

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-86-378

М.Г.Аносова, М.Н.Бонев, В.И.Данилов, Ю.В.Таран

КИНЕТИКА РОСТА
И СПОНТАННОЙ ФАГОПРОДУКЦИИ
ЛИЗОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *E. coli* K12 (λ)
В УСЛОВИЯХ ЭКРАНИРОВАНИЯ
ГЕОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

Направлено в журнал "Микробиология,
эпидемиология, иммунология"

1986

Из имеющихся в настоящее время литературных данных нельзя однозначно ответить на вопрос - влияет ли экранирование от ГМП на жизнедеятельность микроорганизмов^{/9, 10, 12/}, что связано с плохой воспроизводимостью экспериментальных результатов.

В известных нам работах использовались экраны с коэффициентами экранирования не более 10^3 , где изучался рост бактерий в различных условиях культивирования.

В своей работе мы исследовали кинетику роста лизогенных бактерий в условиях периодического культивирования, а также кинетику спонтанной фагопродукции, которая является одним из наиболее чувствительных показателей физиологического состояния бактериальной популяции. Опыты проводились в экране с коэффициентом экранирования ГМП не менее 10^5 .

Материалы и методы исследования. Для ослабления ГМП применялся магнитный экран, состоящий из восьми коаксиальных пермалловых цилиндров^{/4/}. Остаточное магнитное поле в полости экрана составляло 0,5-2,0 нТ в диапазоне $2 \cdot 10^{-1}$ Гц. Контрольная установка по конструкции идентична "магнитному экрану", с той лишь разницей, что в ней использовались коаксиальные цилиндры из пенопласта.

Бактериальные штаммы: *E. coli* K12 (H) - лизогенный по фагу λ , стрептомицинчувствительный, неадсорбирующий его на своей поверхности. *E. coli* C - чувствительный к фагу λ , устойчивый к стрептомицину. Штаммы были получены из музея кафедр микробиологии 2-го МОЛГМИ им. И.И.Пирогова. Среда для культивирования бактерий - бульон М9^{/8/}. Среда для титрования фага и числа жизнеспособных бактерий - агар Н^{/8/}.

Объединенный институт
ядерных исследований
БИНЕ ПИСТЕНА

В магнитном экране и контрольной установке бактерии инкубировались в пяти стеклянных культиваторах, рабочий объем каждого из них составлял 50 мл. Термостатирование культиваторов каждой из установок осуществлялось с помощью ультратермостата, при этом температура в рабочем объеме поддерживалась в интервале $37 \pm 0,1^{/6/}$. Аэрация и перемешивание осуществлялись путем продува стерильного воздуха со скоростью 10 л/г. Пробы отбирались через шланги с помощью шприцев.

Количество свободного фага в растущей лизогенной культуре определяли с помощью стрептомициновой методики ^{/II/}. Количество жизнеспособных бактерий определяли методом агаровых слоев.

Результаты и обсуждение. В предварительной серии экспериментов нами была изучена кинетика роста лизогенных бактерий в условиях периодического культивирования.

Таблица I. Кинетика роста лизогенных бактерий *E. coli* K12 (λ) в условиях геомагнитного поля и магнитного экрана

Условие культивирования	Число бактерий в 1 мл среды М9							
	$\times 10^6$	$\times 10^7$	$\times 10^7$	$\times 10^8$	$\times 10^8$	$\times 10^9$	$\times 10^9$	$\times 10^9$
Геомагнитное поле	$5,08 \pm 0,11$	$7,36 \pm 0,1$	$2,04 \pm 0,05$	$9,51 \pm 0,1$	$6,11 \pm 0,11$	$1,15 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,18$
Магнитный экран	$5,08 \pm 0,11$	$7,60 \pm 0,11$	$2,09 \pm 0,05$	$9,54 \pm 0,12$	$6,45 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,05$	$1,16 \pm 0,05$	$1,21 \pm 0,28$
	0	0,75	1,5	3	6	9	12	18
	Время инкубации в часах							

Как видно из таблицы I, число жизнеспособных бактерий в условиях ГМП и в условиях экранирования практически не отличаются, незначительные различия можно отметить лишь в экспоненциальной фазе. Так, для шестичасовой пробы эта разница составляет $5\% \pm 2\%$ ($p < 0,05$).

