

УДК 576.809.518

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. Д. Азатян, А. М. Диланян, Б. Б. Вартамян

О действии 3,6-диметилоктин-4-диола-3,6 на колициногенные штаммы Фредерика

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. К. Паносяном 10/VII 1972)

Продолжая изучение биологической активности 3,6-диметилоктин-4-диола-3,6 на различные штаммы *E. coli* ⁽¹⁾, в настоящей работе мы поставили перед собой задачу проверить действие этого гликоля на колициногенные факторы эталонных штаммов Фредерика.

Бактериоциногенные системы позволяют путем простых визуальных тестов проследить за внутриклеточным образованием и выделением в окружающую среду белковых веществ (бактериоцинов), которые можно рассматривать как результат синтеза нового белка, индуцированного экзогенным фактором. Бактериоциногенные системы считают ⁽²⁾ перспективными объектами для исследования биосинтетических процессов на молекулярном уровне. Воспроизведение ингибиторного эффекта на обычных питательных средах позволяет использовать эти системы для изучения механизмов регуляции белкового синтеза. Установлено, что синтез колицина может быть индуцирован акрифлавином, акридином оранжевым, генциан-виолетом и кристалвиолетом ⁽³⁾. Акридиновые, некоторые основные красители и другие факторы (УФ) могут действовать то как агенты, элиминирующие эписомы-внехромосомные детерминанты наследственности, то как индукторы ⁽⁴⁾. Элиминация эписом, в том числе R-факторов, акридиновыми красителями проводится в эксперименте, но из-за их токсичности для организма они практически не применимы ⁽³⁾. Отмечают ⁽⁵⁾, что A и V колфакторы могут быть элиминированы акрифлавином.

Действие 3,6-диметилоктин-4-диола-3,6 проверялось на пятнадцати эталонных колициногенных штаммах Фредерика, а индикаторной культурой служила *E. coli* K12S. Гликоль добавлялся к питательному агару в концентрациях от 0,1 до 0,8%. Параллельно ставились опыты и без добавления его к питательной среде (контроль). Каждый опыт ставился тоекратно, и нами приводятся средние данные от трех опытов. Колициногенность культур определялась методом укола (Frederleq, 1957 г.) ⁽⁴⁾. При росте культур на питательном агаре с различными концент-

рациями испытуемого глицоля и без него были приготовлены мазки из макроколониин колициногенных культур и окрашены по Граму для микроскопического исследования.

Различные колициногенные штаммы энтеробактерий реагировали на различные концентрации 3,6-диметилоктин-4-диола-3,6 по-разному. Полученные данные приведены в табл. 1. Для иллюстрации приведены также фотограммы контроля (МПА) и зон задержки роста культуры *E. coli* K12S при действии 0,5% глицоля, а также четыре микрофотограммы мазков (рис. 1 и 2).

Экспериментальный материал условно разделен на три группы. Как видно из табл. 1, в первую группу включены три штамма: *E. coli* CA7, продуцирующий колицин типа V, *E. freundii* CA=31-колицин типа A, и *E. coli* CA=46-колицин типа G. 3,6-диметилоктин-4-диол-3,6 ингибировал колицинообразование у этих культур. Особенно сильное действие оказывали 0,4% его на *E. coli* CA=7 (колфактор V), а более высокие концентрации оказывали бактерицидное действие. Сравнительно слабой колицинообразующей способностью обладает *E. freundii* CA=31; но эта культура продуцировала при концентрации 0,4% глицоля колфактор диаметром 8 мм и теряла эту способность при 0,5%-ной концентрации глицоля.

Обладающий более слабой колицинообразующей способностью *E. coli* CA=46 (колфактор G.) при наличии в среде 0,3% ацетиленового глицоля лишается способности продуцировать колицин.

