

**Пирог, Т.П. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter sp.*, не образующих экзополисахариды / Т. П. Пирог, С. М. Столяр, Ю. Р. Малашенко // Микробиология. – 2000. – Том 69, N 5. – С. 674–680.**

УДК 579.841:253.43

## **ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER SP.*, НЕ ОБРАЗУЮЩИХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ**

**Пирог Т.П., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р.**

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук  
Украины, Киев*

Методом нитрозогуанидинового мутагенеза получены мутантные штаммы *Acinetobacter sp.*, не образующие экзополисахариды (ЭПС). Исходный и мутантные штаммы не отличаются между собой по ряду характерных для этих бактерий физиолого-биохимических признаков (потребность в ростовых факторах, ассимиляция моно- и дисахаридов, устойчивость к антибиотикам). Идентичность исходного и мутантных штаммов установлена также на основе анализа их 16S рРНК. Результаты изучения устойчивости клеток исходного и мутантных штаммов к неблагоприятным факторам подтвердили защитные функции ЭПС *Acinetobacter sp.* по отношению к клеткам продуцента. При скрещивании *Acinetobacter sp.* с *Pseudomonas putida* BS228 (R68.45) осуществлен конъюгативный перенос плазмиды R68.45 в клетки мутантных (но не исходного) штаммов. Обсуждается роль ЭПС *Acinetobacter sp.* как одного из факторов, обеспечивающих генетическую стабильность штамма-продуцента.

Бактерии *Acinetobacter sp.* являются продуцентом высоковязкого комплексного экзополисахаридного препарата (ЭПС), названного нами этаполаном [1]. При росте бактерий на многих субстратах (этанол, моно- и дисахариды, меласса, крахмал, C<sub>4</sub>-дикарбоновые кислоты и др.) вязкость культуральной жидкости достигает 1000-1500 мПа·с при относительно невысокой концентрации ЭПС – 4-5 г/л. Этаполан практически неотделим от клеток продуцента: бактериальные клетки не удается отмыть от высоковязкого ЭПС с

помощью применяемых мягких методов (например, при использовании растворов хлористого натрия различной концентрации). Это обстоятельство существенно затрудняет проведение генетических, энзимологических и др. исследований штамма-продуцента. Ранее при изучении биологических функций этаполана для получения клеток *Acinetobacter sp.*, свободных от ЭПС, осуществляли ферментативную деградацию этаполана с помощью субстрат-специфичных ферментов [2], а также проводили механическое отделение ЭПС от клеток методом ультразвуковой обработки культуральной жидкости [3].

Одним из подходов, позволяющих получить клетки, свободные от ЭПС, является получение мутантных штаммов продуцента, не образующих экзополисахариды (ЭПС<sup>-</sup>-мутантов), что и было одной из задач настоящей работы. Кроме того, целью исследований являлось изучение защитных функций этаполана с помощью полученных мутантов, а также проведение некоторых генетических исследований исходного и мутантных штаммов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследований.** Основным объектом исследований являлся штамм бактерий *Acinetobacter sp.* 12S, устойчивый к стрептомицину в концентрации 1000 мкг/мл, который описан нами ранее [1]. В работе использовали также штамм *Pseudomonas putida* BS228 (R68.45), полученный из лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН (Пущино) и штамм розово-окрашенных факультативных метилотрофных бактерий *Methylobacterium extorquens* 19ч из коллекции микроорганизмов ИМВ НАН Украины. Штамм *P. putida* BS228 (R68.45) любезно предоставлен д.б.н. Борониным А.М., штамм *M. extorquens* 19ч - д.б.н. Романовской В.А.

**Культивирование микроорганизмов.** Бактерии *Acinetobacter sp.* выращивали на жидкой минеральной среде Кодама [4], содержащей 1% (по объему) этанола в качестве источника углерода и энергии. В среду дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0003% пантотената кальция. *Acinetobacter sp.* культивировали в колбах на качалке (220 об/мин) при

30°C, pH 6,8-7,0 в течение 16-96 часов. В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на глюкозо-картофельном агаре (ГКА).

Бактерии *Acinetobacter sp.* выращивали также на агаризованной среде Кодама, содержащей 0,5% (по объему) этанола и 0,2% (по объему) дрожжевого автолизата (далее по тексту – агаризованная среда Кодама с этанолом).

Культивирование *M. extorquens* 19ч осуществляли в течение 16-20 часов (экспоненциальная фаза роста) в колбах на качалке (220 об/мин, 30°C) на жидкой минеральной среде Кодама, содержащей 1% (по объему) метанола в качестве источника углерода и энергии. В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на агаризованной среде Кодама с метанолом (0,5% по объему).

