УДК 57.08

Н.А. Белясова, доцент; О.А. Мороз, студентка; Е.В. Акудович, студентка;
В.С. Ивчик, студентка; Н.В. Гриц, доцент

МЕТОДОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕСТ-КУЛЬТУР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

The collection of 34 mutant auxotrophic bacterial strains was obtained. Among them 4 strains with high level of induced reversible mutations under influence of several different mutagenous factors were chosen. These bacteria were used in some original methods of indication gene-toxic compounds in environment.

В последние годы, в связи с интенсивным изучением различного рода антропогенных воздействий на природную среду, большое внимание уделяется созданию новых контрольных методов биоиндикации (биотестирования), позволяющих оценивать состояние системы организм – среда [1].

Необходимость разработки таких методов обусловлена тем, что создание новых органических и неорганических веществ, чужеродных для естественной природы, осуществляется со все более возрастающими темпами. Они накапливаются в окружающей среде и включаются в трофические связи, в результате чего возрастает их концентрация в биомассе микроорганизмов, тканях растений, органах и тканях животных и человека.

Особую опасность для человека представляют вещества, способные вызывать повреждения структуры ДНК – носителя генетической информации. Данный класс веществ принято называть генотоксичными, поскольку, оказавшись в организме, они приводят к наследственно закрепленному нарушению структуры генов – мутациям. Попадание генотоксичных веществ в пищевые продукты, лекарственные вещества, питьевую воду, воздух, а также предметы обихода и, как следствие, в организм человека приводит к стремительному ухудшению генофонда человечества, поскольку влечет за собой накопление в нем рецессивных мутаций. Многие ксенобиотики, являясь мутагенными факторами, способны вызывать нарушения регуляции роста и деления клеток и поэтому являются канцерогенными [2]. В последнее время частота онкологических заболеваний людей резко увеличилась. Это можно связать с ухудшением общей экологической ситуации во многих регионах, значительный вклад в которую вносит загрязнение окружающей среды, в том числе накопление ксенобиотиков с мутагенными и канцерогенными свойствами. Между двумя названными свойствами веществ существует высокая степень корреляции. Известно, что около 85% всех известных канцерогенов являются мутагенами, в то время как менее 10% неканцерогенных соединений обладают мутагенным действием [3].

Для выявления генотоксичных соединений в объектах окружающей среды служит особая группа методов, среди которых возрастающий интерес вызывают методы биотестирования с использованием микроорганизмов. Разработке подходов к созданию бактериальных тест-систем для выявления генотоксичных веществ посвящено данное исследование.

В качестве объекта выбраны донорские штаммы кишечной палочки, в клетках которых с использованием двух наиболее универсальных методов мутагенеза – ультрафиолетового облучения (УФ) и обработки нитрозогуанидином (НГ) – индуцировали мутации, выражающиеся в утрате способности сбраживать какой-либо углевод, а также в приобретении зависимости по факторам роста (ауксотрофности).

В основу принципа использования таких мутантов положена их способность к обратным мутациям (реверсиям) под действием генотоксичных соединений, которую легко обнаружить при высеве этих бактерий на содержащую потенциальный мутаген синтетическую среду без факторов роста. На такой среде должны формировать колонии только клетки ревертантов. Таким образом, появляется возможность выявлять мутантные бактерии даже при их очень низком содержании в культуре: до 10^{-8} на клетку.

Всего получено 34 зависимых по факторам роста мутанта, характеристика которых представлена в табл. 1. Кроме этого, индуцировано 6 мутаций по неспособности к сбраживанию лактозы (*lac*$^-$). Полученные мутанты исследовались, прежде всего, на способность к реверсиям под действием наиболее распространенных мутагенных факторов – УФ и НГ. Оказалось, что только 9 из них (выделены жирным шрифтом в табл. 1) образовывали ревертанты на синтетических средах при воздействии обоих мутагенов, то есть могли содержать точковые мутации.