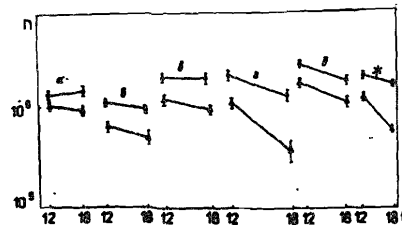
Эти незначительные различия в числе жизнеспособных бактерий могут быть связаны с лизисом лизогенных бактерий в условиях ГМП, обусловленным индукцией профага λ.

Известно, что в результате индукции профага λ из одной бактерии высвобождается в среднем около 100 фаговых частиц ^{/7/}. Таким образом, незначительные различия в числе жизнеспособных бактерий могут привести к достоверной разнице в числе свободного фага в растущей лизогенной культуре.

Это предположение позволило нам перейти к изучению кинетики спонтанной фагопродукции у лизогенных бактерий в условиях ГМП и в магнитном экране.

Уже после шести независимых экспериментов нами были получены четкие различия в содержании свободного фага в ГМП по сравнению с магнитным экраном в интервале от 9-го до 18-го часа инкубации. Самая большая разница наблюдалась от 12 до 18 часа инкубации (рис. I).

Рис. I. Фагопродукция лизогенной культуры *E. coli* K12 (λ) в стационарной фазе роста в условиях ГМП и магнитного экрана.



а, б, в, г, д, ж - шесть независимых опытов, по оси абсцисс - время (пробы в 12 ч, 18 ч), по оси ординат - количество свободного фага в 1 мл. (▲ - ГМП, * - магнитный экран).

Различия в течение первых шести часов инкубации были не столь значительными, в связи с чем нами была предпринята отдельная серия из 28 экспериментов, где детально была изучена кинетика спонтанной фагопродукции в интервале от 0 до 6 ч инкубации бактерий в условиях ГМП и магнитного экрана.

Эксперименты этой серии проводились ежедневно в течение наиболее магнитоактивных дней (март-апрель) в одно и то же время, с 18 до 24 ч. Данные приведены в таблице 2.

На рис. 2 представлены кривые кинетики спонтанной фагопродукции в условиях ГМП и магнитного экрана. Как видно из представленных результатов, количество свободного фага в условиях ГМП превышает количество свободного фага в магнитном экране в экспоненциальной фазе роста. Их разница статистически достоверна ($p < 0,001$), и для шестого часа инкубации равна 21%. В стационарной фазе роста (от 9 до 18 ч)

спонтанная фагопродукция уменьшается как в условиях ГМП, так и в "магнитном экране", причем в этом случае в ГМП количество свободного фага становится меньше, чем в магнитном экране. Так, после восемнадцатичасовой инкубации количество свободного фага в условиях ГМП меньше, чем в магнитном экране, а 170% ($P < 0,001$).

Таблица 2. Количество свободного фага в лизогенной культуре *E. coli* K12(λ) в экспоненциальной фазе роста в условиях геомагнитного поля и в магнитном экране

Условия культивирования	Количество свободного фага в 1 мл среды М9		P
	$\times 10^5$	$\times 10^6$	
Геомагнитное поле	1,41 \pm 0,02	4,73 \pm 0,07	<0,01
Магнитный экран	1,32 \pm 0,02	3,67 \pm 0,05	<0,001
	3	6	
	Время инкубации в часах		

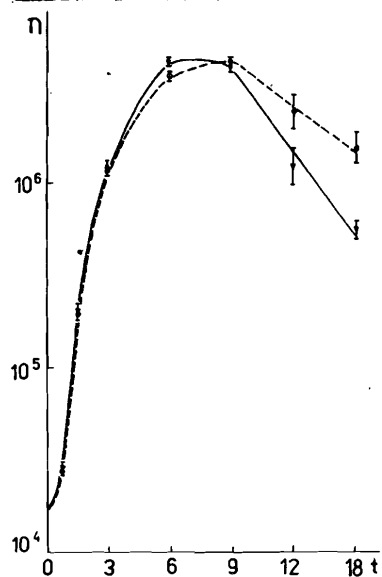


Рис. 2. Кинетика фагопродукции лизогенной культуры *E. coli* K12 (λ) в условиях ГМП и в магнитном экране.
по оси абсцисс — время в часах,
по оси ординат — количество свободного фага в 1 мл.
(\blacktriangledown — ГМП, \bullet — магнитный экран)

Относительная легкость воспроизведения эффекта от 9 до 18 часов инкубации позволяет нам предположить, что эффекты в стационарной и экспоненциальной фазах носят разный характер.

