

УДК 575.23

ГЕНЕТИКА

И. В. КОВАЛЕНКО

## АЛИФАТИЧЕСКИЙ ФОСФИН — НОВЫЙ ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕН

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 17 IX 1971)

Литературных данных, подтверждающих мутагенную эффективность фосфорорганических соединений, немного. Впервые это было описано для некоторых фосфорорганических соединений И. А. Рапопортом и Р. Г. Костяновским <sup>(1)</sup>. Затем был установлен мутагенный эффект на *Drosophilla melanogaster* <sup>(2)</sup> паранитроацетофенилентрифенилфосфина.

Наиболее реакционноспособными представителями фосфорорганических соединений являются, по нашим данным, алифатические фосфины. В данной работе изучалось токсическое и мутагенное действие одного из таких фосфинов — диметилметилолфосфина (ДММФ) — одноатомного спирта, содержащего при атоме углерода, связанного с гидроксилом, фосфорорганический остаток. ДММФ впервые синтезирован в 1961 г. <sup>(3)</sup>; это прозрачная жидкость, окисляющаяся на воздухе, температура кипения 68° (24 мм);  $n_D^{20}$  1,5019;  $d_4^{20}$  0,9931;  $MR$  27,83.

Так как ДММФ легко воспламеняется на воздухе (хранится он в запаянных ампулах), ампулу вскрывают только перед опытом в воде или поместив пробирку в сухой лед. Добавляют мутаген к суспензии спор под тягой. Все это перед опытом обрабатывают стерилизующими средствами. Предосторожности, предпринятые в опытах с ДММФ, позволяют использовать в генетике соединения, ранее почти недоступные.

Исходным материалом для наших исследований был производственный штамм 773 *Actinomyces streptomycini*, синтезирующий стрептомицин. Обработке подвергали моноспоровую суспензию продуцента, приготовленную по методу <sup>(4)</sup>, в условиях непрерывного встряхивания при 27°. По истечении экспозиции прекращали действие мутагена неоднократным разведением суспензии дистиллированной водой. Применяли две среды: а) агаризованную следующего состава (в %): соевая мука 2, глюкоза 1, NaCl 0,5, агар-агар 20; pH 7; б) для биосинтеза антибиотика в глубинных условиях (%): соевая мука 3; глюкоза 4,  $(NH_4)_2SO_4$  0,6,  $KH_2PO_4$  0,025, NaCl 0,25,  $CaCO_3$  0,6, pH — натуральный.

Для обеспечения статистической достоверности результаты обработки анализировались в трех и более повторностях. Данные по стрептомицинообразованию были получены на основе однократной проверки антибиотической активности 200 моноспоровых вариантов из естественного рассева и полученных в результате обработки актиномицета ДММФ. Активность всех проверенных вариантов выражалась в процентах от контроля ферментации, значение которого совпадало со значением модального класса контрольной гистограммы. Для характеристики антибиотикообразования штамма использовались такие параметры, как частота возникновения «плюс»- и «минус»-вариантов, определялась достоверность выборочной разности этих параметров, что математически выражалось  $\bar{x} \pm 2\sigma$  ( $P = 0,05$ ).

Ввиду отмеченного в данной работе нового сильного ненаследственно-го эффекта и своеобразной кривой морфологической изменчивости штамма, кривая жизнеспособности будет дана после графика по морфологической изменчивости актиномицета (рис. 1).

Анализ результатов воздействия ДММФ на *A. streptomycini* позволяет отметить ряд особенностей взаимодействия мутагена с объектом. В естественном рассеиве штамм 773 *A. streptomycini* на 92,0—99,5% состоит из колоний белого цвета, хорошо спорулирующих, с радиальной складчатостью, без пигмента в агаре, диаметром 4—5 мм. Только 0,5—0,8% приходится на колонии с измененной морфологией. К ним относятся аспорогенные гладкие колонии, мало спорулирующие, и колонии с частичной споруляцией. По размеру их можно разделить: а) на нормальные диаметром 4—5 мм; б) на малые диаметром 2—2,5 мм; в) на карлики диаметром 1—1,5 мм.