*P. putida* BS228 (R68.45) выращивали в мясо-пептонном бульоне до достижения середины экспоненциальной фазы роста (качалка, 220 об/мин, 30°C, 16-18 часов). Как посевной материал использовали суточную культуру, выращенную на мясо-пептонном агаре (МПА).

**Получение мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* 12S.** Получение мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* 12S, не образующих ЭПС, осуществляли с помощью нитрозогуанидинового мутагенеза. Обработку клеток N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ) (Serva) проводили по Миллеру [5] в цитрат-фосфатном буфере (0,1 М) и минеральной среде Кодама. Клетки бактерий, полученные при культивировании в колбах (экспоненциальная фаза роста), концентрировали центрифугированием (10000 g, 5 мин) и ресуспендировали в среде Кодама или цитрат-фосфатном буфере. При подборе оптимальных условий мутагенеза клетки бактерий ( $10^9$  клеток/мл) инкубировали при 30°C в присутствии НГ (мкг/мл): 25, 50, 75, 100, 200 и 400; время обработки составляло 15, 30 и 60 мин.

Клеточную суспензию, полученную после обработки НГ, отмывали от нитрозогуанидина минеральной средой Кодама или цитрат-фосфатным буфером, центрифугировали (10000 g, 3 мин), а затем рассеивали на агаризованную среду

Кодама с этанолом. Отбор ЭПС<sup>-</sup>-мутантов осуществляли по морфотипу колоний: отбирали неслизистые мелкие плоские колонии. Отобранные клоны пересеивали на агаризованную среду Кодама с этанолом, а также на сусло-агар, МПА и ГКА.

***Определение физиолого-биохимических свойств мутантных штаммов.***

Для подтверждения того, что отобранные клоны являются мутантами *Acinetobacter sp.* 12S, а не контаминирующей микробиотой, изучали некоторые характерные для этих бактерий физиолого-биохимические признаки (потребность в ростовых факторах, ассимиляция моно- и дисахаридов, устойчивость к антибиотикам). Исследовали способность роста исходного и мутантных штаммов на жидкой минеральной среде Кодама с этанолом, глюкозой, фруктозой, маннозой, рамнозой, мальтозой и лактозой в присутствии ростовых факторов и без них. Углеводы вносили в среду в количествах, эквивалентных концентрации этанола по углероду. Культивирование штаммов до достижения стационарной фазы роста (96 часов) осуществляли в колбах на качалке, как описано выше.

Действие антибиотиков (канамицин, ампициллин, хлорамфеникол - 1 мкг/мл и стрептомицин - 1000 мкг/мл) проверяли при выращивании штаммов на агаризованной среде Кодама с этанолом.

Наличие ЭПС в культуральной жидкости мутантных штаммов определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [6], а также по образованию осадка ЭПС при обработке ее органическими растворителями (этанолом, изопропанолом).

***Анализ 16S рРНК исходного и мутантных штаммов *Acinetobacter sp.****  
ДНК из клеток исходного и мутантных штаммов выделяли по Marmur [7].

Аmplification генов 16S рРНК осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для амплификации использовали универсальные эубактериальные праймеры 27f и 1492r, описанные в работе Lane [8]. ПЦР осуществляли на амплификаторе "MJ Research.Inc." (США) при следующем режиме: 1. 95°C/1 мин; 2. 94°C/1 мин, 72°C/1 мин, 55°C/1мин (30 циклов); 3. 72°C/1мин. Общий объем реакционной смеси составлял 50 мкл, включая 1 мкл (100 нг) ДНК; 5 мкл буфера (100 ммоль трис-НСl, рН 8,3; 500 ммоль КСl; 25 ммоль MgCl<sub>2</sub>; 0,01% желатин); 0,5 мкл (100 ммоль) смеси

дезоксинуклеотидфосфатов (по 25 ммоль каждого dNTP); 1 мкл (50 пмоль) каждого праймера; 0,5 мкл (1-2 ед.) *Taq*-полимеразы (Gibco BRL).

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Размеры ампликонов, синтезированных в ПЦР, определяли, используя маркеры размеров фрагментов ДНК (Gibco BRL). Продукты ПЦР подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* из *E.coli* и *HaeIII* из *Haemophilus aegyptius* (Sigma). Продукты рестрикции амплифицированной ДНК анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле с использованием маркеров фрагментов ДНК различных молекулярных масс (Gibco BRL).

**Исследование устойчивости клеток исходного и мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* к неблагоприятным факторам.** Культивирование исходного и мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* на жидкой минеральной среде Кодама осуществляли, как описано выше. В экспоненциальной фазе роста бактерий отбирали пробы культуры и исследовали устойчивость клеток к ультразвуковой (УЗ) обработке (22 кГц, 120 и 180 с), действию додецилсульфата натрия (ДСН, 2,5 ммоль), формальдегида (ФА, 2 ммоль), тяжелым токсичным металлам  $\text{Cu}^{2+}$  (1,5 ммоль) и  $\text{Cr}^{6+}$  (7 ммоль). ФА и ДСН вносили в культуру в виде 1- и 10% растворов соответственно,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cr}^{6+}$  - в виде 0,1 М растворов солей  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{KCrO}_4$ . Культивирование бактерий в присутствии ФА, ДСН, токсичных металлов осуществляли в течение 2 ч, после чего определяли количество жизнеспособных клеток по методу Коха на ГКА.

