

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

19-84-543

М.Г.Аносова, В.И.Корогодин

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИЗОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ
ESCHERICHIA COLI K12(λ)
НА СПОНТАННЫЙ УРОВЕНЬ ФАГА

Направлено в журнал "ЖИЭИ"

1984

Бактериофаг λ относится к группе умеренных вирусов, характеризующихся тем, что они могут существовать в виде провируса /профага/, интегрированного в геном бактериальной клетки. С небольшой частотой профаги могут спонтанно переходить в вегетативное состояние, что сопровождается появлением в культуре свободных фаговых частиц, обуславливающих наличие спонтанного уровня фага. Хотя молекулярные механизмы индукции фагов в лизогенных культурах бактерий известны ^{1/}, а также описаны разные физические, химические и биологические факторы, повышающие частоту таких событий ^{2/}, закономерности спонтанной фагопродукции практически не изучены ^{3/}.

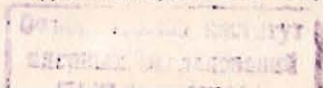
Как отмечал Хакоб ^{2/}, большая часть опытов в бактериофагии и, в частности, опыты по индукции умеренных фагов плохо воспроизводимы, если пользоваться культурой, находящейся не в экспоненциальной фазе роста. Спонтанная фагопродукция также идет в основном в экспоненциальной фазе роста лизогенной культуры. Это особенно четко проявляется при использовании лизогенных штаммов, не адсорбирующих гомологичный фаг ^{4/}.

При постановке опытов по изучению лизогении обычно используют так называемые "ночные" или "суточные" бульонные культуры бактерий ^{2/}. При этом мало обращается внимания на условия предварительного выращивания и способ хранения посевного материала для получения таких культур. С целью стандартизации условий экспериментов нами были проведены опыты, которые показали, что способ предварительного культивирования бактерий может существенно влиять на их спонтанную фагопродукцию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выяснения влияния условий предварительного культивирования на фагопродукцию использовали штамм *Escherichia coli* K12(λ), лизогенный по фагу λ , клетки которого не адсорбируют этот фаг на своей поверхности. В качестве индикаторного использовали штамм *E. coli* C, устойчивый к стрептомицину /500 ед. в 1 мл среды/.

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду /бульон бычьего сердца с дрожжевым экстрактом/ и твердую питательную среду МПА /1,3% мясо-пептонный агар с 0,01 М $MgSO_4$ для титрования фага, 2% МПА - для титрования бактерий/. Для смыва культур с твердой среды и для разведения использовали 0,85%-й раствор NaCl в бидистиллированной воде. Культивирование



бактерий проводили при 37°C. Исходные культуры хранили на скошенном МПА в холодильнике при 4°C.

Бактериальные культуры готовили следующими тремя способами:

Способ 1. Исходную культуру пересевали на свежий скошенный МПА; через 24 часа инкубации при 37°C делали сыв /в 5 мл среды для разведения/ и в нем определяли М-концентрацию бактерий и титр свободного фага.

Способ 2. Инокулом из исходной культуры переносили в пробирки с 2,5 мл жидкой питательной среды и через 24 часа инкубации при 37°C определяли М-концентрацию бактерий и титр свободного фага.

Способ 3. Исходную культуру пересевали на свежескошенный МПА, инкубировали 24 часа при 37°C, а затем делали засев в 2,5 мл жидкой питательной среды; после дополнительной инкубации в течение 24 часов при 37°C определяли М-концентрацию бактерий и титр свободного фага.

М-концентрацию бактерий определяли методом агаровых слоев /5/. Титр свободного фага определяли с помощью стрептомициновой методики Бертани /6/.

Культуру бактерий для определения фагопродукции готовили одновременно всеми тремя способами. Для определения М-концентрации бактерий и титра свободного фага использовали по пять параллельных проб из каждой культуры; каждую пробу рассевали на три чашки Петри. Опыты повторяли шесть раз в разные сроки. Достоверительные интервалы для М-концентраций бактерий и титров свободного фага рассчитывали с помощью критерия Стьюдента для $\beta = 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных опытах, используя 2-й метод подготовки культуры, определяли влияние на титр свободного фага содержания в жидкой питательной среде дрожжевого экстракта. Результаты приведены в табл.1. Было установлено, что изменение в содержании дрожжевого экстракта от 0,25 до 2% практически не влияет на М-концентрацию бактерий; титр фага при содержании дрожжевого экстракта 0,25, 0,50 и 1,00% также оставался постоянным и увеличивался в два раза лишь при 2,00% дрожжевого экстракта. Сходные данные были получены и другими авторами /2/. Для основных опытов использовали питательную среду, содержащую 0,50% дрожжевого экстракта, небольшие колебания в концентрации которого не могли сказаться на титре свободного фага.