Таблица 1

Характеристика мутантов *E.coli* HfrH

Способ получения	Мутантные штаммы, генотип	Способны к реверсии под действием	
		УФ	НГ
Индукция УФ	У1(*ade*$^-$), У4(*pro*$^-$), У5(*leu*$^-$), У17(*leu*$^-$), У9(*his*$^-$), У11(*gly*$^-$), У12(*trp*$^-$), У26(*trp*$^-$), У14(*arg*$^-$), У21(*pro*$^-$), У22(*met*$^-$), У25(*ala*$^-$), У28(*lys*$^-$), УЛ1, 2 (*lac*$^-$)	**У1(*ade*$^-$)**, **УЛ2(*lac*$^-$)**, У22(*met*$^-$), У25(*ala*$^-$)	**У1(*ade*$^-$)**, **УЛ2(*lac*$^-$)**, У9(*his*$^-$)
Индукция НГ	Н9(*hpt*$^-$), Н10(*thi*$^-$), Н12(*pro*$^-$), Н32(*pro*$^-$), Н48(*pro*$^-$), Н15(*arg*$^-$), Н20(*lys*$^-$), Н45(*lys*$^-$), Н22(*ile*$^-$), Н52(*ile*$^-$), Н23(*his*$^-$), Н25(*pdx*$^-$), Н34(*phe*$^-$), Н37(*thr*$^-$), Н49(*leu*$^-$), Н53(*cys*$^-$), Н59(*cys*$^-$), Н16(*cys*$^-$), Н60(*pan*$^-$), Н61(*met*$^-$), Н7(*met*$^-$), НЛ1—4 (*lac*$^-$)	**Н10(*thi*$^-$)**, **Н32(*pro*$^-$)**, **Н48(*pro*$^-$)**, **Н49(*leu*$^-$)**, **Н59(*cys*$^-$)**, **Н60(*pan*$^-$)**, **НЛ1(*lac*$^-$)**, Н9(*hpt*$^-$), Н37(*thr*$^-$), НЛ2(*lac*$^-$)	**Н10(*thi*$^-$)**, **Н32(*pro*$^-$)**, **Н48(*pro*$^-$)**, **Н49(*leu*$^-$)**, **Н59(*cys*$^-$)**, **Н60(*pan*$^-$)**, **НЛ1(*lac*$^-$)**, Н7(*met*$^-$), Н12(*pro*$^-$), Н15(*arg*$^-$), Н53(*cys*$^-$), Н61(*met*$^-$)

Мутации, содержащиеся в клетках используемых в биотестировании бактерий, должны характеризоваться стабильностью (низкой частотой спонтанных реверсий), чтобы на этом фоне можно было регистрировать индуцированные генотоксичными ксенобиотиками реверсии, а также способностью к реверсиям под действием мутагенов, отличающихся от тех, с чьей помощью индуцировали прямую мутацию. Поэтому у отобранных мутантных бактерий анализировали стабильность наследования мутаций, которую оценивали по эффективности формирования спонтанных ревертантов, а также способность к реверсиям в присутствии других мутагенных факторов – этилметансульфоната (ЭМС) и β-пропиолактона.

Эти исследования позволили выявить среди полученных мутантных бактерий *E.coli* HfrH четыре типа, наследующих, предположительно, точковые мутации (проявляли способность ревертировать к прототрофности в присутствии всех испытанных мутагенных факторов) (табл. 2).

Таблица 2

Особенности мутантов *E.coli* HfrH, способных к реверсиям под действием НГ и УФ

Мутант	Частота спонтанной реверсии	Способность к реверсии под действием веществ	
		ЭМС	β-пропиолактон
У1(*ade*$^-$)	$3{,}0\cdot10^{-7}$	+	+
УЛ2(*lac*$^-$)	$1{,}6\cdot10^{-8}$	–	+
Н10(*thi*$^-$)	$7{,}2\cdot10^{-8}$	–	–
Н32(*pro*$^-$)	$6{,}3\cdot10^{-8}$	+	–
Н48(*pro*$^-$)	$5{,}5\cdot10^{-8}$	–	–
Н49(*leu*$^-$)	$1{,}2\cdot10^{-8}$	+	+
Н59(*cys*$^-$)	$8{,}5\cdot10^{-9}$	+	+
Н60(*pan*$^-$)	$3{,}4\cdot10^{-8}$	+	–
НЛ1(*lac*$^-$)	$7{,}6\cdot10^{-9}$	+	+

Анализ табличных данных позволяет заключить, что точковыми мутациями являются: зависимость по аденину (У1), лейцину (Н49), цистеину (Н59) и неспособность сбраживать лактозу (НЛ1). Перечисленные мутанты демонстрируют образование прототрофных ревертантов на синтетических средах без факторов роста с лактозой в качестве единственного источника углерода и энергии под действием четырех мутагенных факторов с разным механизмом воздействия на ДНК: ультрафиолетового излучения, нитрозогуанидина, этилметансульфоната и β-пропиолактона.