Исследовали также устойчивость к ФА, ДСН, токсичным металлам клеток исходного штамма, освобожденных от ЭПС методом УЗ-обработки, как описано в работе [3].

**Конъюгативный перенос плазмиды R68.45 в клетки исходного и мутантных штаммов *Acinetobacter sp.*** Исследовали возможность конъюгативного переноса плазмиды R68.45 (Inc P-1 группы несовместимости) из *P. putida* BS228 в клетки исходного штамма *Acinetobacter sp.*12S и его ЭПС<sup>-</sup>-мутантов.

Клетки бактерий *Acinetobacter sp.* и *P. putida* BS228 (R68.45), полученные при культивировании в колбах на качалке (экспоненциальная фаза роста), концентрировали центрифугированием (10000 g, 5 мин) и ресуспендировали в среде Кодама, не содержащей источника углеродного питания. Скрещивание клеток осуществляли на агаризованной среде («голодном» агаре), а также в жидкой среде Кодама, не содержащей источника углеродного питания. В первом случае на поверхность «голодного» агара наносили по 0,1 мл суспензии донора и реципиента (концентрация клеток  $10^8$ - $10^{10}$ /мл) и инкубировали при 30°C в течение 16 часов, после чего клетки смывали физиологическим раствором и по 0,1 мл полученной суспензии высевали на селективную агаризованную среду. Скрещивание в жидкой среде осуществляли следующим образом. Суспензии ( $10^9$  клеток/мл) донора и реципиента смешивали в соотношении 1:10 и инкубировали без перемешивания при 30°C в течение 16 часов, затем по 0,1 мл суспензии высевали на селективную агаризованную среду. В обоих случаях выращивание и отбор трансконъюгантов *Acinetobacter sp.* проводили на селективной агаризованной среде Кодама с этанолом, содержащей 1000 мкг/мл стрептомицина, 20 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл канамицина. В этих условиях родительские штаммы не растут (*P. putida* BS228 (R68.45) не растет на среде со стрептомицином, а *Acinetobacter sp.* чувствительна к ампициллину и канамицину в концентрации 1 мкг/мл). Полученные трансконъюганты проверяли на устойчивость к более высоким концентрациям ампициллина (300 мкг/мл), канамицина (100 мкг/мл), а также к тетрациклину (40 мкг/мл).

Частоту появления трансконъюгантов рассчитывали как частное от деления количества клеток трансконъюгантов, выросших на селективной среде, на общее количество жизнеспособных клеток *Acinetobacter sp.*, содержащихся в суспензии после скрещивания. Количественный учет клеток *Acinetobacter sp.* в суспензии после скрещивания проводили по методу Коха на агаризованной среде Кодама с этанолом, содержащей 1000 мкг/мл стрептомицина.

Для доказательства того, что отобранные клоны ЭПС<sup>-</sup>-мутантов *Acinetobacter sp.* являются трансконъюгантами, осуществляли «обратный»

перенос плазмиды R68.45 из клеток мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* в клетки *M. extorquens* 19ч. Скрещивание клеток трансконъюгантов *Acinetobacter sp.* и *M. extorquens* 19ч проводили на “голодном” агаре и в жидкой среде Кодама без источника углеродного питания, как описано выше. Отбор трансконъюгантов *M. extorquens* 19ч осуществляли на селективной агаризованной среде Кодама, содержащей 1% (по объему) метанола, 50 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина. В этих условиях родительские штаммы не растут (*Acinetobacter sp.* не ассимилирует метанол в качестве источника углерода и энергии, а *M. extorquens* 19ч не растет на среде, содержащей более 10 мкг/мл антибиотиков). Частоту переноса плазмиды R68.45 в клетки метилотрофов определяли как описано выше. Количественный учет жизнеспособных клеток *M. extorquens* 19ч осуществляли по методу Коха на агаризованной среде Кодама, содержащей 1% (по объему) метанола.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния НГ на выживаемость клеток *Acinetobacter sp.* 12S было установлено, что при концентрации НГ 200 мкг/мл количество жизнеспособных клеток снижается с 12 до 3% в зависимости от времени обработки мутагеном (рис.1). Такой уровень выживаемости считается оптимальным при использовании НГ как мутагена [5]. В связи с этим для получения ЭПС<sup>-</sup>-мутантов использовали НГ в концентрации 200 мкг/мл. В результате проведенной работы было получено 10 клонов (№1 - №10), которые при росте на агаризованной среде Кодама с этанолом, а также при пересеве на сусло-агаровую среду, ГКА и МПА образовывали неслизистые мелкие (1-2 мм в диаметре) плоские матовые колонии белого цвета.

