

## НСR-РЕАКТИВАЦИЯ ОБРАБОТАННЫХ УФ-ЛУЧАМИ И ОЗОНОМ БАКТЕРИОФАГОВ В РЕПАРАЦИОННО-ДЕФЕКТНЫХ МУТАНТАХ *ESCHERICHIA COLI* K12

**Фомичев А.Ю., Гриц Н.В.**

Белорусский государственный университет (кафедра биофизики), Минск, РБ

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Установлено, что озон способен вызывать широкий спектр повреждений молекул ДНК при обработке *in vitro* [1]. В то же время, при взаимодействии озона с поверхностными структурами клетки происходит не только непосредственное их повреждение, но и генерация различного рода активных радикалов, способных обладать выраженным ДНК-тропным действием [2]. Наблюдаемые ранее существенные различия по чувствительности к  $O_3$  репарационно-дефектных мутантов *E.coli* [3], а также факт влияния озонирования клеток бактерий на внутриклеточный репродуктивный фаговый цикл [4], позволяют предполагать участие некоторых генов, ответственных за репарационные процессы, в осуществлении Нсг-реактивации обработанных озоном бактериофагов.

В работе были использованы изогенные мутанты *E.coli* K-12: АВ 1157 (дикий тип), АВ 2463 *recA13*, АВ 2494 *lexA1*, АВ 1886 *uvrA6*, АВ 2480 *uvrA6 recA13*, а также их варианты, содержащие плазмиду рКМ101 и бактериофаги  $\lambda$ , P1 и T4.

Обработку бактериофагов УФ-лучами осуществляли, используя лампу БУФ-15, с расстояния 40 см, максимум энергии в диапазоне 253,7 нм, мощность дозы 0,42 Дж/м<sup>2</sup>. Суспензии в количестве 5 мл облучали в чашках Петри при интенсивном перемешивании, после чего определяли эффективность посева на бактериальные газоны используемых штаммов *E.coli*. Эксперименты проводили в затемненном помещении при ослабленном красном свете.

Установлено, что в случае УФ-облученного фага  $\lambda$  наблюдается четкая зависимость эффективности Нсг-реактивации от генотипа клетки хозяина и наиболее выражена в штамме дикого типа. Аналогичная закономерность наблюдается в случае УФ-облученных фагов P1 и T4.

Для обработки бактериофагов озоном использовали трубчатый озонатор, сконструированный в БГУ. Концентрация озона на выходе генератора составляла 0,5 мг/л воздуха. Обработку осуществляли, барботируя озонированный воздух через 5 мл суспензии фага в пробирках.

Установлено, что при обработке всех трех бактериофагов озоном вне зависимости от времени обработки и генотипа клетки-хозяина, Нсг-реактивация осуществляется, примерно, в одинаковой степени.

Было изучено также влияние плазмиды рКМ101 на процесс Нсг-реактивации обработанного озоном фага  $\lambda$ . Установлено, что незначительное увеличение выживаемости фага наблюдается лишь в штаммах дикого типа. Поскольку Нсг-реактивация обработанных озоном всех трех фагов была практически одинакова во всех использованных штаммах, можно заключить, что продукты генов *recA*, *uvrA* и *lexA* непосредственно не участвуют в восстановлении повреждений озоном фаговой ДНК, и присутствие плазмиды рКМ101 существенного влияния на данный процесс также не оказывает.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Van-der-Zee J., Dubbelman T.M., van-Stevenick J. The role of hydroxyl radicals in the degradation of DNA by ozone//Free Radic. Res. Commun. 1987; 2(4-6): 279-84.
2. Steinberg J., Gleeson J., Gil D. The pathobiology of ozone induced damage//Arch. Environ. Health. 1990; 45 (2):80-7.
3. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Сравнительная оценка действия озона на бактерии *E.coli* K12 с различными дефектами систем репарации и рекомбинации//Тез. Докл. IY Всесоюз. общества генетиков и селекционеров им. Вавилова, Кишинев, Штиинца, 1981, ч.1, с.67.
4. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Действие озона на бактериофаги в системе фаг-клетка хозяин//Микробиология, Т.59.-С.832-836.

## W-РЕАКТИВАЦИЯ УМЕРЕННЫХ И ВИРУЛЕНТНЫХ ФАГОВ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УФ-ЛУЧЕЙ И ОЗОНА

**Фомичев А.Ю., Гриц Н.В.**

Белорусский государственный университет (кафедра биофизики), Минск, РБ.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Экспериментально доказанное ДНК-повреждающее действие озона на бактерии и вирусы [1-3], а также участие системы SOS-репарации в устранении повреждения ДНК индуцированных некоторыми активными формами кислорода [4], послужило причиной изучения способности озона активировать систему SOS-ответа и,



в частности, индуцировать W-реактивацию O<sub>3</sub>-поврежденных фаговых геномов. При этом в задачи входило определить наличие феномена W-реактивации при использовании УФ-лучей и озона как в качестве повреждающих агентов бактериофагов, так и индукторов SOS-ответа в различных комбинациях.