Значительное уменьшение спонтанной фагопродукции в стационарной фазе в условиях ГМП может быть связано с неодинаковой

реадсорбцией фаговых частиц на поверхности бактерий в условиях геомагнитного поля и в условиях экрана. Увеличение же фагопродукции в условиях ГМП по сравнению с магнитным экраном в экспоненциальной фазе развития может быть связано с магнитной индукцией профага λ .

Для того чтобы проверить последнее утверждение, мы рассчитали частоты спонтанной индукции фага в условиях ГМП и в условиях магнитного экрана. С этой целью предложили следующую формулу:

$$P_{\Delta t} = \frac{n_{\Delta t}}{c \int_{t_1}^{t_2} N(t) dt},$$

где: $n_{\Delta t}$ — число свободных фаговых частиц в интервале $t_2 - t_1$,
 $N(t)$ — число жизнеспособных бактерий в момент времени t ,
 c — константа — средний выход фага из одной клетки. Как следует из ранее полученных данных [7], эта константа для фага λ равна 100.

Эта формула предложена нами вместо ранее принятой [13]:

$$P = \frac{n}{cN}.$$

Используя свои данные по кинетике роста и кинетике спонтанной фаговой продукции лизогенных бактерий в условиях ГМП и магнитного экрана, мы рассчитали интегралы с помощью БЭСМ-6. Результаты расчета частот индукции профага λ для интервалов времени: 1) 0-0,75 часа, 2) 0,75-1,5 часа, 3) 1,5-3,0 часов, 4) 3,0-6,0 часов, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Частота спонтанной индукции фага λ в лизогенной культуре *E. coli* K12 (λ) в условиях геомагнитного поля и в магнитном экране

Временные интервалы (час)	Частота спонтанной индукции	
	ГМП	Магнитный экран
0 - 0,75	(2,69 \pm 0,06) $\cdot 10^{-5}$	(2,53 \pm 0,06) $\cdot 10^{-5}$
0,75 - 1,50	(1,86 \pm 0,06) $\cdot 10^{-4}$	(1,78 \pm 0,07) $\cdot 10^{-4}$
1,5 - 3,0	(1,37 \pm 0,08) $\cdot 10^{-4}$	(1,30 \pm 0,08) $\cdot 10^{-4}$
3,0 - 6,0	(3,43 \pm 0,17) $\cdot 10^{-5}$	(2,87 \pm 0,15) $\cdot 10^{-5}$
	$P < 0,05$	

Из таблицы видно, что частота индукции в различные фазы роста лизогенных бактерий меняется более чем на порядок, причем в ГМП она всегда выше, чем в экране. Максимальная частота индукции как в случае ГМП, так и для магнитного экрана, наблюдается в начальный период

экспоненциальной фазы развития (0,75-1,5 часа). Затем она уменьшается как в экране, так и в ГМП. В конце экспоненциальной фазы в условиях ГМП частота индукции выше, чем в экране, на 19,5% ($P < 0,05$).

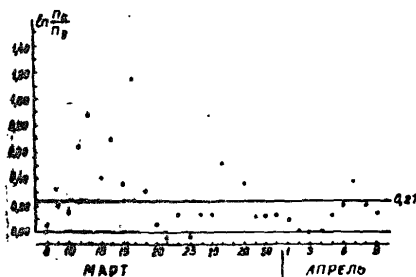
Так как частота спонтанной индукции увеличивается в условиях ГМП, т.е. в условиях так называемого общепринятого стандартного "контроля", то очевидно, что количество свободного фага в лизогенной культуре ото дня ко дню в "контроле" должно варьировать из-за наличия значительных вариаций ГМП^{/5/}.

Этот факт был обнаружен нами ранее^{/6/} и подтвержден в более поздних работах^{/1,2/}.

На рис.3 представлены данные спонтанной фагопродукции в условиях ГМП и магнитного экрана для шестичасовой пробы. Для наглядности в этом рисунке по оси ординат представлены логарифмы отношения числа свободного фага в условиях ГМП к числу свободного фага в магнитном экране. Из рисунка видно, что величина $n_{ГМП}$ за период с 8.03 по 09.04 изменяется более чем на порядок, а величина $n_{МЭ}$ имела за этот же период менее выраженные вариации.

Рис.3. Фагопродукция лизогенной культуры *E. coli* K12 (ϕ) в экспоненциальной фазе роста в условиях ГМП и магнитного экрана.

По оси абсцисс - опыты с 8 марта по 10 апреля;
по оси ординат - логарифм отношения количества свободного фага в I мл в ГМП к количеству свободного фага в I мл в магнитном экране для шестичасовой пробы.