Установлено, что на жидкой минеральной среде с этанолом без ростовых факторов исходный штамм и изолированные клоны не растут. При внесении в среду пантотената и дрожжевого автолизата штаммы №1 - №10 росли так же, как исходный штамм. Как исходный, так и мутантные штаммы ассимилировали глюкозу, маннозу, фруктозу, лактозу и не использовали рамнозу и мальтозу.

Однако при росте мутантных штаммов на среде с этанолом и углеводами не наблюдали увеличения вязкости культуральной жидкости. Содержание углеводов в культуральной жидкости исходного штамма составляло 2,0-2,5 г/л, мутантных - 0,05-0,150 г/л. Обработка органическими растворителями культуральной жидкости мутантных штаммов, в отличие от исходного, не сопровождалась образованием осадка ЭПС. Наличие небольшого количества углеводов в культуральной жидкости мутантных штаммов может быть обусловлено способностью этих штаммов синтезировать внеклеточные моно- или олигосахариды, или, вероятнее всего, обнаруживаемые углеводы представляют собой внутриклеточные компоненты, высвобождающиеся в среду вследствие частичного лизиса клеток в стационарной фазе роста бактерий.

Мутантные штаммы не отличались от исходного также по устойчивости к антибиотикам. Все штаммы оказались чувствительными к канамицину, ампициллину и хлорамфениколу (1 мкг/мл) и устойчивыми к высоким концентрациям стрептомицина (1000 мкг/мл).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что по ряду характерных для *Acinetobacter sp.* физиолого-биохимических признаков (потребность в ростовых факторах, ассимиляция моно- и дисахаридов, отношение к антибиотикам) мутантные штаммы не отличаются от исходного за исключением способности к синтезу ЭПС.

Для доказательства идентичности исходного и полученных мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* проводили анализ их 16S рРНК. В последние годы широкое распространение для идентификации, сравнения или установления идентичности штаммов микроорганизмов получили методы, основанные на ПЦР. Одним из таких методов является произвольная амплификация полиморфной ДНК - RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) [9]. RAPD-реакция происходит на ДНК-матрице и направляется произвольными олигонуклеотидными праймерами. Чаще всего при установлении идентичности штаммов осуществляют амплификацию генов 16S рРНК с последующим установлением нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта (рДНК) [10-12].

В наших опытах после амплификации генов 16S рРНК вместо секвенирования рДНК, синтезированной в ПЦР, проводили RFLP-анализ (restriction fragment length polymorphism). Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов определяют как изменение длины фрагментов ДНК после расщепления рестриктазными ферментами [13, 14].

В результате амплификации генов 16S рРНК методом ПЦР с использованием универсальных эубактериальных праймеров 27f и 1492r получены ампликоны, размеры которых определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (рис 2). Установлено, что продукты амплификации ДНК исходного и мутантных штаммов имеют одинаковый размер - 1450 нуклеотидов.

Полученные ампликоны подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции. На рис. 3 (А) представлено электрофоретическое разделение продуктов расщепления амплифицированной ДНК исходного и трех мутантных штаммов (№1, 5 и 6) рестриктазой HaeIII, на рис. 3 (Б) - электрофореграмма рДНК тех же штаммов, гидролизованных одновременно двумя рестриктазами - HaeIII и EcoRI. Как видно из представленных данных, после расщепления рестриктазами рДНК исследуемых штаммов получен одинаковый набор фрагментов ДНК. Полученные данные свидетельствуют об идентичности исходного и мутантных штаммов *Acinetobacter sp.*

На следующем этапе исследовали устойчивость к неблагоприятным факторам клеток исходного штамма и его ЭПС<sup>-</sup>-мутантов. Ранее при определении защитных функций ЭПС *Acinetobacter sp.* для получения свободных от ЭПС клеток проводили УЗ-обработку культуры [3]. На рис. 4 представлены данные по влиянию УЗ-обработки на выживаемость клеток ЭПС<sup>-</sup>-мутантов (штаммы №1, 3, 5, 6 и 9) и исходного штамма в присутствии ЭПС. УЗ-обработка в течение 120 и 180 с не приводила к гибели клеток исходного штамма, в то время как количество жизнеспособных клеток мутантных штаммов в аналогичных условиях снижалось на 40-80%.

