

E. LOKK, V. TOHVER

MÜGARBAKTERITEL RÖNTGENIKIIRTE TOIMEL TEKKIVAST BIOKEEMILISEST DEFITSIITSUSEST

Mitmesuguste kiirguste (UV- ja röntgenikiired, neutronid jm.) ja keemiliste ainete (etüleeniimiin, ipriit jt.) võime mikroorganismidel esile kutsuda pärilikke muutusi oli tuntud ammu. Juba 1925. a. näitasid nõukogude teadlased Nadson ja Filippov, et röntgenikiirte toimel tekivad alamatel seentel uued rassid erinevate morfoloogiliste ja füsioloogiliste omadustega, mis säilivad rea põlvkondade vältel. UV-kiirte ja mitmete keemiliste ainete mutageenne toime tehti kindlaks hiljem, aastail 1931—1932 (Ерохина, 1964).

Bakterimutatsioon avastatakse pärilike (genotüüpiliste) muutuste põhjal, mis võivad haarata mikroorganismide ükskõik millist tunnust. Vastavalt teadmiste laienemisele bakterite struktuurist, füsioloogiast ja biokeemiast, avarduvad võimalused eri tüüpi (auksotroofsus aminohapete, puriinide, pürimidiinide ja vitamiinide suhtes, võime kasutada mitmesuguseid energiaallikaid, resistentsus mitmesuguste antibakteriaalsete ainete või bakteriofaagi suhtes, lüsogeensus jm.) mutantide avastamiseks (Гольдфарб, 1966; Захаров, Квитко, 1967).

Tänapäevai uuritakse laialdaselt mikroorganismide biokeemilisi mutatsioone, mida on suhteliselt kerge avastada ja mis on andnud palju hinnatavaid teoreetilisi ja praktilisi tulemusi. Biokeemilised mutandid on endised nii aminohapete (AH) kui ka kasvufaktorite osas auksotroofideks muutunud prototroofid. See võimaldab biokeemilisi mutante avastada nende võimetuse järgi kasvada minimaalsöötmel (Месробяну, Пэунеску, 1963; Жуков-Вережников, Пехов, 1963; Hayes, 1964; Алиханян, 1967; Рубан и др., 1968).

Esamakordselt saadi auksotroofseid mutante *Neurospora*'l (Beadle, Tatum, 1941, 1945), hiljem on neid indutseeritud peaaegu kõigil mikroorganismide gruppidel väga paljude uurijate poolt, kusjuures kasutati erinevaid mutageene kas eraldi või kombineeritult (Lederberg, Tatum, 1946; Demerec, 1946; Lederberg, 1950; Anderson, 1951; Касаткина, 1959; Алиханян, 1961; Жданов, 1961; Борисова и др., 1962; Озолинь, 1963, 1964, 1965; Yoshihaga jt., 1966; Заринь, 1966; Родынюк, 1967; Гривинь, 1967 ja paljud teised).

Meie uurimustes mügarbakteritest (Тохвер, Локк, 1966, 1968) on kindlaks tehtud suhteliselt laialdane röntgenikiirte toimel tekkiv biokeem-

miline defitsiitsus. Aukstroofia avaldub seejuures nii AH-de ja kasvufaktorite kui ka väga komplekssete tegurite suhtes. Analooilisi andmeid, seni küll vähesel määral, on mügarbakterite kohta avaldatud ka kirjanduses (Rangaswami, Oblisami, 1962; Graham, 1963). Hoopis aga puuduvad andmed, mis täpsustaksid tekkinud defitsiitsust kvalitatiivsest küljest. Seda arvestades seadsime käesolevas töös oma eesmärgiks üksikasjalikumalt uurida röntgenikiirte toimel tekkiva aminohappelise defitsiitsuse olemust.