Таким образом, 3,6-диметилоктин-4-диол-3,6 является ингибитором или элиминирующим агентом колфакторов V, A и G. По-видимому, по

Таблица 1

Действие различных концентраций 3,6-диметилоктин-4-диола-3,6 на эталонные колициногенные штаммы Фредерика

№№ по порядку	Продуценты колицинов	Типы колицинов	Условные группы	Контроль	Концентрация глицоля, %							
					0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
					Зона задержки индикаторного штамма K12, мм							
1	<i>E. coli</i> CA=7	V	I	40	40	32	16	0	0	Нет роста		
2	<i>E. freundii</i> CA=31	A	I	22	22	16	10	8	0	Опыт не поставлен		
3	<i>E. coli</i> CA=46	G	I	14	10	10	0	0	0			
4	<i>E. coli</i> K=235	K	II	32	30	30	26	26	20	Очень слабый рост		
5	<i>E. coli</i> CA=42	F	.	30	30	26	24	24	22			
6	<i>E. coli</i> K=30	E1+V	.	30	30	26	14	12	10	Нет роста		
7	<i>Sh. sonnei</i> P9	E2+I	.	30	26	26	26	26	22	18мм Очень сл. рост		
8	<i>E. coli</i> CA=38	E3+I	.	30	30	30	28	28	26	24мм		
9	<i>Paracoli</i> CA=62	J+I	.	23	22	26	24	20	16	Опыт не поставлен		
10	<i>E. coli</i> CA=53	I	.	20	20	20	14	14	10	Очень слабый рост		
11	<i>Sh. boydii</i> P=1	S1	.	28	28	28	28	26	18			
12	<i>E. coli</i> CA=23	D	.	28	28	26	24	22	22			
13	<i>Paracoli</i> CA=57	C	.	18	16	18	18	10	8			
14	<i>Sh. dysenteriae</i> P14	S5	III	30	28	28	28	28	30	Опыт не поставлен		
15	<i>E. coli</i> CA=18	B	.	28	28	28	26	26	26	Очень слабый рост		

биохимическому составу, в частности по белковому составу, и структуре эти три типа колицинов сходны. Возможно, гликоль включается в начальную стадию биосинтеза пептидной цепочки образуя такой внутриклеточный комплекс, который ингибирует, блокирует биосинтез колфакторов V, A и G, или, соединяясь с терминальной частью пептидной цепи, меняет направленность биосинтетических процессов, в результате чего происходят сдвиги в белковом обмене—меняется функциональная морфология бактериальных клеток в популяции. Тем самым гликоль «излечивает» *E. coli*, восстанавливая нормальные физиологические функции при элиминации эписом колфакторов у штаммов первой группы. Возможно, колицинопродуцирующие особи данного штамма чувствительны к гликолю, погибают, а непродуцирующие колицины особи более резистентны, размножаются, образуя макроколонии (рис. I и II, колонии 1, 2 и 3).