Клетки ЭПС<sup>-</sup>-мутантов и клетки исходного штамма, освобожденные от ЭПС, характеризовались одинаковой устойчивостью к ДСН, ФА, тяжелым

токсичным металлам (рис. 5). Обращает на себя внимание высокая устойчивость клеток исходного и мутантных штаммов к  $\text{Cr}^{6+}$ . Ранее нам не удалось выявить защитную функцию ЭПС *Acinetobacter sp.* по отношению к этому металлу [15]. Приведенные в настоящей работе результаты также свидетельствуют о наличии у этих бактерий, кроме синтеза ЭПС, других механизмов устойчивости к тяжелым металлам. Представленные данные показывают, что используемый нами режим УЗ-обработки культуры (120 с) позволяет полностью освободить клетки *Acinetobacter sp.* от высоковязкого высокомолекулярного ЭПС. Кроме того, приведенные результаты подтверждают полученные ранее данные о защитных функциях ЭПС *Acinetobacter sp.* по отношению к клеткам продуцента [3, 15].

Мы предполагали также, что ЭПС может уменьшать вероятность проникновения в клетки плазмид и чужеродной хромосомной ДНК, обеспечивая таким образом генетическую стабильность штамма-продуцента.

Для проверки этого предположения осуществляли скрещивание клеток исходного штамма *Acinetobacter sp.* 12S и его ЭПС<sup>-</sup>-мутантов (штаммы №1 и 3) с *P. putida* BS228, несущей плазмиду R68.45, которая кодирует устойчивость к ампициллину (300 мкг/мл), канамицину (100 мкг/мл) и тетрациклину (40 мкг/мл). Бактерии *Acinetobacter sp.* чувствительны к указанным антибиотикам – максимальная концентрация этих соединений, не подавляющая рост, составляет 0,5 мкг/мл.

Осуществить конъюгативный перенос плазмиды R68.45 в клетки исходного штамма *Acinetobacter sp.* 12S нам не удалось. Однако после скрещивания клеток ЭПС<sup>-</sup>-мутантов и *P. putida* BS228 (R68.45) было получено более 50 трансконъюгантов *Acinetobacter sp.*, которые приобрели все три маркерные устойчивости плазмиды R68.45 (таблица). Частота переноса плазмиды R68.45 в клетки мутантных штаммов *Acinetobacter sp.* №1 и №3 при скрещивании в жидкой среде не превышала  $10^{-8}$  на реципиентную клетку, тогда как частота появления трансконъюгантов при скрещивании на агаризованной среде достигала  $3 \cdot 10^{-6}$  на клетку реципиента.

Для доказательства наличия плазмиды R68.45 в клетках ЭПС<sup>-</sup>-мутантов *Acinetobacter sp.* №1 и №3 осуществляли скрещивание полученных трансконъюгантов и *M. extorquens* 19ч. Максимальная концентрация ампициллина и канамицина, не подавляющая рост этих метилотрофных бактерий, составляет 10 мкг/мл, тетрациклина – 5 мкг/мл. В результате проведенной работы было получено 45 трансконъюгантов *M. extorquens* 19ч, подавляющее большинство из которых оказались устойчивыми к ампициллину, канамицину и тетрациклину (300, 100 и 25 мкг/мл, соответственно). Конъюгативный перенос плазмиды R68.45 в клетки метилотрофных бактерий был более эффективен при скрещивании на агаризованной среде. Частота переноса плазмиды в этом случае составляла  $2 \cdot 10^{-5}$  на клетку реципиента, в то время как при скрещивании в жидкой среде частота появления трансконъюгантов не превышала  $10^{-7}$  на реципиентную клетку.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что ЭПС может являться одним из факторов, обеспечивающих генетическую стабильность штамма-продуцента. В пользу такого вывода свидетельствует и тот факт, что в течение 15 лет использования штамма-продуцента этаполана в лабораторных и опытно-промышленных условиях не наблюдали его изменчивости и фаголизиса клеток.

Следует отметить, что в литературе практически отсутствуют сведения о возможной роли ЭПС как фактора, регулирующего уровень изменчивости микробной популяции. В работах [16, 17] обсуждается участие ассоциированного с клетками полисахарида эмульсана в устойчивости штамма *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 к фагам ар-2 и ар-3. Полученные мутанты, устойчивые к одному из фагов, сохраняли чувствительность к другому, причем устойчивость к фагу ар-3 сопровождалась снижением синтеза эмульсана [16]. Мутанты RAG-1, дефектные по синтезу ЭПС, также оказались устойчивыми к фагам [17]. Авторы предполагают, что эмульсан принимает участие в адсорбции фага, а устойчивость к фагу обусловлена неспособностью его адсорбироваться на поверхности клетки.