Metoodika

Katseobjektidena kasutati perek. *Rhizobium* kolme liiki (*R. leguminosarum* 134, *R. meliloti* 276 ja *R. japonicum* 631), millel röntgenikiirtega indutseeriti biokeemilisel defitsiitsete vormide teke. Mutantseid kolooniaid isoleeriti tüve 134 kiiritatud materjalist 68 (vahetult pärast kiiritamist 29 ja edaspidisel kontrollimisel 39), millele lisandus 3 spontaanselt muteerunud kolooniat. Tüve 276 osas olid vastavad arvud 58 (27 ja 31) ja 2 ning tüve 631 osas 67 (34 ja 33) ja 11.

Defitsiitsete vormide saamise metoodika on kirjeldatud meie varasemates artiklites (Тоxвep, Локк, 1966, 1968). Käesolevas uurimuses kasutati eelnenud töödes biokeemiliselt defitsiitsete vormidena isoleeritud kolooniaid (kasvuvõimetus minimaalsöötmel, kasv AH-de ja pärmiekstrakti lisamisel) järgmisel hulgal: *R. leguminosarum*'it 28, *R. meliloti*'t 24 ja *R. japonicum*'i 44. Neid kolooniaid uuriti meetodil, mis on üsna efektiivne suure hulga biokeemiliste mutantide kiireks identifitseerimiseks (Lederberg, 1950; Holliday, 1956; Kaudewitz, Vielmether, Fridrich-Freksa, 1958). Käesoleval juhul uuriti katseobjektide 20 α -aminohappe vajadust eraldi ja summaarselt. Selleks külvati igast uuritavast kolooniast valmistatud suspensiooni pindmiselt 0,05 ml (keskmiselt 1500 eeldatavalt defitsiitset rakku) Petri tassidesse nii minimaalsöötmele kui ka eri AH-dega rikastatud söötmetele. AH-d lisati kas 4- või 5-liikmeliste rühmadena või siis summaarselt, nii et esindatud olid kõik 20 AH-d. AH-de rühmad koostati nii, et iga AH esines kahes erineva koosseisuga rühmas, mis annab võimaluse tuvastada aukstroofiat eri AH-de suhtes ka rühmaviisilise rikastamise korral.

Kasutatud aminohapete rühmitusskeem oli järgmine:

Petri tassid	Petri tassid			
	1	2	3	4
5	lys	arg	met	orn
6	leu	gly	val	nol
7	phe	tyr	try	asa
8	his	thr	glt	pro
9	ala	cys	ser	nov

Kõik AH-d lisati minimaalsöötmele 10 μ g/ml kontsentratsioon, peale tsüsteiini ja treoniini, mille kontsentratsioon oli 20 μ g/ml (vastavalt Lederbergi tsiteeritud töö andmetele).

Minimaalsöötme koostisse kuulus 1000 ml destilleeritud vett, 0,5 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g NaCl, 0,2 g CaCl₂, 1,0 ml mikroelementide segu (M. Fjodorovi järgi), 5,0 g glükoosi, 10,0 ml vitamiinide segu (100 ml lahuse kohta à 10,0 mg, B₁-, B₂-vitamiini ja biotiini, à 5 mg B₅- ja B₆-vitamiini, à 3 mg B₃-vitamiini ja para-aminobensoehapet ja 1 mg B₁₂-vitamiini) ning 15 g leelisvaba, hästi pestud agar-agarit (Тоxвep, Локк, 1966, 1968).

Inkubatsioon toimus 27,5° C juures 7—11 ööpäeva. Uleskasvanud kolooniate hulka loendati, kusjuures eeldati, nagu see tavaline, et iga koloonia sai alguse ühest rakust. Selle järgi arvutati kasvuvõimeliste rakkude protsent külvatud rakkude üldhulgast, mis tehti kindlaks suspensiooni tiheduse määramisega otsese loenduse teel.

Töö teostati ENSV TA Eksperimentaalbioloogia Instituudis aastail 1967—1968.