Результаты шести независимых опытов по определению влияния способов культивирования бактерий на их М-концентрацию и титр свободного фага приведены в табл.2. Видно, что, как в разных опытах, так и при разных способах культивирования, М-концентрация

Таблица 1

Влияние содержания дрожжевого экстракта в жидкой питательной среде на М-концентрацию бактерий и титр свободного фага.

Содержание дрожжевого экстракта, %	Титр бактерий, $\cdot 10^7$ в мл	Титр фага, $\cdot 10^5$ в мл
0,25	97,2 \pm 7,0	15,4 \pm 1,6
0,50	99,1 \pm 13,1	15,2 \pm 2,0
1,00	95,3 \pm 13,8	17,4 \pm 1,4
2,00	91,6 \pm 9,0	35,0 \pm 3,9

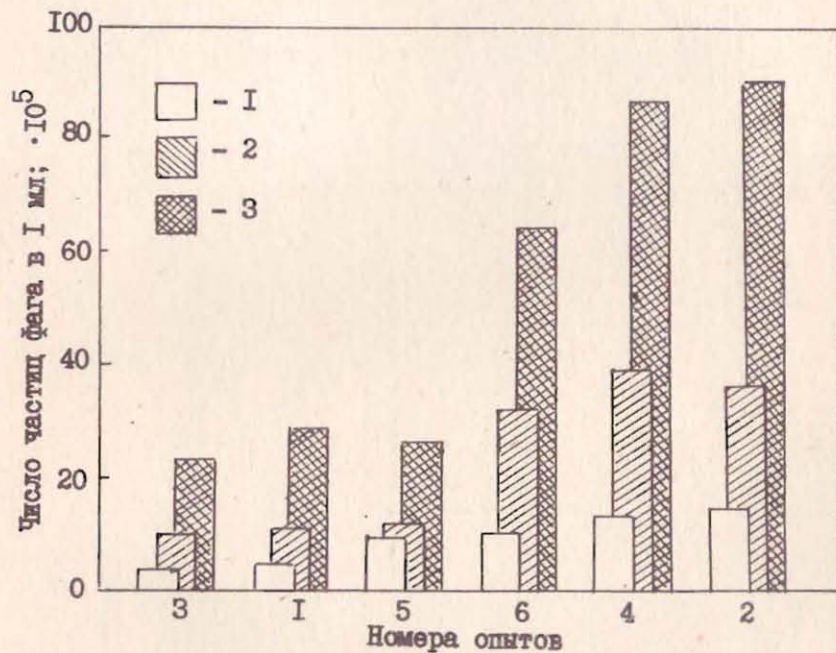
бактерий варьирует незначительно: достоверных отклонений от среднего значения, равного $95,9 \pm 13,8 \cdot 10^7$ клеток в мл, зарегистрировано не было. В то же время выход свободного фага существенно изменялся от опыта к опыту, так что крайние значения его для каждого из способов культивирования различались в 3-4 раза /различия между крайними значениями статистически достоверны, $P < 0,01$ /. Систематически различались между собой и значения выхода фага при разных способах культивирования: при 1-м способе культивирования выход фага изменялся в пределах $3,9 \div 14,9 \cdot 10^5$ частиц в мл, при 2-м способе - в пределах $10,2 \div 39,4 \cdot 10^5$ а при 3-м способе - в пределах $26,3 \div 89,3 \cdot 10^5$. При этом, несмотря на различия в выходе фага от опыта к опыту, относительные различия выходов фага при разных способах культивирования оставались примерно одинаковыми: при 2-м способе культивирования выход фага почти во всех опытах /за исключением опыта №5/ примерно в 2,6 раза был выше, чем при 1-м способе, а при 3-м способе - примерно в 6,0 раз выше, чем при 1-м. Эта закономерность хорошо иллюстрируется рисунком, где результаты, полученные во всех шести опытах, расположены вдоль оси абсцисс в порядке возрастания выхода фага при 1-м способе культивирования.

