

В. В. АНДРОСОВ, В. С. ЛЕВАШЕВ

**L-МУТАНТЫ *ESCHERICHIA COLI* И *SALMONELLA*,
ПОЛУЧЕННЫЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
N-НИТРОЗО-N-МЕТИЛМОЧЕВИНЫ**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 4 I 1974)

Возможность получения стабильных *L*-форм под воздействием мутагенных агентов была показана у *Agrobacterium tumefaciens* при воздействии у.-ф. лучами (¹), у *Bacillus subtilis* — N-нитрозогуанидином (²) и у *Escherichia coli* — N-нитрозо-N-метилмочевинной (³).

Для генетического изучения мутаций, приводящих к образованию *L*-форм, более приемлемы штаммы *E. coli* и *Salmonella*, которые и использовались в наших экспериментах: *E. coli* K-12, HfrC, J62, P678 и PA309; *S. typhimurium* LT2 и *S. abony* SW1444. В качестве мутагенного фактора использовалась N-нитрозо-N-метилмочевина (НММ), препарат любезно предоставлен проф. И. А. Рапопортом (Институт химической физики АН СССР). Обработка НММ ($0,9 \cdot 10^{-3}$ — $4,5 \cdot 10^{-2}$ М) проводилась в фосфатно-цитратном буфере (рН 6,0) при 37°. Отбор морфологических мутантов осуществлялся тотальным просмотром выросших колоний через 48 час. культивирования посевов при 37°.

В результате из всех штаммов, взятых в опыт, были получены морфологические мутанты, состоящие из типичных *L*-элементов и обозначенных нами как *L*-мутанты (рис. 1). Анализ репродуктивных особенностей *L*-мутантов выявил сходство с аналогичными процессами размножения пенициллиновых *L*-форм. Размножение осуществлялось поперечным делением, почкованием, процессами вакуолизации и освобождением вакуолей, образованием зернистых элементов и светопреломляющих тел и гранул (рис. 2, 3, 4). *L*-мутанты росли на обычных питательных средах, а также на синтетических с добавками соответствующих факторов роста для каждого штамма. *L*-мутанты не нуждались для своего роста в осмотических стаби-



Рис. 1. а — *L*-мутанты *E. coli* K12, 1350×; б — *L*-мутанты *S. typhimurium* LT2, 1200×; в — *L*-мутанты *S. abony* SW1444, 1200×. Фазово-контрастная микроскопия

лизаторах. Скорость роста была несколько снижена, в отличие от исходных бактериальных штаммов, за счет удлинения \log — фазы и пологого подъема \log — фазы кривой роста.

Чувствительность *L*-мутантов к лизоциму, глицину, *D*-циclosерину,

пенициллинам, ристомичину, бацитрацину, а также типичная электронномикроскопическая картина «пептидогликановых мешков» при получении клеточных стенок по методу (4) свидетельствуют лишь о количественном нарушении у *L*-мутантов биосинтеза пептидогликана. Первичным, по-видимому, является нарушение цитоплазматической мембраны. Частичное нарушение биосинтеза клеточных стенок у *L*-мутантов коррелирует с их повышенной чувствительностью к антибиотикам и поверхностно-активным веществам. Особенно высокая чувствительность *L*-мутантов отмечалась к пенициллинам, ингибиторам синтеза белка — хлорамфениколу, тетрациклину, канамицину и линкамицину, но в то же время *L*-мутанты были резистентны к актиномицину *D*. Из поверхностно-активных веществ гиперчувствительность отмечалась к додецилсульфату Na, дезоксихолату Na, тритону X-100, X-305 и Brij 58. Интересен тот факт, что *L*-мутанты чувствительны к пенициллину, в то время как сферопластические типы стабильных *L*-форм, полученные под влиянием пенициллина и сохраняющие биосинтез пептидогликана, к нему резистентны.



Рис. 2. Множественное почкование *L*-мутантов *E. coli* K12. 16 000 ×. Электронная микроскопия



Рис. 3. Типы репродукции *L*-мутантов *S. typhimurium* LT2. а — деление шаровидного тела, б — почкование шаровидного тела, в — почкование вакуолизированного тела, г — множественная вакуолизация, д — деление вакуолей. 2600 ×. Фазовоконтрастная микроскопия

Биологическое и генетическое изучение мутаций у штаммов *E. coli* K12, обозначенных нами символом *llr* (*L*-like rod mutants) и приводящих к возникновению *L*-фенотипа, показало, что все они имеют точковую природу. Во-первых, *L*-мутанты способны спонтанно, с низкой частотой (10^{-10} — 10^{-14}), ревертировать в бактериальные культуры. Во-вторых, реверсия в бактериальные культуры возможна в результате обратных транзаций и трансверзий, индуцированных аналогами оснований, гидроксиламином, диэтилсульфатом, нитрозогуанидином и НММ. Фенотипическое выражение мутации *llr* у штаммов *E. coli* K12 было не одинаковым. Так, *L*-мутанты штамма Р678, в отличие от всех остальных, характеризовались плеiotропным фенотипом (приобретение сферической формы клеток, изменение ауко-трофности и резистентность к Т-фагам, возникновение стрептомицинчувствительности).

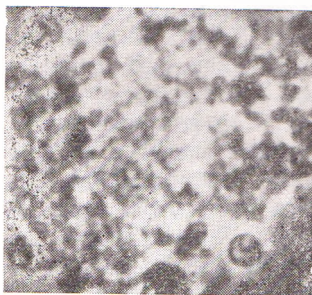


Рис. 4. Микроколония зернистых элементов, 1200 ×. Фазовоконтрастная микроскопия

Мутация у штаммов HfrC, J62 и PA309 была обозначена *llr* A. Генетическое картирование мутации *llr* A методами градиента передачи неселективных маркеров и прерыванием конъюгации позволило установить ее тесную сцепленность с цистроном *cus* G и картировать ориентировочно между 63—65 мин. генетической карты *E. coli* K12 (5).

Мутация у штамма Р678, приводящая к плеiotропному эффекту, была обозначена *llg B*. Анализ этой мутации показал, что плеiotропный эффект связан не с собственно мутацией *llg B*, а с вторичной, затрагивающей 30 S субъединицу рибосом. Картирование мутации *llg B* у *L*-мутанта штамма Р678 выявило ее тесную сцепленность с *lac*-опероном и установило следующую последовательность в этой области: *leu* — *llg B* — *lac*.

Поступило
28 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ *M. Rubio-Huertos, E. Cabezas de Herrera, Nature, v. 209, 5029, 1262 (1966).*
² *F. E. Young, P. Haywood, M. Pollock, J. Bacteriol., v. 102, 867 (1970).* ³ *B. B. Андреев, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., т. 12, 129 (1972).* ⁴ *H. H. Martin, J. Gen. Microbiol., v. 36, 441 (1964).* ⁵ *A. L. Taylor, Bacteriol. Rev., v. 37, 155 (1970).*