Были использованы бактериофаги T4 и P1 и бактерии E.coli K-12 с неповрежденными генами SOS-системы репарации (штамм АВ 1157) и несущие мутацию в гене lex A (штамм АВ 2494). Также были использованы производные указанных штаммов, содержащие плазмиду pKM101, способную увеличивать эффективность SOS-ответа при действии некоторых ДНК-тропных агентов.

В предварительных экспериментах были определены оптимальные дозы обработки фагов УФ-лучами и озоном, а также оптимальные условия индукции SOS-ответа у бактерий дикого типа.

В экспериментах по выявлению W-реактивации, полученные в экспоненциальной фазе роста бактерии дважды отмывали от питательной среды дистиллированной водой и делили на три части: контрольную (интактные клетки) и две опытных (клетки подвергали обработке УФ-лучами и озоном соответственно). Обработанные озоном и УФ-лучами фаги, а также необработанные фаги титровали на интактных и обработанных бактериях. Эксперименты проводили в затемненном помещении при ослабленном крапом цвете. Эффективность W-реактивации фагов определяли по формуле:

$$E = \frac{(\log S_1 - \log S_0) - (\log S_1^* - \log S_0^*)}{\log S_1 - \log S_0}, \text{ где:}$$

S<sub>0</sub> - титр необработанного фага в контроле;

S<sub>1</sub> - титр обработанного фага в контроле;

S<sub>0</sub>\* - титр необработанного фага в опыте;

S<sub>1</sub>\* - титр обработанного фага в опыте.

Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Эффективность W-реактивации УФ-облученного и O<sub>3</sub>-обработанного фага P1

Обработка фага	Обработка бактерий	АВ 1157	АВ 1157 (pKM101)	АВ 2494	АВ 2494 (pKM101)
УФ	УФ	0,2750	0,3126	-	0,0319
O <sub>3</sub>	УФ	0,1873	0,2884	-	-
УФ	O <sub>3</sub>	0,1824	0,2425	-	-
O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	0,1685	0,2045	-	-

Таблица 2

Эффективность W-реактивации УФ-облученного и O<sub>3</sub>-обработанного фага T4

Обработка фага	Обработка бактерий	АВ 1157	АВ 2494
УФ	УФ	0,1281	-
O <sub>3</sub>	УФ	0,1443	-
УФ	O <sub>3</sub>	0,0251	-
O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	0,0062	-

Исходя из данных, представленных в таблицах, можно сделать вывод, что озон индуцирует систему W-реактивации поврежденных ультрафиолетом и озоном фаговых геномов, хотя и в значительно меньшей степени по сравнению с УФ-лучами. Плаزمида pKM101 повышает эффективность системы SOS-репарации лишь в бактериях, содержащих неповрежденные гены, ответственные за SOS-ответ. W-реактивация в бактериях дефектных по lexA гену отсутствовала как в плазмидном, так и в бесплазмидном штаммах).

У штамма дикого типа W-реактивация бактериофагов, обработанных УФ-лучами, наиболее эффективно осуществлялась УФ-облученными бактериями. Минимальная эффективность W-реактивации зарегистрирована в случае O<sub>3</sub>-обработанных бактерий и фагов.

Известно, что интенсивность и продолжительность SOS-ответа зависит от силы и продолжительности индуцирующего сигнала, что в свою очередь определяет количество повреждений в молекуле ДНК. Ультрафиолет, как специфический ДНК-тропный агент, по-видимому, в данном случае наиболее эффективен. В свою очередь, ДНК-тропное действие озона опосредовано генерацией различных форм активного кислорода, и может быть ослаблено как протективным действием клеточной мембраны, так и процессами химической рекомбинации активных радикалов внутри клетки. С другой стороны, обработка озоном бактерий и фагов может



вызывать нарушение структурной целостности клеточной стенки и фагового капсида, препятствуя эффективности адсорбции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hamelin C, Chung-YS. Repair of ozone-induced DNA lesions in Escherichia coli B cells// *Mutat-Res.* Oct; 214(2): 253-5.
2. Victorin K. Review of the genotoxicity of ozone// *Mutat-res.* 1992 Sep; 277 (3): 221-38.
3. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Элиминация плазмид в результате обработки бактерий озоном // Гибридные плазмиды и экспрессия плазмидных генов.-Тез. докл. IX Всесоюзного совещания по программе «Плаزمида». -1984. -С. 184-185.
4. Фомичев А.Ю., Зорина Т.Е., Зорин В.П., Борздова О.Н., Черенкевич С.Н. Комбинированное действие видимого света в присутствии сенсibiliзатора и ионизирующего излучения на бактерии// Проблемы синергизма в радиобиологии. Пущино, 1990. - С 25-28.