Приведенные выше данные интересны в двух отношениях. Во-первых, различия в титрах фага, наблюдавшиеся при одинаковых значениях М-концентраций бактерий как при разном содержании дрожжевого экстракта в среде, так и в разных опытах и, особенно, при разных способах культивирования бактерий, означают, что условия культивирования могут независимо влиять на эти два показателя состояния лизогенных культур. Влияние способов куль-

Влияние способов культивирования на М-концентрацию бактерий и на титр свободного фага

Опыт №	М-концентрации бактерий $\times 10^7$ кл./мл			Титр свободного фага $\times 10^5$ частиц/мл		
	1-й способ	2-й способ	3-й способ	1-й способ	2-й способ	3-й способ
1	97,6 \pm 2,4	110,5 \pm 6,8	105,7 \pm 6,2	4,9 \pm 0,4	11,4 \pm 0,6	26,6 \pm 1,2
2	109,5 \pm 7,1	119,0 \pm 6,7	115,2 \pm 14,3	14,9 \pm 2,3	36,7 \pm 3,4	89,3 \pm 3,3
3	115,7 \pm 16,6	106,0 \pm 10,2	113,3 \pm 7,2	3,9 \pm 0,2	10,2 \pm 1,0	23,6 \pm 2,1
4	101,5 \pm 6,4	121,0 \pm 10,3	109,0 \pm 9,7	13,7 \pm 0,6	39,5 \pm 6,1	87,0 \pm 8,1
5	113,2 \pm 7,1	103,5 \pm 8,5	112,0 \pm 8,6	9,7 \pm 0,2	12,1 \pm 1,5	26,3 \pm 9,6
6	105,1 \pm 10,2	105,1 \pm 10,2	102,1 \pm 4,7	10,9 \pm 0,6	27,6 \pm 2,7	64,5 \pm 3,5

тивирования бактерий на их фагопродукцию проявляется в том, что относительные значения титров фага, наблюдающиеся при разных способах культивирования, практически не зависят от их абсолютных значений, изменяющихся от опыта к опыту. Во-вторых, тот факт, что абсолютные значения титров фага при разных способах культивирования одинаково изменялись от опыта к опыту, которые проводились в разные сроки /напомним, что в каждом опыте фагопродукция при каждом способе культивирования определялась одновременно/, может означать, что, помимо способов культивирования и состава питательных сред, на фагопродукцию лизогенных бактерий влияют какие-то внешние факторы, действующие независимо от условий их выращивания. Ранее уже отмечалось, что одним из таких факторов может быть геомагнитная активность ¹⁷⁾.



Влияние способов культивирования лизогенных бактерий на титры свободного фага. 1, 2 и 3 - 1-й, 2-й и 3-й способы культивирования /см. в тексте/. Ось абсцисс - номера опытов, расположенных в порядке возрастания данных; ось ординат - титр свободного фага, в 10^5 частиц в мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фаг лямбда. /под ред. А.Д.Херши/. Изд-во "Мир", М., 1975.
2. Jacob F. Les bacteriies lisogenes at la notion de provirus. Masson, Paris, 1952.

3. Marcovich H. Etude radiobiologique du systeme lisogene E coli K12(λ), Paris, 1957.
4. Левашев В.С. и др. Влияние медленно изменяющихся магнитных полей малой напряженности на продукцию фага лизогенными бактериями E coli K12(λ), ЖМЭИ, 1974, №2, с. 20.
5. Gratia A. Ann.Inst.Pasteur, 1936, vol. 576, p. 652.
6. Bertani G. J.Bacteriol., 1951, vol. 62, p. 3.
7. Левашев В.С. и др. Проблемы космической биологии, Изд-во "Наука", М., 1973, т. 18, с. 189.

Рукопись поступила в издательский отдел
24 июля 1984 года.

Аносова М.Г., Корогодин В.И. 19-84-543
Влияние некоторых факторов культивирования лизогенных бактерий Escherichia coli K12(λ) на спонтанный уровень фага

При разных условиях культивирования лизогенных бактерий Escherichia coli K12(λ), не влияющих на их M-концентрацию, содержание свободного фага в культуре может различаться в несколько раз. Эти различия хорошо воспроизводятся от опыта к опыту и мало зависят от колебаний абсолютных значений титра фага.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод О.С.Виноградовой

Anosova M.G., Korogodin V.I. 19-84-543
Influence of Some Factors of Lysogenic Bacteria Escherichia coli K12(λ) Cultivation of Phage's Spontaneous Level

Under different conditions of lysogenic bacteria Escherichia coli K12(λ) cultivation, which do not effect their M-concentration, the content of free phage in culture could differ by several times. These differences are well reproduced from experiment to experiment and weakly depend on the fluctuations of absolute values of phage's concentration.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984