Katsetulemused ja arutlus

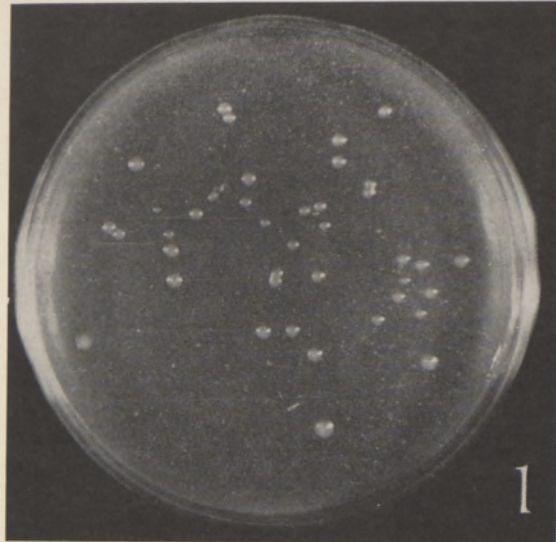
Katsetulemused on esitatud tabelis. Eeskätt nähtub neist, et teatav osa defitsiitse raku järglasi on taastunud prototroofidena, andes kasvu kontrollisöötmel (*R. leguminosarum*'i ja *R. meliloti* puhul 1,24—2,61, *R. japonicum*'i puhul aga koguni 24,9%). Emarakkude kiiritusjärgsel isoleerimisel 1967. aasta veebruaris-märtsis olid need defitsiitsed (ei kasvanud minimaalsöötmel). Taolist indutseeritud omaduste reversiooni märkisime juba oma eespool tsiteeritud uurimustes. Analoogilisi andmeid suhteliselt suurearvulisest reversioonist mutageenidega saadud variantidel on esitanud ka teised autorid (Заринь, 1966; Стенько, 1968 jt.).

Röntgenikiirtega esile kutsutud aminohappelise auktotroofia osatähtsus üldises biokeemilises defitsiitsuses

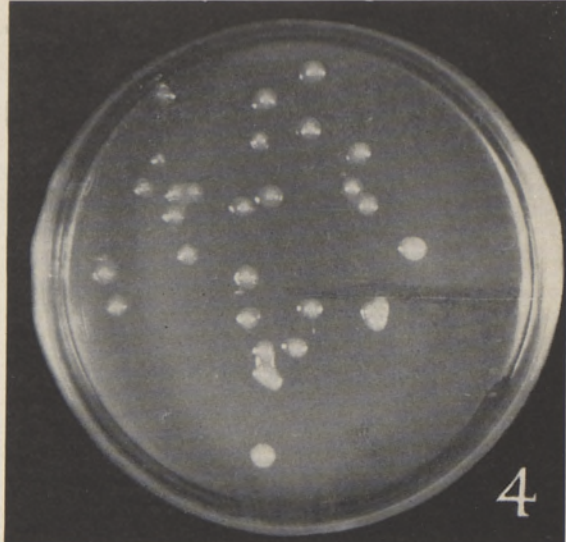
Liik ja tüvi	Paljunemisvõimeliste rakkude % inokulumi rakkude üldarvust		
	<i>R. leguminosarum</i> 134	<i>R. meliloti</i> 276	<i>R. japonicum</i> 631
Minimaalsöötmele lisatud aminohapete rühmad			
Kontroll (minimaalsööde)	1,24 ± 0,27	2,61 ± 0,20	24,9 ± 0,63
1	3,22 ± 0,68	14,2 ± 1,54	64,1 ± 2,44
2	2,66 ± 0,68	11,8 ± 1,62	60,7 ± 0,81
3	2,42 ± 0,47	7,87 ± 1,10	50,1 ± 2,04
4	3,37 ± 0,87	12,5 ± 1,18	61,5 ± 1,97
5	3,51 ± 0,83	14,9 ± 1,50	60,9 ± 1,87
6	3,02 ± 0,67	14,4 ± 1,47	58,9 ± 1,92
7	3,52 ± 0,94	13,4 ± 1,58	55,8 ± 2,00
8	3,12 ± 0,63	8,25 ± 0,91	51,1 ± 1,86
9	4,58 ± 1,07	23,3 ± 1,59	69,8 ± 2,24
Kõik uuritud aminohapped	6,94 ± 0,94	31,2 ± 1,66	80,2 ± 1,40