Расчитав коэффициент корреляции между $n_{ГМП}$ и $n_{МЭ}$ для шестичасовой и трехчасовой проб, мы получили, что для трехчасовой пробы он равен $r = 0,87 \pm 0,10$ ($P < 0,01$), а для шестичасовой пробы $r = 0,77 \pm 0,12$ ($P < 0,01$).

Все вышесказанное указывает на то, что геомагнитное поле является одним из факторов, влияющих на спонтанный уровень фагопродукции у лизогенных бактерий.

Возвращаясь к вопросу о воспроизводимости экспериментальных результатов в экспериментах с магнитным экраном, обратимся к рис.3, из которого видно, что величина, и, особенно, достоверность разницы между $n_{ГМП}$ и $n_{МЭ}$, существенно зависят от числа поставленных экспериментов. Это возможно, связано с тем, что ГМП является нерегулярным фактором, силь-

но меняющимся ото дня ко дню, в связи с чем в подобных исследованиях изучаемый фактор не задается экспериментатором. В тех случаях, когда конкретное ГМП данного дня имеет эффективные параметры, с помощью экрана удается четко отметить эффект; в те же дни, когда эта эффективная компонента ГМП меньше, мы регистрируем более слабый эффект экранировки, в те дни, когда ее нет - эффект отсутствует.

В связи с этим нам представляется целесообразным в подобного рода исследованиях:

1. Использовать достаточно чувствительный физиологический критерий.
2. Проводить эксперименты в период сильной геомагнитной активности.
3. Проводить их в достаточном числе.
4. Рассматривать, по возможности, полный цикл развития бактериальной популяции при контролируемых константах культивирования.

Авторы благодарят В.Н.Аносова за расчеты величины $R_{\Delta t}$ на БЭСМ-6, А.И.Чепурного за большой труд при изготовлении установки "Магнитный экран", а также выражают глубокую признательность профессору В.И.Корогодину и профессору В.С.Левашеву за многочисленные и полезные обсуждения.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аносова М.Г.; Корогодин В.И. Радиобиология. 1984, № 2.
2. Аносова М.Г., Корогодин В.И. ЖМЭИ, 1985, № 1, с.29-31.
3. Давидков Д.С. и др. ОИЯИ, РГ9-83-221, Дубна, 1983
4. Давидков Д.С. и др. ОИЯИ, РГ3-81-586, Дубна, 1981.
5. Заболотная Н.А. "Индексы геомагнитной активности". Гидрометеопиздат, М., 1977.
6. Левашев В.С. и др. Проблемы космической биологии. "Наука", М., 1973, т.18, с.189-194.
7. Лурья. Общая вирусология. "Мир", М., 1981.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. "Мир", М., 1976, с. 395.

9. Becker R.O. Med. Elektron and Biol. Engin., 1968, 1, p.293
- *10. Beisher D.S. Growth Staphilococcus aureus in a null magnetic field enviromeht. NAMI. Pensacola, Florida, 32512, April, 1970.
11. Bertani G. J. Bact., 1951, vol. 62, p.3.
12. Busby D.E. Spase Biomagnetics Spase Life Scienses, 1968, 1, p.2
13. Jacob F. Les bacteries lisogenes at la notion de provirus. Parig, 1952.

Аносова М.Г. и др.

P19-86-378

Кинетика роста и спонтанной фагопродукции лизогенной культуры ϵ -coli K12 / λ / в условиях экранирования геомагнитного поля

Приведены результаты исследования влияния геомагнитного поля /ГМП/ на рост и спонтанную фагопродукцию лизогенной культуры ϵ -coli K12 / λ /. Показано, что в условиях экранирования ГМП рост лизогенных бактерий в экспоненциальной фазе незначительно замедляется, фагопродукция и частота спонтанной индукции профага λ уменьшается. В стационарной фазе наблюдается значительное увеличение количества свободного фага в культуре лизогенных бактерий.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод О.С.Виноградовой

Anosova M.G. et.al.

P19-86-378

The Kinetics of the Growth and Spontaneous Phage Production Lysogenic Bacteria ϵ • coli K12 / λ / Under Geomagnetic Field Weakened

The results on the investigation of the effect of geomagnetic field (GF) on the growth and spontaneous phage production in lysogenic culture ϵ • coli(K12) are presented. It is shown that under screening from GF the growth of ϵ • coli bacteria in exponential phase slows down insufficiently, phage production and frequency of spontaneous induction of prophage λ decreases. In stationary phage a sufficient increase of free phage amount in culture of ϵ • coli is observed.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986

Рукопись поступила в издательский отдел
13 июня 1986 года.