Мутагенная активность веществ может быть оценена по частоте индукции мутаций к прототрофности у ауксотрофных мутантов. При этом чувствительность метода зависит от способа нанесения потенциального мутагена на газон бактериальной культуры, поскольку в каждом случае будет исследована разная концентрация вещества. Кроме того, как известно, на эффективность мутагенеза оказывает влияние длительность воздействия мутагена на клетки. Чтобы учесть все названные факторы, предложено и апробировано несколько способов оценки мутагенной активности N-метил-N`-нитро-N-нитрозогуанидина на бактерии *E.coli* HfrH H59 *Cys*$^-$:

1) на «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили фильтр (диаметром 0,6 см), смоченный в водном растворе НГ (200 мкг/мл);

2) на «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили стеклянный цилиндр (внутренний диаметр 0,5 см), в который помещали 0,1 мл водного раствора НГ (200 мкг/мл);

3) на «газон» бактерий в поздней логарифмической фазе роста на плотной синтетической среде с лактозой наносили кристаллик НГ (массой ~2 мг);

4) в 3 мл полужидкой (0,7% агар-агара) синтетической среды, расплавленной и остуженной до 45° С, вносили 0,1 мл водного раствора НГ (3 мг/мл) и 0,2 мл бактерий в поздней логарифмической фазе роста (~$5\cdot10^8$ кл./мл). Смесь быстро перемешивали круговыми движениями и выливали на «нижний» слой (плотная синтетическая лактозосолевая среда);

5) бактерии в поздней логарифмической фазе роста отмывали от бульона жидкой синтетической средой, получая 0,2 мл суспензии с концентрацией клеток ~$5\cdot10^8$ кл./мл. Добавляли к суспензии равный объем раствора НГ в аналогичной по составу жидкой

среде (3 мг/мл). Инкубировали смесь 30 мин при 30°С, после чего вносили в расплавленный «верхний» агар, как в пункте 4;

6) осуществляли все манипуляции, как в пункте 5, за исключением режима преинкубации, которую проводили при 37° С в течение 20 мин.

Все посевы инкубировали в течение 48 ч при 37°С, после чего учитывали плотность кольца (интенсивность роста клеток в нем) в методах 1—3 или подсчитывали количество колоний, образованных бактериями-ревертантами (Cys^+) в методах 4–6. Результаты суммированы в табл. 3.

Таблица 3

Характеристика методов анализа мутагенной активности НГ по отношению к бактериям *E.coli* HfrH H59 Cys^-

Метод (№)	Среднее число колоний ревертантов на чашке	Плотность кольца ревертантов
1	–	++
2	–	++++
3	–	+++
4	19,3	–
5	20,8	–
6	18,6	–

Представленные результаты позволяют сделать выбор в пользу методов 2 и 5, однако для более полной их характеристики следует испытать различные концентрации химических веществ с мутагенной активностью, определив в каждом случае характер зависимости эффективности реверсии от концентрации мутагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Христова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. –М.: Наука, 1989.

2. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. –М.: Мир, 2000.

3. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. –М.: Мир, 1984.

УДК 557.21.044.14

Т.В. Чаевская, ассистент; Н.А. Белясова, доцент; Н.В. Гриц, доцент

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОБМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ У БАКТЕРИЙ LACTOCOCCUS LACTIS

The comparative analysis of such methods of the genetic information transfer of lactococcus, as conjugation, transduction and protoplast fusion carried out. The choice is made for the benefit of last method as the most effective and perspective.

В современном производстве биологически полноценных и экологически безопасных кисломолочных продуктов питания используются закваски и бактериальные концентраты, в состав которых входят штаммы бактерий рода Lactococcus. Для получения высококачественных продуктов необходимо использовать штаммы с определён-