Edasi selgub tabelist, et mõned AH-de rühmad ei suuda minimaalsöötmele lisatuna tagada kasvuvõimalusi kõigile uuritud rakkudele. Eriti tagasihoidlik on efekt *R. leguminosarum*'i juures, kus rühma 1, 2, 3, 6 ja 8 lisamisel on erinevus minimaalsöötme tulemustest diferentsi vea piirides. *R. meliloti* osas on AH-de eri rühmade lisamisest saadav kasvuvõime tõus oluline, eriti rühma 9 juures, s. o. ala, cys, ser ja nov lisamisel, kuid siingi omandab söötme rikastamisel kasvuvõime vaid 7—23% uuritud rakkudest. Hoopis suurema kasvuaktiivsuse tagavad kasutatud rikastusfaktorid *R. japonicum*'il (kasvuvõime tõus 50—69%), kuid samal ajal

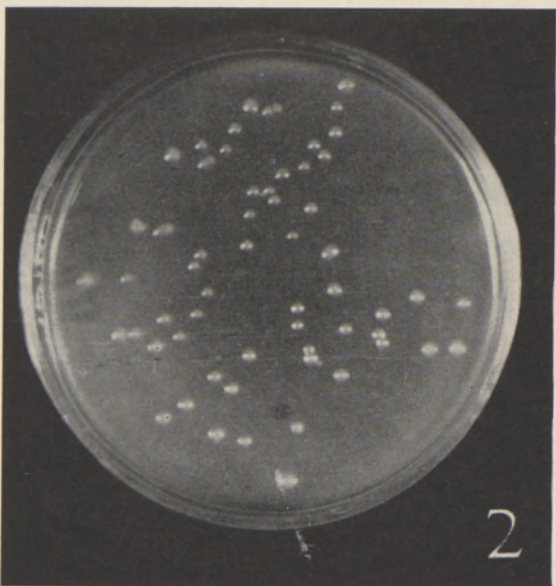
Biokeemiliselt defitsiitsete mügarbakterivormide kolooniate kasv Petri tassides erinevatel söötmevariantidel (vähendatud 1,4X): A — tüve 134 defitsiitne vorm, B — tüve 276 defitsiitne vorm; 1 ja 4 — minimaalsöötmel (kontroll), 2 ja 5 — aminohapete rühmal nr. 3, 3 ja 6 — kõiki uuritud aminohappeid sisaldaval söötmel.