Таким образом, в результате проведенной работы получены мутанты *Acinetobacter sp.* 12S, не образующие ЭПС. Идентичность исходного и мутантных

штаммов установлена на основании изучения характерных для этих бактерий физиолого-биохимических признаков и на основе анализа 16S рРНК. С использованием полученных ЭПС<sup>-</sup>-мутантов подтверждены защитные функции этаполана по отношению к клеткам продуцента, а также показана роль этого ЭПС как одного из факторов, обеспечивающих генетическую стабильность штамма-продуцента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. - 212 с.
2. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Выделение микроорганизмов - продуцентов ферментов, деградирующих экзополисахарид *Acinetobacter sp.* // Прикл. биохимия и микробиология. - 1997. - 33, N 5. - С. 550-555.
3. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter sp.* // Микробиология. - 1997. - 66, N 3. - С. 335-340.
4. Кодама Т., Накахага Т., Омори Т., Бинх Н.Т., Хошино К., Минода И. Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метаниспользующими микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C<sub>1</sub>-соединениях: Тез.докл.симп. (12-16 сентября 1977, г.Пушино). Пушино: НЦБИ АН СССР. - 1977. - С.213-215.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. - М.: Мир, 1976. - 436 с.
6. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal.Chem. - 1956. - 28,N 3. - P.350-356.
7. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. - 1961.- 3. - P. 208-218.
8. Lane D.J. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Ed. E.Stackebrandt and M.Goodfellow). - John Wiley, New York, 1991. - P. 115-175.
9. Neilan B.A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic *Cyanobacteria* by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - 61, N 6. - P. 2286-2291.
10. Distel D.L., Cavanaugh C.M. Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves // J. Bacteriol. - 1994. - 176, N 7.- P. 1932-1938.
11. Martinez-Picado J.M., Blanch A.R., Jofre J. Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA // Appl. Environ. Microbiol. - 1994. - 60, N 2. - P. 732-737.
12. Dubilier N., Giere O., Distel D.L., Cavanaugh C.M. Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta,

Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and in situ hybridization // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - 61, N 6. - P. 2346-2350.

13. McLaughlin G.L., Brandt F.H., Visvesvara G.S. Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected *Naegleria* and *Acanthamoeba* amebae // J. Clin. Microbiol. - 1988. - 26. - P.1655-1658.

14. Bastide P.Y., Kropp B.R., Piche Y. Mechanisms for the development of genetically variable mycorrhizal mycelia in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - 61, N 10. - P 3609-3616.

15. Пирог Т.П. Роль экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* в защите клеток продуцента от действия тяжелых токсичных металлов // Микробиология. - 1997. - 66, N 3. - С. 341-346.

16. Pines O., Gutnick D.L. Relationship between phage resistance and emulsan production, interaction of phages with the cell-surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 // Arch. Microbiol. - 1981. - 130. - P. 129-133.

17. Gutnick D.L., Bayer F.A., Rubinovitz G., Pines O., Shabtai Y., Goldman S., Rosenberg E. Emulsan production in *Acinetobacter* RAG-1 // Adv. Biotechnol. Proc.6th Int. Ferment. Symp., London (Canada), 20-25 July 1980, Toronto e.a. - 1981. - Vol.3. - P. 455-459.

### Подписи к рисункам

Рис. 1. Влияние различных концентраций нитрозогуанидина на выживаемость клеток *Acinetobacter sp.*12S в зависимости от времени обработки мутагеном.

Время обработки (мин.): 1- 15; 2 – 30; 3 – 60.

Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов амплификации ДНК исходного и мутантного штаммов *Acinetobacter sp.*

1 – исходный штамм 12S.

2 - мутантный штамм №1.

3 - маркеры размеров фрагментов ДНК (указано количество нуклеотидов в фрагментах ДНК).

Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 1% агарозном геле продуктов гидролиза эндонуклеазами рестрикции амплифицированной ДНК исходного (2) и мутантных (3 - 5) штаммов *Acinetobacter sp.*

Эндонуклеазы рестрикции: А - HaeIII; Б - HaeIII + EcoRI.

1 (А, Б), 6 (Б) - маркеры размеров фрагментов ДНК.

Мутантные штаммы – 3 - №1; 4 - №5; 5 - №6.

Рис. 4. Влияние ультразвуковой обработки на выживаемость клеток исходного (6) и мутантных (1 – 5) штаммов *Acinetobacter sp.*

Время обработки (с): А – 180; Б – 120.

Мутантные штаммы: 1 - №1; 2 - №3; 3 - №5; 4 - №6; 5 - №9.

