизистых мутантов штамма СА154 к бактериофагам и УФ-облучению

Бактерия хозяин	Чувствительность к бактериофагам				Относительная чувствительность к дозе УФ 10 Дж/м ²
	P1	T2	T4	M59	
СА154	+++	+++	+++	-	1
Мук P1*	+++	+++	+++	+++	1,25
Мук T2*	+++	+++	+++	+++	1,16
Мук T4*	+++	+++	+++	+++	1,22

Примечание: * - тестирование по 10 мутантов, полученных соответствующим фагом, (-) - отсутствие лизиса; (+ + +) - хороший лизис.

Как видно из табл.2, слизистые мутанты, выделенные на фоне сливного фаголизиса, не обладали иммунитетом к соответствующим фагам. По-видимому, клетки, предрасположенные к мутации в сторону сверхсинтеза внеклеточных полисахаридов, обладают также временным иммунитетом к фаголизису. Гены, регулирующие биосинтез внеклеточных полисахаридов, отличаются нестандартным поведением. Они мутируют под влиянием агентов, которые не являются мутагенными по отношению к другим генам [4,9]. Возможно, в фаголизатах или в самих фагах имеются вещества, реагирующие с регуляторными участками генов биосинтеза полисахаридов, способные вызывать мутационные изменения в них. Эти участки должны отличаться особым строением, способным реагировать на действие фагов - прямо или опосредованно.

Все слизистые мутанты оказались чувствительными к бактериофагу М59, что свидетельствует о том, что синтезируемый мутантами полисахарид является коланиковой кислотой. Этот кислый полисахарид состоит из фруктозы, галактозы, глюкозы и глюкуроновой кислоты в молярных соотношениях 2:2:1:1 соответственно [7].

С целью определения продуктивности слизистых штаммов была проведена ферментация на синтетической и полноценной средах. Ферментация длилась 72 ч, по завершении ее определялись выход полисахаридов, вязкость водных растворов полисахаридов и объем, равном объему КЖ, и выход биомассы. Результаты опытов приведены в табл.3.

Выход целевого продукта у слизистых мутантов составлял в синтетической среде около 5,5 мг/мл, а в полноценной - 4,3 мг/мл. Разница всего в 20% означает, что уровень биосинтеза полисахаридов у них мало

зависит от концентрации азота в среде. Это дает определенное преимущество в промышленных условиях, т.к. позволяет использовать дешевые питательные среды с высоким содержанием азота.

Таблица 3. Биосинтез полисахаридов слизистыми мутантами при росте на синтетической и полнорценной средах

Среды	Штамм	Выход ономассы, мг/мл	Выход ПС, мг/мл	Вязкость 0,1% водной суспензии ПС, СПЗ'
Синтетическая	CA154	2,51	0,02	-
	Мук Р1	2,56	5,62	0,8246
	Мук 12	2,41	5,38	0,8242
	Мук 14	2,62	5,71	0,8246
Полнорценная	CA154	2,86	0,01	-
	Мук Р1	2,82	4,45	0,8244
	Мук 12	2,79	4,16	0,8245
	Мук 14	2,69	4,22	0,8244

Одинаковая вязкость растворов полисахаридов (0,1%) свидетельствует о том, что мутанты продуцируют полимеры одинакового состава и структуры.

Индукцированные бактериофагами мутанты не относятся к *lon*-классу слизистых мутантов, т.к. их чувствительность к УФ-облучению не увеличивается (табл.2). Они даже обладают большей устойчивостью, чем исходный штамм CA154. Это связано со сверхсинтезом полисахаридов, которые, как было ранее показано, обладают протекторным действием [6].

Бактериофаги специфически индуцировали только мутации, приводящие к слизистому фенотипу колонии. Среди более 500 проверенных мутантов, вышедших в присутствии фагов, ни один не нуждался в дополнительных факторах роста, т.е. не обладал ауксотрофным фенотипом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Барсегян А.А., Оганесян Г.Г., Оганесян М.Г. Биолот. журн. Армении, 36, 6, 479-484, 1983.
3. Барсегян А.А., Оганесян Г.Г. Биолот. журн. Армении, 36, 12, 1136-1941, 1983.
4. Оганесян Г.Г., Пахлеванян Г.Р. Авт. свид. СССР N 1171523, 1985.
5. Патент США, N 4235966, 1980.
6. Donch J., Greenberg J. Mutat. Res., 10, 153-155, 1970.
7. Goebel W.F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 49, 464-471, 1963.
8. Markovitz A. In: Surface carbohydrates of procariotic cells. Sutherland I., N.Y., Acad. Press, 415-467, 1977.
9. Molnar J., Holland I.B., Mandi Y. Genet. Res. Camb., 30, 19-20, 1977.
10. Stirm S., et al. Zentralblatt. Bacteriologischen Hygiene J. Abt. Orig., A 266, 26-28, 1974.

Поступила 12.V.1977