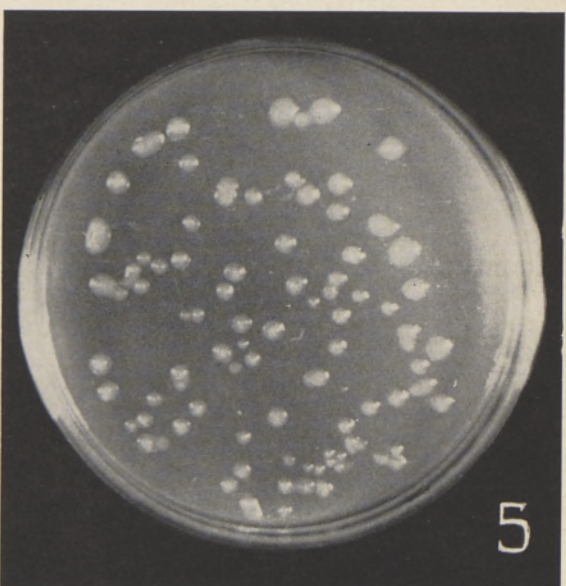
1



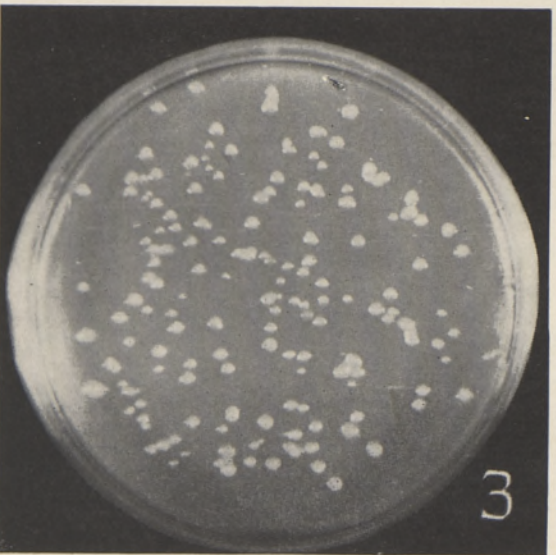
4



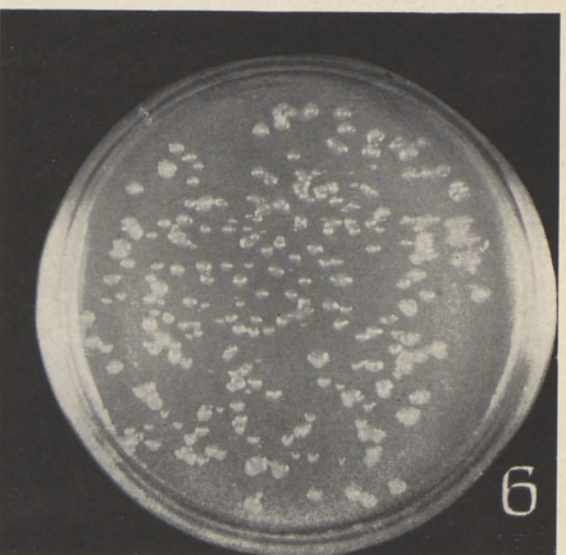
2



5



3



6

A

B

on üsna kõrge ka reversioonisagedus, s. o. minimaalsöötmel kasvanud rakkude osatähtsus. See vähendab suhtelise efekti väärtuse 2—3-kordseks, *R. meliloti*'l on see 3—9-kordne.

Ka 20 AH korraga lisamine ei soodusta kõikide rakkude kasvu. Sellisel rikastatud söötmes annab *R. leguminosarum* vaevalt 7% kasvavaid rakke (eri rühmade toimega võrreldes on efekt +2,36—4,52%). *R. meliloti*'l ulatub kasvuprotsent 31-ni (efekt eri rühmade toimega võrreldes +7,94—23,4%). Üksnes *R. japonicum*'il tõuseb niisugusel söötmel kasvavate rakkude hulk 80%-ni, kusjuures eri rühmadega võrreldes saadakse lisaeft 10,4—30,1%.

Nagu näeme, on röntgenikiirtega indutseeritud aminohappelise auktroofia osatähtsus mügarbakterite eri liikidel väga erinev. Seejuures võib *R. leguminosarum*'il vaid 1,18—5,70% biokeemilisest defitsiitsusest seostada AH-dega, *R. meliloti*'l on see protsent 5,26—28,6 ja *R. japonicum*'il 25,2—55,3 (tabeli vastavatest minimaalsetest ja maksimaalsetest näitudest on lahutatud kontrollkatse tulemused). Väärrib tähelepanu nõudluste kompleksus: alles 20 AH summaarne lisamine annab kõigil uuritud liikidel suhtelise maksimumefekti. Seetõttu ei ole võimalik nõutava täpsusega hinnata ka eri AH-de osatähtsust indutseeritud defitsiitsuses. Esilekündivamaks võib pidadaalaniinilise auktroofia esinemist kõigil uuritud liikidel (efektiivseimate rühmade 9 ja 1 ristumispunkt). See on mõistetav, kui arvestadaalaniini funktsioone aminorühma salvestajana ja doonorina transamiinimistel. Järelikult pidurdab defitsiitsusalaniini suhtes peale tema enda teistegi AH-de biosünteesi.