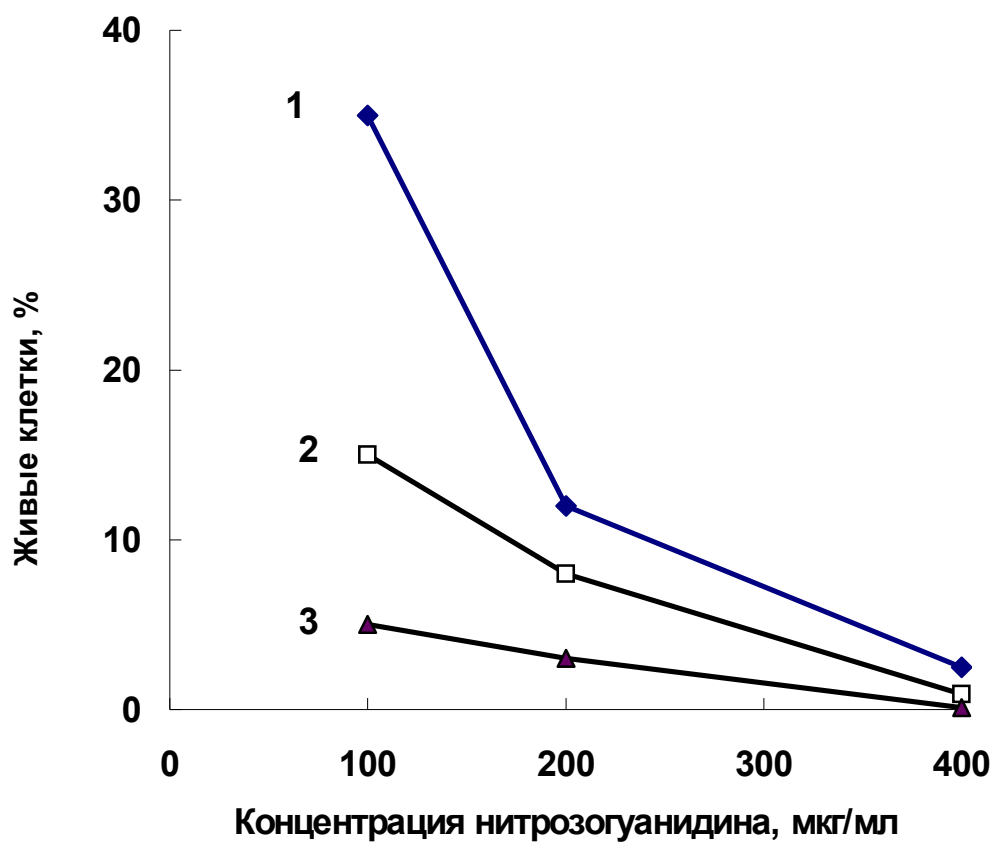
Рис. 5. Выживаемость клеток исходного (1, 2) и мутантных (3 – 6) штаммов *Acinetobacter sp.* при действии неблагоприятных факторов.

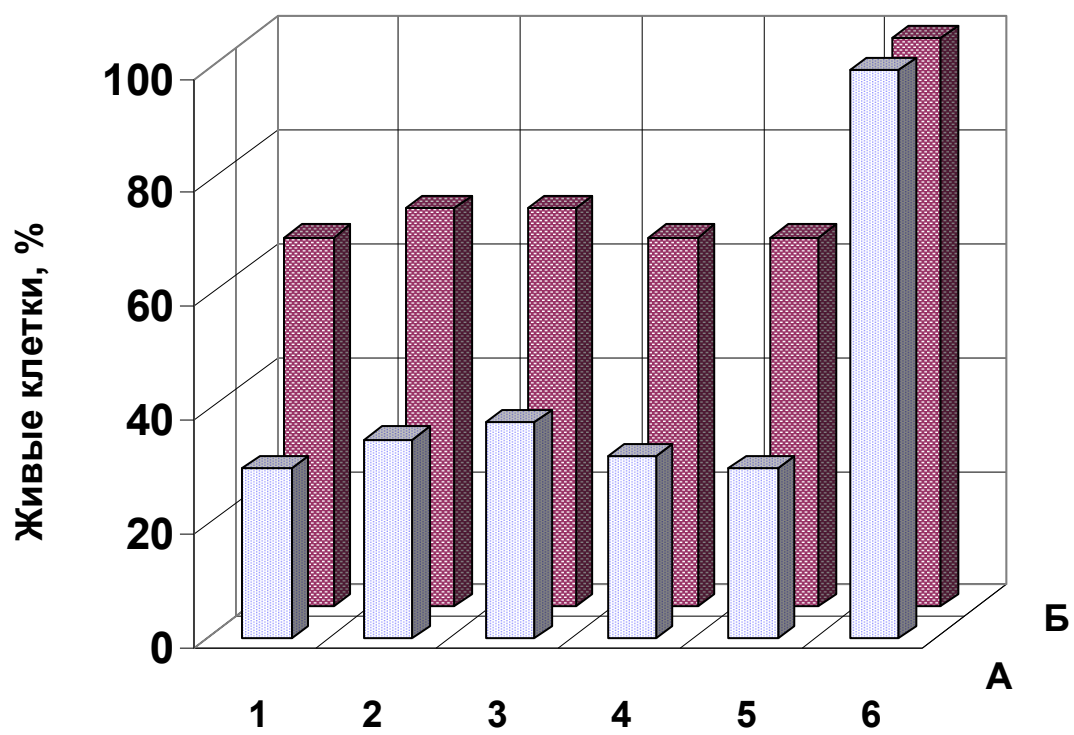
2 – клетки исходного штамма, освобожденные от ЭПС методом ультразвуковой обработки (время обработки 120 с).