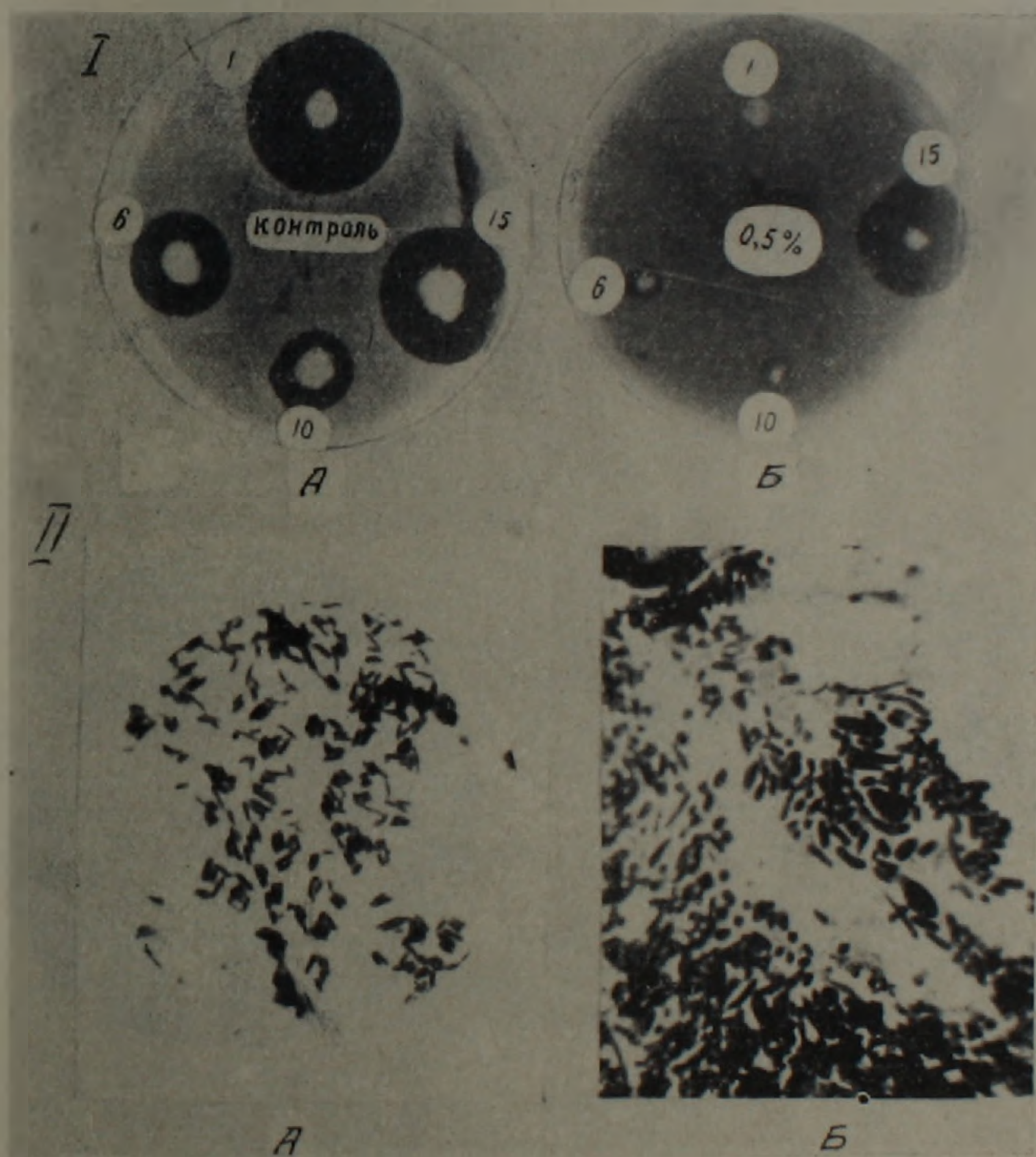


Рис. 1. I, А—контроль; Б—действие 0,5% гликоля на колициногенность культур: 1— *E. coli* СА=7; 6— *E. coli* К=30; 10— *E. coli* СА=53; 15— *E. coli* СА=18. II. Микроскопия мазков *E. coli* СА=7. Увелич. 90×15. А— МПА, контроль; Б— действие 0,5% гликоля

Морфологические особенности культуры *E. coli* СА=7 (col V) при росте на МПА с различными концентрациями гликля и без него (контроль) следующие. Микроскопия мазков контрольной культуры показала грамотрицательные, полиморфные палочки с закругленными концами, расположенные одиночно и парно, параллельно друг другу или под углом (рис. 2, а, б). При выращивании же этой культуры на МПА с 0,1% гликля наблюдается сравнительно слабое окрашивание бактериальных клеток. При увеличении концентрации гликля (0,2—0,4%) величина бактериальных клеток уменьшается: вместо мелких полиморфных палочек появляются кокковидные формы. При наличии 0,5% гликля наблюдаются гигантские колбовидные формулы со свет-

