

УДК 575.24

ГЕНЕТИКА

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-метилмочевиной (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, R678 и RA309; *S. typhimurium* LT2 и *S. abony* SW1444. В качестве мутагенного фактора использовалась N-нитрозо-N-метилмочевина (HMM), препарат любезно предоставлен проф. И. А. Рапопортом (Институт химической физики АН СССР). Обработка HMM ( $0,9 \cdot 10^{-3}$  –  $4,5 \cdot 10^{-2} M$ ) проводилась в фосфатно-цитратном буфере (pH 6,0) при  $37^\circ$ . Отбор морфологических мутантов осуществлялся тотальным просмотром выросших колоний через 48 час. культивирования посевов при  $37^\circ$ .

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-

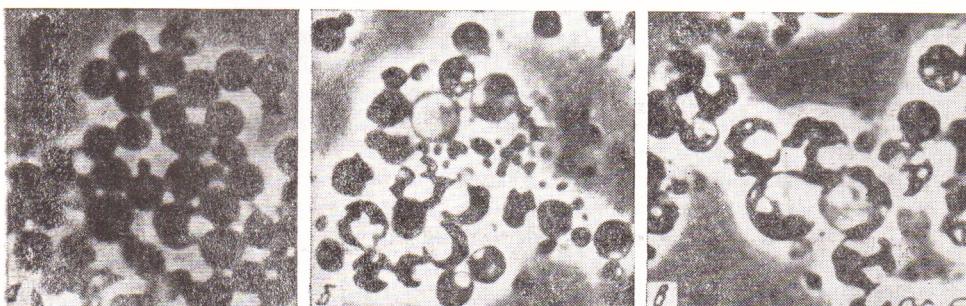


Рис. 1. *a* – *L*-мутанты *E. coli* K12, 1350×; *б* – *L*-мутанты *S. typhimurium* LT2, 1200×; *в* – *L*-мутанты *S. abony* SW1444, 1200×. Фазовоконтрастная микроскопия

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*-циклосерину,

пенициллином, ристомицину, бацитрацину, а также типичная электронномикроскопическая картина «пентидогликановых мешков» при получении клеточных стенок по методу<sup>(4)</sup> свидетельствуют лишь о количественном нарушении у *L*-мутантов биосинтеза пентидогликана. Первичным, по-видимому, является нарушение цитоплазматической мембранны. 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 пенициллину, 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, трилону 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.

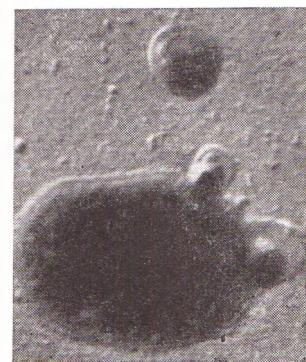


Рис. 2. Множественное почкование *L*-мутантов *E. coli* K12. 16 000×. Электронная микроскопия

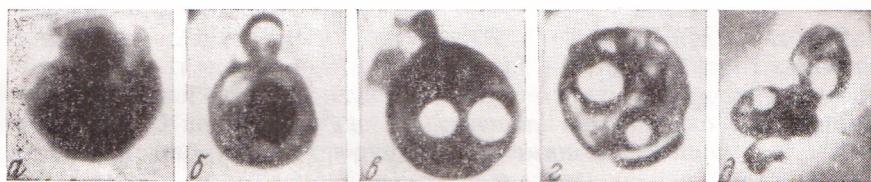


Рис. 3. Типы репродукции *L*-мутантов *S. typhimurium* LT2. *a* — деление шаровидного тела, *б* — почкование шаровидного тела, *в* — почкование вакуолизированного тела, *г* — множественная вакуолизация, *д* — деление вакуолей. 2600×. Фазовоконтрастная микроскопия

Биологическое и генетическое изучение мутаций у штаммов *E. coli* K12, обозначенных нами символом *llg* (*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 ( $10^{-10}$  —  $10^{-11}$ ), revertirovati в бактериальные культуры. Во-вторых, revertors в бактериальные культуры возможна в результате обратных транзитий и трансверзий, индуцированных аналогами оснований, гидроксиламином, диэтилсульфатом, нитрозогуанидином и НММ. Фенотипическое выражение мутации *llg* у штаммов *E. coli* K12 было не одинаковым. Так, *L*-мутанты штамма P678, в отличие от всех остальных, характеризовались плейотропным фенотипом (приобретение сферической формы клеток, изменение ауксотрофности и резистентность к Т-фагам, возникновение стрептомицинчувствительности).

Рис. 4. Микроколония зернистых элементов, 1200×. Мутация у штаммов HfrC, J62 и PA309 была обозначена *llg A*. Генетическое картирование мутации *llg A* методами градиента передачи неселективных маркеров и прерыванием конъюгации позволило установить ее тесную сцепленность с цистроном *cys G* и картировать ориентировано между 63—65 мин. генетической карты *E. coli* K12<sup>(5)</sup>.



Рис. 4. Микроколония зернистых элементов, 1200×. Мутация у штаммов HfrC, J62 и PA309 была обозначена *llg A*. Генетическое картирование мутации *llg A* методами градиента передачи неселективных маркеров и прерыванием конъюгации позволило установить ее тесную сцепленность с цистроном *cys G* и картировать ориентировано между 63—65 мин. генетической карты *E. coli* K12<sup>(5)</sup>.

Мутация у штамма P678, приводящая к плейотропному эффекту, была обозначена  $\text{IgB}$ . Анализ этой мутации показал, что плейотропный эффект связан не с собственно мутацией  $\text{IgB}$ , а с вторичной, затрагивающей 30 S субъединицу рибосом. Карттирование мутации  $\text{IgB}$  у  $L$ -мутанта штамма P678 выявило ее тесную сцепленность с lac-опероном и установило следующую последовательность в этой области:  $\text{leu} - \text{IgB} - \text{lac}$ .

Поступило  
28 XII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

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