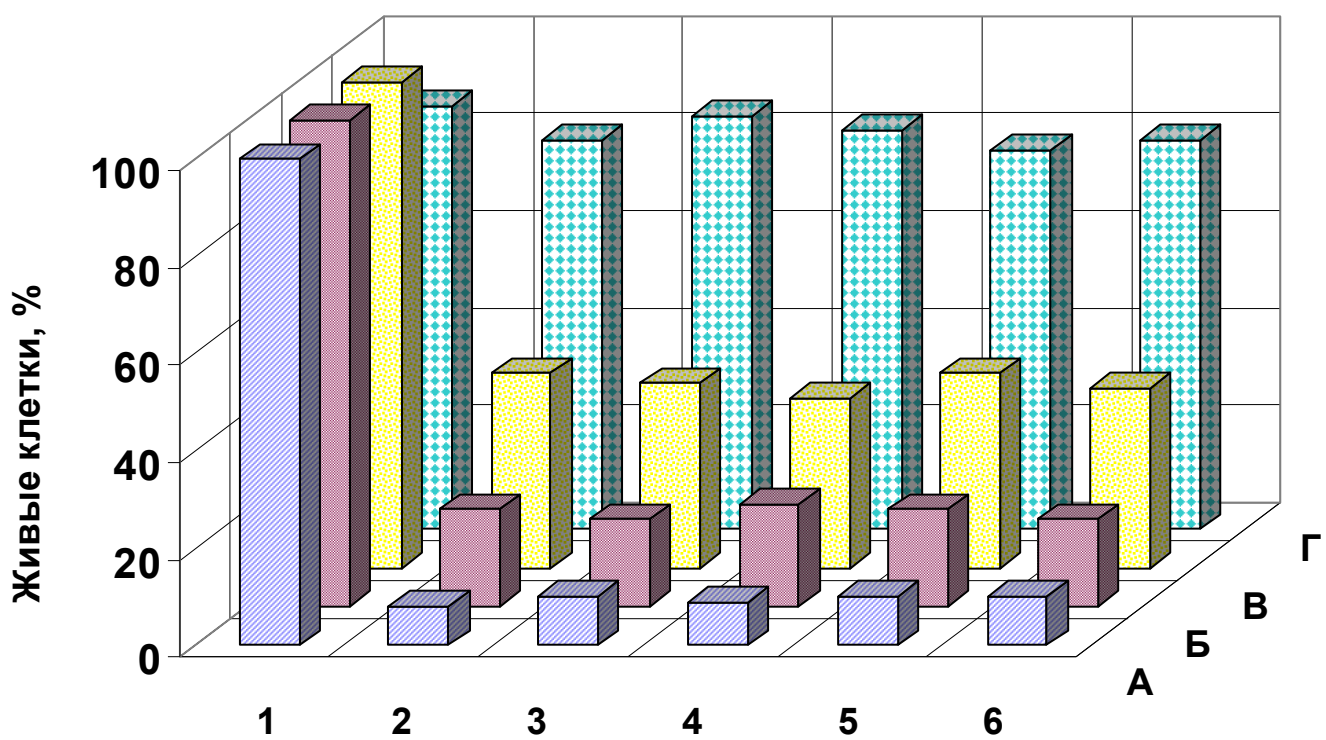
Мутантные штаммы: 3 - №1; 4 - №3; 5 - №5; 6 - №9.

Неблагоприятные факторы: А - додецилсульфат натрия (2,5 ммоль);

Б - формальдегид (2 ммоль); В -  $\text{Cu}^{2+}$  (1,5 ммоль); Г -  $\text{Cr}^{6+}$  (7 ммоль).







Таблица

**Устойчивость к антибиотикам штаммов *Pseudomonas putida* BS228 (R68.45),  
*Acinetobacter sp.* №1 и полученных трансконъюгантов**

Штамм	Концентрация антибиотиков, мкг/мл		
	Ампициллин	Канамицин	Тетрациклин
Мутантный штамм <i>Acinetobacter sp.</i> №1, не образующий ЭПС	0,5	0,5	0,5
<i>Pseudomonas putida</i> BS228 (R68.45)	300	100	40
Трансконъюганты <i>Acinetobacter sp.</i> №1 (R 68.45)	300	100	10

Примечание: указаны концентрации антибиотиков, не подавляющие рост бактерий.