УДК 582.288:579.264(043.2)

## О ШТАММАХ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В БОРЬБЕ С ГНИЛЯМИ ОВОЩЕЙ

**Храмцов А.К., Писная Л.В., Шуканов А.С.**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Возросшая в последнее десятилетие вредоносность многих болезней овощных культур вызвала необходимость изыскания действенных мер борьбы с патогенами. Приоритет биологических средств контроля неоспорим, так как подобные способы защиты растений являются экологически безопасными, что особенно актуально в Республике Беларусь. Поэтому выявление организмов, обладающих антагонистической реакцией к фитопатогенам, определение степени их антагонистической активности представляет собой актуальную задачу. По данным литературы большой процент антагонистически активных к фитопатогенам организмов приходится на почвенные грибы из рода *Trichoderma*.

Целью наших исследований явилась оценка *in vitro* антагонистической активности грибов *Trichoderma viride* 408, 434, 457 и *T. hamatum* 431, полученных из коллекции лаборатории микологии ИЭБ НАНБ, в отношении фитопатогенов *Botrytis allii*, *Fusarium sambucinum*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Антагонистическую активность грибов рода *Trichoderma* изучали методом встречных культур (Бабушкина И.Н., 1974) при одновременном посеве на картофельно-сахарозной агаризованной среде при оптимальных условиях. Ингибирование роста патогенов в процентах на 5-е сутки культивирования вычисляли как отношение разности роста гриба в контроле и во встречной культуре к росту этого же гриба в контроле (Aroga D.K., Dwivedi R.S., 1979). Гиперпаразитическая активность грибов рода *Trichoderma* определялась через 10 суток по 4-балльной шкале (Великанов Л.Л. и др., 1994). Влияние летучих метаболитов грибов рода *Trichoderma* на фитопатогены изучали, используя чашки Петри одинакового диаметра (Сейкетов Г.Ш., 1982).

В результате проведенных исследований установлено, что все штаммы грибов рода *Trichoderma* проявили к изучаемым фитопатогенам антагонистическую активность, степень которой у каждого антагониста зависит от вида фитопатогена.

Все штаммы антагонистов наиболее активно угнетали линейный рост гриба *B. allii*. Показатель ингибирования при этом составил от 29,4 до 66,7 %. Максимальное подавление роста *B. allii* отмечено при взаимодействии с *T. hamatum* 431. Ингибирование других фитопатогенов составило 12,7 - 44,9 % (*F. sambucinum*) и 15,0 - 28,5 % (*S. sclerotiorum*). В подавлении роста гриба *F. sambucinum* наиболее активен штамм *T. viride* 408, а *S. sclerotiorum* - *T. viride* 434 и 457.

Гиперпаразитическая активность штаммов рода *Trichoderma* была наибольшей также в отношении гриба *B. allii* и оценена в 1 балл для *T. viride* 408, 2 балла - *T. viride* 457, 3 балла - *T. hamatum* 431, 4 балла - *T. viride* 434. Грибы *T. viride* 434, 457, *T. hamatum* 431 не только нарастали на колонию патогена, но и обильно спороносили. Гриб *B. allii* во всех вариантах, кроме случая с *T. viride* 408, выглядел в сильной степени угнетенным. Штаммы *T. viride* 434, 457, *T. hamatum* 431 нарастали на колонию *S. sclerotiorum*, занимая её почти на 25 % (1 балл). Такая же гиперпаразитическая активность отмечена у штамма *T. viride* 434 по отношению к *F. sambucinum*. У других штаммов грибов рода *Trichoderma* в остальных вариантах нарастание мицелия на колонии фитопатогенов отсутствовало.

Летучие метаболиты грибов рода *Trichoderma* почти не угнетали рост исследуемых патогенов, а во многих вариантах даже стимулировали его. Так, только штаммы *T. viride* 457 и 408 в 1,1 и 1,2 раза соответственно ингибировали рост *S. sclerotiorum*. Во всех остальных случаях наблюдалась стимуляция роста патогенов от 1,0 - 1,2 (*S. sclerotiorum*), 1,1 - 1,2 (*F. sambucinum*) до 1,1 - 1,9 (*B. allii*) раза. Вероятно, вклад летучих метаболитов в общую антагонистическую активность изученных штаммов грибов рода *Trichoderma* не значителен или отсутствует.

Полученные результаты могут быть полезными при разработке способов защиты овощных культур от болезней, вызываемых грибами *B. allii*, *F. sambucinum*, *S. sclerotiorum*.