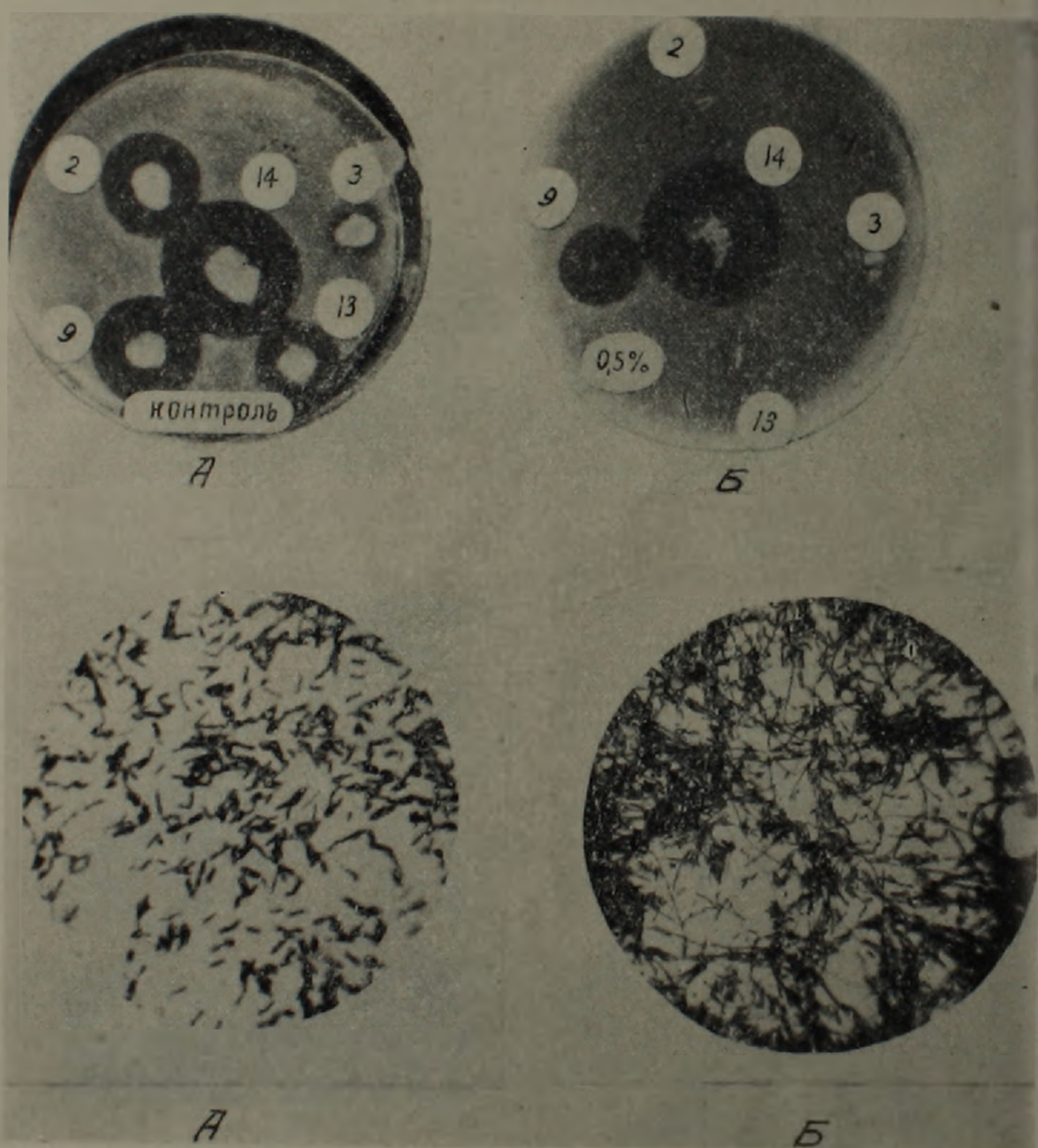


Рис. 2. I, А—контроль; 2— *E. freundii* СА=31; 3— *E. coli* СА=46; 9— *Paracoli* СА=62; 13— *Paracoli* СА=57; 14— *Sh. dispar* P14. II. Микроскопия мазков *E. coli* СА=23. А—контроль. Увелич. 90×10 . Б—действие 0,5% гликля. Увелич. 90×15

