

## ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКО-УСТОЙЧИВЫХ МУТАНТОВ У *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА

Н.Г. ГРИГОРЯН\*, А.А. БАРСЕГЯН\*, А.В. ТОПЧЯН\*\*, Г.Г. ОГАНЕСЯН\*\*

\*Институт микробиологии НАН РА, 2201, г. Абовян

\*\*Ерванский государственный медицинский университет им. М.Гераци

Налажен индуцированный нитрозогуанидином (НГ) мутагенез у *Lactobacillus acidophilus*. Наибольший выход мутантов был получен при концентрации НГ 300 мкг/мл при продолжительности обработки 60 мин. По сравнению со спонтанным фоном, НГ-индуцированный мутагенез повышал частоту устойчивых к стрептомицину и рифампицину мутаций в 10 и 100 раз соответственно. Полученные мутанты отличались широким спектром разнообразия морфологических, физиологических и биохимических признаков.

Ստանդարտացված նիտրոզոգուանիդինով (ՆԳ) ինդուկցված մուտացնեբը *Lactobacillus acidophilus* տեսակի մոտ: Մուտացումների ամենամեծ ելքը ստացվել է ՆԳ-ի 300 մգ/մլ խտության և 60 րոպե մշակման դեպքում: Ապոստան ֆոնի համեմատ ՆԳ-ով ինդուկցված մուտացնեբը բարձրացնում է ստրեպտոմիցինի և ռիֆամպիցինի հանդեպ կայուն մուտացիաների հաճախակաությունը համապատասխանաբար 10 և 100 անգամ: Ստացված մուտացումները առանձնանում են մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկանիշների լայն բազմազանությամբ:

Induced by nitrosoguanidine (NG) mutagenesis has been elaborated for *Lactobacillus acidophilus*. The highest yield was observed at the dose of NG 300 mg/ml and exposure for 60 min. In comparison with spontaneous background level the NG induced mutagenesis increased frequency of streptomycin and rifampicin resistant mutation 10 and 100 fold respectively. Broad spectrum of diversity of morphological, physiological and biochemical properties was revealed.

### Молочнокислые бактерии - нитрозогуанидин - мутагенез - антибиотико-устойчивость

В настоящее время получение антибиотикоустойчивых мутантов у пробиотических лактобактерий приобрело важное практическое значение. Известно, что антибиотико-устойчивые мутации, обладающие плеiotропным действием, помимо устойчивости к антибиотику, вызывают изменения целого ряда свойств, включая морфологию колоний, скорость роста, чувствительность к температуре, синтез экзополисахаридов, эффективность плазмидной трансформации и др. [2, 3]. Антибиотико-устойчивые мутанты с плеiotропным проявлением описаны у *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum* и др. [5, 6, 8]. Такие мутации могут служить эффективным инструментом для отбора культур лактобактерий с

улучшенными технологическими свойствами.

Цель настоящей работы - оптимизация условий нитрозогуанидин-индуцированного мутагенеза у молочнокислых бактерий для повышения выхода устойчивых к стрептомицину (СМ) и рифампицину (РФ) мутантов с плейотропным проявлением.

**Материал и методика.** Объектом исследований послужила бактериальная культура *Lactobacillus acidophilus* АН440, выделенная нами из кисломолочного продукта "мацури", и идентифицированная по соответствующим дифференцирующим признакам по Берги [4]. Исследуемая культура отличалась сравнительно высоким исходным уровнем устойчивости к антибиотикам.

Определение уровня чувствительности исходного штамма к СМ и РФ проводили в МРС бульоне с добавлением различных концентраций антибиотиков. Мутагенез проводили по известной методике [1], с некоторой модификацией. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста ( $10^9$  кл/мл), путем центрифугирования переносили в цитратный буфер (рН-5,5) и обрабатывали ИГ, затем дважды отмывали от ИГ осаждением при 3000 об/мин и полученную клеточную суспензию высевали на агаризованную среду МРС, содержащую ингибирующие концентрации СМ и РФ, и инкубировали при температуре 37°. Выросшие колонии методом серийных пересевов очищали на средах с соответствующими антибиотиками. У мутантов проверяли перекрестную устойчивость к антибиотикам и сохранность морфологических, физиолого-биохимических признаков исходного штамма.