Näeme, et aminohappeline auktroofia on ainult üks võimalikke röntgenikiirte toimel tekkivaid defitsiitsusvorme, ja vaid *R. japonicum*'i juures võib seda põhiliselt kompleksena avalduvat auktroofiat pidada defitsiitsuse peamiseks vormiks.

Järeldused

1. Röntgenikiirte toimel tekkinud biokeemiliselt defitsiitsete mügarbakterirakkude seas esines aminohappelist auktroofiat *R. leguminosarum*'il sagedusega 1,18—5,70, *R. meliloti*'l 5,26—28,6 ja *R. japonicum*'il 25,2—55,3%.

2. Auktroofia teke üksikute AH-de suhtes erines ühe liigi piirides vähe (suhteliselt olulisim oli seealaniini puhul). Tugevaim kasvuefekt saadi siis, kui minimaalsöödet rikastati kõigi 20 uuritud AH-ga korraga.

3. Esitatud andmetest ilmneb uuritud mügarbakteriliikide defitsiitsete variantide nõuete kompleksus, mis on kooskõlas autorite varasemate uurimuste andmetega.

KIRJANDUS

- Anderson E., 1951. The effect of O₂ on mutation induction by X-rays. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37 : 340—349.
- Beadle G., Tatum E., 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 27 : 499.
- Beadle G., Tatum E., 1945. *Neurospora*. II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. Am. J. Bot. 32 (10) : 678—686.
- Demerec M., 1946. Induced mutations and possible mechanisms of transmission of heredity in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 32 (1) : 36—46.
- Graham P. H., 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 30 (2) : 245—248.