лой шейкой, удлиненные эллипсоидальные, макро- и микрояйцевидные и шаровидные формы, удлиненные и утолщенные формы с зернистостью (рис. 2,б). Наряду с гигантскими клетками были и очень мелкие кокковидные формы. При росте на МПА *E. freundii* CA=31 (col A) наблюдались грамтрицательные, полиморфные палочки и нитевидные формы. При наличии в питательной среде 0,1—0,3% гликоля в поле зрения микроскопа не встречались нитевидные формы, но местами полиморфные грамтрицательные палочки располагались друг за другом в виде прерывистой цепочки: на одном конце удлиненные, а на другом—очень мелкие палочки. При росте в присутствии 0,4% гликоля обнаружены грамтрицательные полиморфные палочковидные клетки, редко—утолщенные нити—«дрожжеподобные» формы; местами наблюдалась внутриклеточная зернистость, а при 0,5% гликоля—грамтрицательные переплетенные нити. Микроскопия мазков *E. coli* CA=46 (col G) при росте на МПА показала грамтрицательные полиморфные палочки с белым ореолом, а при росте в присутствии 0,1—0,3% гликоля были видны грамтрицательные нежные палочки, редко—короткие и длинные нитевидные формы, наряду с «дрожжеподобными», по-видимому, L формами.

Таким образом, под влиянием ацетиленового гликоля колициногенные штаммы *E. coli* CA=7 (col V), *E. freundii* CA=31 (col A) и *E. coli* CA=46 (col G) претерпевают морфолого-функциональные изменения.

Из 15 изученных штаммов 10 (66,7%) колициногенных штаммов Фредерика включены во вторую группу. В примененных нами концентрациях ацетиленовый гликоль ингибирует колициногенные свойства эталонных штаммов Фредерика в различной степени, особенно проявляя это действие при 0,5 и 0,6% концентрациях. Наименее чувствительными оказались *E. coli* CA=38 (col E3+I), *Sh. sonnei* P9 (Col E2+I), а затем *E. coli* K=235 (col K) и *E. coli* CA=42 (col F); наибольшую же чувствительность проявила к гликолю *E. coli* K=30 (col E1+V): наличие 0,6% ацетиленового гликоля действует на эту культуру бактерицидно. Зона задержки роста индикаторной культуры при концентрациях 0,4 и 0,5%, по-видимому, обусловлена наличием колфактора E1. Остальные культуры в той или иной мере сохраняли колициногенные способности при концентрации 0,5% гликоля, а выше этой концентрации он действовал бактериостатически.

Микроскопия мазков, окрашенных по Граму, показала, что при росте культур в присутствии гликоля в концентрации 0,4 и 0,5%, а иногда и при 0,6%, наблюдаются морфологические изменения: густо переплетенные нитевидные формы (рис. 2), контуры палочек становятся нечеткими, в ряде случаев слабо окрашиваются дополнительной краской—фуксином, встречаются дрожжеподобные формы.

Два штамма включены в третью группу. Из таблицы и рисунков 1 и 2 видно, что 3,6-диметилэтилен-4-диол-3,6 способен также индуцировать колицинообразование у *Sh. dysenteriae* P14 (col S5) и *E. coli* CA=18 (col B); при этом величина макроколонии уменьшается с увеличением

концентрации этого индуцирующего агента, а диаметр зоны задержки роста индикаторной культуры не меняется.

Можно утверждать также, что в популяции гликоль оказывает бактерицидное действие на особи, лишенные колициногенных способностей, а колицинообразующие клетки этих штаммов не чувствительны к гликолю в пределах 0,5% его концентрации: они интенсивно синтезируют колицины типов S5 и B; последние диффундируют в окружающую питательную среду и выявляются индикаторной культурой. Микроскопия мазков штаммов третьей группы показала те же морфологические изменения, что и указаны выше.