**Результаты и обсуждение.** Перед проведением ИГ-индуцированного мутагенеза у культуры *L. acidophilus* была определена чувствительность к соответствующим антибиотикам. Пробирки со средой МРС, содержащие различные концентрации стрептомицина и рифампицина, инокулировали культурой *L. acidophilus* в конечной концентрации около  $10^6$  кл/мл. Ежедневно, в течение 5-ти дней, фиксировали рост культур по их помутнению (табл. 1.).

Таблица 1. Определение минимальных ингибирующих концентраций стрептомицина и рифампицина для *L. acidophilus* АН440 при росте в МРС при 37°

Тип антибиотика	Дни инкубации	Доза антибиотика, мкг/мл				
		10	20	30	40	50
СМ	1	+	-	-	-	-
	2	++	+	-	-	-
	3	+++	++	+	-	-
	4	+++	+++	++	+	-
	5	+++	+++	+++	++	-
РФ	1	-	-	-	-	-
	2	++	-	-	-	-
	3	+++	++	++	-	-
	4	+++	+++	+++	-	-
	5	+++	+++	+++	-	-

Обозначения: +++ - нормальный рост, ++ - ослабленный рост, + - слабый рост, - - отсутствие роста.

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что в нашем случае минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) для стрептомицина является 50 мкг/мл, тогда как дозы 20-40 мкг/мл только замедляют рост бактериальных клеток. Ингибирующее действие рифампицина проявляется при более низких концентрациях (10 мкг/мл), а полное ингибирование наступает при 40 мкг/мл антибиотика. На основании полученных данных для отбора устойчивых мутантов для обоих антибиотиков была выбрана доза 100 мкг/мл.

Далее нами исследовалась частота выхода стрептомицинустойчивых (СМ-р) и рифампицинустойчивых (РФ-р) мутантов у *L. acidophilus* АН440 при НГ-индуцированном мутагенезе. Для этого бактериальные культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, в течение 60 мин были обработаны НГ в концентрациях 50, 100, 200, 250 и 300 мкг/мл и высеяны на селективные среды, содержащие по 100 мкг/мл стрептомицина или рифампицина. Выживаемость и частота встречаемости СМ-р или РФ-р мутантов в зависимости от применяемой концентрации НГ определяли подсчетом выросших колоний. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2. Частота встречаемости антибиотикоустойчивых мутантов *L. acidophilus* АН440 в зависимости от концентрации НГ

Концентрация НГ, мкг/мл	Доля выживших клеток после действия НГ, %	Частота встречаемости СМ-р мутантов	Частота встречаемости РФ-р мутантов
0 (контроль)	100	$2,0 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-8}$
50	83,3	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{-6}$
100	76,6	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$
150	66,6	$1,4 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$
200	60,0	$2,0 \times 10^{-7}$	$5,6 \times 10^{-6}$
250	43,0	$2,3 \times 10^{-7}$	$8,0 \times 10^{-6}$
300	41,6	$2,8 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-6}$

Из приведенных в табл. 2 данных видно, что спонтанный уровень встречаемости как СМ-р, так и РФ-р мутаций у *L. acidophilus* АН440 составляет порядка  $10^{-8}$ . В случае *E. coli* антибиотикоустойчивые мутанты также возникают с довольно низкой частотой (порядка  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  при получении РФ-р и  $10^{-9}$  СМ-р мутантов) [7, 9].

Данные опыта показали, что в зависимости от концентрации НГ выживаемость жизнеспособных клеток *L. acidophilus* АН440 колеблется в пределах 40-80%. Так, при обработке клеток НГ в концентрации 50 мкг/мл количество жизнеспособных клеток составило 83%, а при концентрации 250-300 мкг/мл - 43-41%.