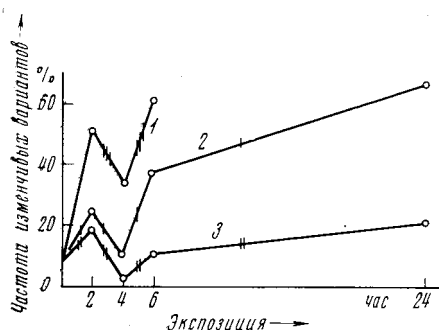


Рис. 1. Морфологическая изменчивость *Actinomyces streptomycini* штамма 773 под действием ДММФ в трех концентрациях: 0,3% (1), 0,01% (2), 0,1% (3)

В своеобразие взаимодействия ДММФ с продуцентом стрептомицина заключается в том, что в результате обработки спор в популяции обнаруживалось до 70% аспорогенных колоний. В основном гладкие, бесцветные, малые или карлики. Радиальная складчатость у таких колоний почти отсутствовала. В 6 случаях из 7 аспорогенные колонии при пассажах начинали спорулировать. Это указывает на модификационный характер большинства аспорогенных форм. Модификационно измененные аспорогенные колонии отличались от аналогично выглядящих мутаций, полученных под влиянием ДММФ и других мутагенов, важной особенностью — они всегда сохраняли антибиотическую активность на уровне контрольной, или даже превосходили ее.

Истинные морфологические мутации возникали с частотой до 10%. В основном это аспорогенные, бесцветные, желтые и с оранжевым центром колонии, с радиальной и хаотической складчатостью. Некоторые мутанты выделяли пигмент в агар. Эти признаки сохранились мутантами в 10 проверенных пассажах. Биологическая активность таких мутантов равнялась нулю.

Кинетика возникновения морфологических изменений у исследуемого нами актиномицета под действием ДММФ выражалась возрастающей кривой с изломом при 4-часовой обработке спор диметилметилфосфинем в концентрации 0,3; 0,1; 0,01%. Кривая морфологических изменений, полученная при обработке объекта 0,3% мутагеном (т. е. самой жесткой концентрацией) расположена выше двух других. Удивителен тот факт, что кривая для концентрации 0,1% находится ниже кривой для 0,01%. Это расположение кривых несколько необычно. Наибольший выход мутаций в концентрации 0,3% наблюдался при экспозиции 6 час., а в концентрации 0,01% при суточной обработке. Это первый пример сложного характера нарушения обычной пропорциональности между дозой мутагена и выходом мутаций. В результате действия ДММФ на *A. streptomycini* получен также новый спектр мутаций, имеющих морфологические и физиологические особенности.

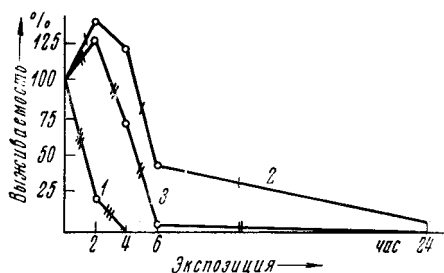


Рис. 2. Жизнеспособность спор штамма 773 под действием ДММФ в трех концентрациях (тех же, что и на рис. 1)

Одновременно был установлен эффект стимуляции — жизнеспособность спор в популяции, обработанной мутагеном в концентрации 0,01% при экспозиции 2 и 4 часа и 0,1% при экспозиции 2 часа, превышала контрольную на 40, 25 и 21% соответственно (рис. 2). Максимальная продолжительность эффекта стимуляции 4,5 часа. При увеличении дозы мутагена наблюдалась экспоненциальная зависимость гибели спор от дозы.

На примере данных, полученных при исследовании мутагенной активности ДММФ, прослеживается широко известный принцип действия разных доз химических веществ на организм. Этот принцип заключается в том, что малые дозы действуют стимулирующе, средние тормозят биологические процессы, большие убивают организм. Кривые жизнеспособности, полученные под действием ДММФ, ярко иллюстрируют этот принцип. Особенно поражает выживаемость обработанных спор, на 40% более высокая, чем в контроле.