Таким образом, 3,6-диметилоктин-4-диол-3,6 не влияет на колициногенные функции *Sh. dysag* P14 (col S5) и *E. coli* CA=18 (col B) и является индуктором колицинов S5 и B, селекционируя колициногенные особи, не чувствительные к этому веществу, в присутствии или с участием которого происходит биосинтез колицинов.

Подытоживая вышесказанное, можно отметить следующее.

3,6-диметилоктин-4-диол-3,6 обладает биологической активностью в отношении эталонных колициногенных штаммов Фредерика. Он является ингибитором или элиминирующим агентом колфакторов V, A и G, оказывает летальный эффект на колицинообразующие особи, и вытесняет в популяции особи, не продуцирующие колицин. Гликоль ингибирует образование колицинов в значительном проценте случаев (66,7%), но в различной степени. Он является индуктором колфакторов S5 и B, имеет бактерицидное действие на особи, лишенные колициногенных свойств, в то время как колицинпродуцирующие особи резистентны к гликолю, в присутствии которого интенсивно синтезируются колицины S5 и B. Гликоль вызывает морфологические изменения у колициногенных штаммов Фредерика, действует на клеточный аппарат деления-размножения бактерий и на клеточную стенку энтеробактерий.

Лаборатория химической физики

Академии наук Армянской ССР

Санитарно-эпидемиологическая станция

Абовянского района Министерства здравоохранения Армянской ССР

Վ. Դ. ԱԶԱՏՅԱՆ, Ա. Ս. ԴԻԱՆՅԱՆ Բ. Բ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

Ֆրեդերիկի կոլիցինաժին շտամների վրա 3,6-դիմեթիլօկտին-4-դիոլ-3,6-ի ազդեցության մասին

3,6-դիմեթիլօկտին-4-դիոլ-3,6-ն ազիքային ցուպիկների նկատմամբ ցուցաբերել է կենսաբանական ակտիվություն (¹): Հետաքրքիր էր պարզել այդ դիկոլի ազդեցությունը Ֆրեդերիկի էտալոնային շտամների կոլիցինաժին գործոնների վրա:

Ներկա աշխատանքում պարզված է, որ նշված ացետիլենային դիկոլն ազդում է Ֆրեդերիկի կոլիցինաժին էտալոնային որոշ շտամների վրա որպես արգելակիչ, վերականգնելով ազիքային ցուպիկների ֆիզիոլոգիական նորմալ

ֆունկցիաները: Ավելի մեծ թվով շտամներն այս կամ այն չափով պահպանում են իրենց կոլիցինաժին հատկությունները: Քլիկոլը հանդես է գալիս նաև որպես կոլիցինազոչացման հարուցիչ: Նա առաջ է բերում բակտերիալ բջիջների ճեղքանական փոփոխություններ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Կ Ր Ա Շ Ա Ն Ո Ւ Ջ ՈՒ Ն

¹ В. Д. Азатян, А. М. Диланян, ДАН Арм. ССР т. 56, № 2 (1973). ² В. Д. Тимдков, Предисловие книги Д. Г. Кудлай и В. Г. Лиходед «Бактериоциногенения», изд. «Медицина», Ленингр. отд., стр. 4. ³ Д. Г. Кудлай, В. Г. Лиходед, Б. М. Гурдо, Г. Б. Иидалко, С. Ф. Борукова, Тезисы доклада, IX Международный конгресс по микробиологии, 24—30 июня 1966 г., стр. 15. ⁴ Д. Г. Кудлай, Эписомы и инфекционная наследственность бактерий, Изд. «Медицина», стр. 148, 65, 1, 1969. ⁵ З. Лоркевич, М. Дерило, М. Фрелик, Элиминация и передача колициногенных факторов, в сборнике «Генетика микроорганизмов»; труды II симпозиума по генетике микроорганизмов, 20—24 июля 1965 г. стр. 226, изд. «Медицина», М., 1966.