Частота выхода СМ-р и РФ-р мутантов при обработке НГ в концентрации 300 мкг/мл составляла  $2,8 \times 10^{-7}$  и  $4,1 \times 10^{-5}$  соответственно. В пределах исследованных концентраций мутагена частота встречаемости СМ-р мутаций увеличивалась примерно в десять раз, а РФ-р мутаций в сто раз.

Была изучена также зависимость выхода антибиотикоустойчивых мутантов от времени обработки мутагеном. Для этого бактериальную культуру обрабатывали НГ в концентрации 300 мкг/мл в равные промежутки времени 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 и 3,0 ч с последующим высевом на селективные среды (табл. 3).

Таблица 3. Частота встречаемости антибиотикоустойчивых мутантов у *L. acidophilus* АП440 в зависимости от различных интервалов времени при 300 мкг/мл НГ.

Время воздействия НГ, ч	Доля выживших клеток после действия НГ, %	Частота встречаемости СМ-р мутантов	Частота встречаемости РФ-р мутантов
0 (контроль)	100	$2,0 \times 10^{-1}$	$3,2 \times 10^{-8}$
0,5	51,6	$9,3 \times 10^{-1}$	$4,7 \times 10^{-6}$
1,0	40,8	$2,6 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-4}$
1,5	38,3	$2,6 \times 10^{-1}$	$1,7 \times 10^{-5}$
2,0	35,0	$2,5 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-3}$
2,5	33,0	$2,6 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-5}$
3,0	30,0	$2,4 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-4}$

Как видно из данных, представленных в табл. 3, в зависимости от времени экспозиции с мутагеном отмечается увеличение количества СМ-р мутантов более чем в 2 раза, а РФ-р мутантов почти в 10 раз. Увеличение продолжительности обработки от одного до трех часов приводило к дальнейшему повышению выхода СМ-р мутантов на один порядок и РФ-р мутантов на два порядка. В указанном интервале времени выход обоих типов мутантов существенно не менялся. Таким образом, для эффективного отбора СМ-р и РФ-р мутантов оптимальной дозой НГ является 300 мкг/мл, а продолжительность обработки — 1 ч.

Факт существенного повышения выхода антибиотикоустойчивых мутаций с помощью НГ-индуцированного мутагенеза говорит о том, что устойчивость к рифампицину или к стрептомицину не связана с наличием у *L. acidophilus* плазмид типа R-факторов, а является следствием хромосомных мутаций.

Предварительные исследования показали, что выделенные антибиотикоустойчивые мутанты обладали разной молокосвертывающей активностью и степенью кислотообразования. Отобранные РФ-р и СМ-р мутанты были сгруппированы по основным признакам *L. acidophilus* для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миллер Дж.* В кн.: Эксперименты в молекулярной генетике. М., "Мир", 436 с., 1976.
2. *Оганесян Г.Г., Барсегян А.А.* Биолог. журн. Армении, 49, 2, 30-33, 1996.
3. *Оганесян Р.Г., Барсегян А.А., Оганесян М.Г.* Биолог. журн. Армении, 43, 9, 729-733, 1990.
4. Bergey's manual. In Bergey's Manual Systematic Bacteriology, 2. Ed. by Sneath P.H.A., Mair M.S., Sharpe M. and Holt J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
5. *Fujiwara S., Seto Y., Kimura A., Hashiba H.* J. Appl. Microb. 90, 3, 343-352, 2001.
6. *Fujiwara S., Seto Y., Kimura A., Hashiba H.* J. Appl. Microb. 90, 1, 43-52, 2001.
7. *Gorini L.* Streptomycin and misreading of genetic code. In Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory, New York., 791-803, 1974.
8. *Marishita T., Yura T.* J. Bacteriol. 125, 2, 416-422, 1976.
9. *Yura T., Ishihama A.* Annu. Rev. Genet. Palo Alto, Calif., 13, 59-97, 1979.

Поступила 04.VI.2006