Вероятно, в начале действия ДММФ на споры протекают два параллельных процесса: 1) стимуляции и 2) увеличения частоты модификаций и мутаций в обработанной популяции. К моменту максимальной стимуляции частота модификаций и мутаций вместе составляет  $\frac{1}{3}$  наибольшего выхода их. Причины стимуляции в данном случае обусловлены известным общим физиологическим влиянием мутагена. Такая стимуляция, которая накладывается на первую четверть интенсивности всего модификационного и мутационного фона, почти не зависит от мутаций. Это можно объяснить тем, что: а) ДММФ может в указанных дозах различаться аллостерическим эффектом и развертывать конфигурации некоторых проферментов, или ферментов, которые в обычных условиях не активны; а) мутаген, располагающий собственным потенциалом избранной активности, может образовывать лабильные комплексы с ферментами, и действует как возможный своеобразный кофермент.

Выше отмечалось, что в популяции исследуемого нами актиномицета, обработанного ДММФ, резко возрастает доля колоний с ненаследственной морфологической изменчивостью. Этот эффект носит модификационный характер, но стимуляция при этом отсутствует. Характеристику мутаций продуктивности можно проследить на гистограмме, которая при отсутствии стимуляции в момент наибольшего выхода модификаций растянута и как бы «придавлена» к оси абсцисс (рис. 3). Имеет место почти полная утрата модального класса и появление нескольких новых классов справа. Следовательно, частота мутаций продуктивности, а также изученных нами физиологических мутаций превосходит появление морфологических мутаций. В несколько непривычных для объекта условиях «плюс»-варианты в момент наибольшей стимуляции и в момент наибольшего выхода модификаций и мутаций превышают среднюю активность контроля в 2,5—3 раза.

Так, в контрольной популяции количество «плюс»-вариантов равно  $5,6 \pm 1,9\%$ , а «минус»-вариантов  $2,0 \pm 1,1\%$ . В популяции, обработанной ДММФ в концентрации 0,01%, количество «плюс»- и «минус»-вариантов соответственно равно: при 2-часовой экспозиции  $30,9 \pm 3,1$  и  $5,3 \pm 1,6\%$ , при 24-часовой экспозиции  $32,5 \pm 3,0$  и  $9,8 \pm 1,9\%$ .

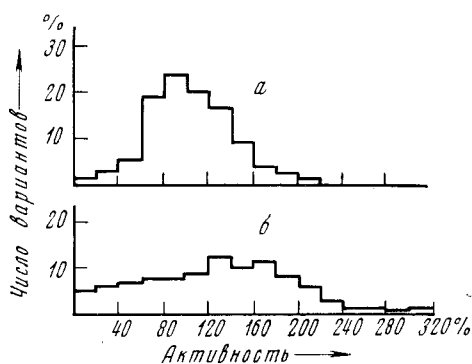


Рис. 3. Изменчивость штамма 773 по признаку антибиотикообразования под действием ДММФ в концентрации 0,01%, при экспозиции 24 часа. а — контроль, б — опыт

Таким образом, в результате обработки диметилметиловфосфином *A. streptomycini* штамма 773 наблюдался высокий модификационный эффект, который не был отмечен в литературе. Кроме того, получен новый спектр морфологических и физиологических мутаций у продуцента стрептомицина. Особый интерес представляют новые особенности эффекта стимуляции под влиянием химического соединения. В литературе это мало отмечено (<sup>5-7</sup>).

Благодарим В. В. Якшина за предоставленный нам диметилметиловфосфин.

Всесоюзный научно-исследовательский  
институт антибиотиков  
Москва

Поступило  
11 VIII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> И. А. Рапопорт, Р. Г. Костяновский, ДАН, **131**, № 1, 191 (1960).  
<sup>2</sup> И. А. Рапопорт, ДАН, **160**, № 3, 707 (1965). <sup>3</sup> Е. И. Гринштейн, А. Б. Бру-  
кер, Л. З. Соборовский, ДАН, **139**, 1359 (1961). <sup>4</sup> Ю. Э. Бартошевич,  
Автореф. кандидатской диссертации, М., 1966. <sup>5</sup> И. А. Рапопорт, Сборн. Супер-  
мутagens, «Наука», 1966. <sup>6</sup> И. А. Рапопорт, А. Г. Домрачева и др., Сборн.  
Химический мутагенез и селекция, «Наука», 1971. <sup>7</sup> А. Г. Домрачева, Сборн.  
Химический мутагенез и селекция, «Наука», 1971.