- Hayes W., 1964. The genetics of bacteria and their viruses. Oxford.
- Holliday R., 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. *Nature* 178 (4540) : 987.
- Kaudewitz F., Vielmether W., Fridrich-Frekxa H., 1958. Mutagene Wirkung des Zerfalles von radioaktivem Phosphor nach Einbau in Zellen von *Escherichia coli*. *Z. Naturforschung* 136 (12) : 793—802.
- Lederberg J., 1950. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. *Methods in Med. Research* (3) : 5—22.
- Lederberg J., Tatum E., 1946. Detection of biochemical mutants of microorganisms. *J. Biol. Chem.* 165 (1) : 381—382.
- Rangaswami G., Oblisami G., 1962. Studies on some legume root nodule bacteria. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 10 (3) : 175—185.
- Yoshihaga F., Konishi S., Okumura S., Katsuya N., 1966. Studies on the fermentative production of L-proline. I. Production of L-proline by an isoleucine auxotrophic mutant of *Brevibacterium flavum* 2247. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 12 (3) : 219.
- Алиханян С. И., 1961. Применение физических и химических факторов в селекции микроорганизмов. *Тр. Ин-та микробиол. АН СССР* 10 : 46.
- Алиханян С. И., 1967. Современная генетика. М.
- Борисова Л. Н., Колюхова М. В., Ивина Н. С., Оленева З. Г., 1962. Изменчивость прототрофов *Actinomyces aureofaciens* под действием мутагенных факторов. *Микробиология* 31 (5) : 850—852.
- Гольдфарб Д. М., 1966. Введение в генетику бактерий. М.
- Гривинь П. П., 1967. Биохимические и физиологические свойства мутантов *Brevibacterium* 22, синтезирующих лизин и аланин. Автореф. дисс. канд. биол. н. Рига.
- Ерохина Л. И., 1964. Закономерности индуцированной изменчивости у полезных форм микроорганизмов. В кн.: *Генетика и селекция микроорганизмов*. М. : 246—264.
- Жданов В. Г., 1961. Комбинированное воздействие химических и физических факторов в селекции продуцента эритромицина. *Тр. Ин-та микробиол. АН СССР* 10 : 164.
- Жуков-Вережников Н. Н., Пехов А. П., 1963. Генетика бактерий. М.
- Заринь Д. Г., 1966. Мутанты микроорганизмов — продуценты аминокислот и их культивирование. Автореф. дисс. канд. биол. н. Рига.
- Захаров И. А., Квитко К. В., 1967. Генетика микроорганизмов. Изд-во Ленинградского университета. Л.
- Касаткина И. Д., 1959. Биохимические мутанты *Asp. niger*, полученные после облучения УФ-лучами. *Микробиология* 28 (6) : 807—813.
- Месробяну Л., Пэунеску Э., 1963. Физиология бактерий. Бухарест.
- Озолинь Р. К., 1963. Образование аспарагиновой кислоты из фумарата в культурах *Pseudomonas* и *Escherichia coli*. *Микробиология* 32 (5) : 792—796.
- Озолинь Р. К., 1964. Образование аланина микроорганизмами рода *Mycobacterium*. Микробиологические процессы и производство. Изд-во АН Латв. ССР. Рига : 35.
- Озолинь Р. К., 1965. Синтез аланина и аспарагиновой кислоты микроорганизмами. Автореф. дисс. канд. биол. н. М.
- Родынюк И. С., 1967. Селекция аусотрофных мутантов у некоторых бактерий и использование их в качестве индикаторных форм для определения аминокислот и витаминов. Автореф. дисс. канд. биол. н. М.
- Рубан Е. Л., Вербина Н. М., Бутенко С. А., Озолинь Р. К., Заринь Д. Г., 1968. Биосинтез аминокислот микроорганизмами. М.
- Стенько А. С., 1968. Инактивирующее и мутагенное действие этиленмина и УФ-излучения на трансформирующую ДНК *Vac. subtilis*. Автореф. дисс. канд. биол. н. Киев.
- Тохвер В., Локк Э., 1966. К вопросу о прототрофности и радиорезистентности некоторых видов клубеньковых бактерий. *Изв. АН ЭССР, сер. биол.* XV (3) : 347—356.
- Тохвер В., Локк Э., 1968. О появлении дефицитности к аминокислотам у клубеньковых бактерий под влиянием рентгеновских лучей. *Изв. АН ЭССР, сер. биол.* XVII (4) : 374—381.

Э. ЛОКК, В. ТОХВЕР

О ХАРАКТЕРЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ ДЕФИЦИТНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ РЕНТГЕНОВСКИМИ ЛУЧАМИ, У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Резюме

Изучался характер ауксотрофности по отношению к 20 аминокислотам биохимически дефицитных форм, индуцированных у *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti* и *R. japonicum* рентгеновскими лучами. Клетки, принадлежащие к дефицитным колониям, не способны были расти на минимальной среде, но развивались при обогащении ее комплексом из 20 аминокислот и дрожжевым экстрактом.

Результаты опытов показывают, что среди биохимически дефицитных клеток ауксотрофия по отношению к аминокислотам встречалась: с частотой 1,18—5,70% у *R. leguminosarum*, 5,26—28,6% у *R. meliloti* и 25,2—55,3% у *R. japonicum*. Как правило, вероятность возникновения ауксотрофии по отношению к отдельным аминокислотам сравнительно мало отличалась в границах одного вида. Поэтому оказалось, что наиболее эффективно способствует росту комплексное обогащение среды одновременно всеми изученными 20 аминокислотами.

Опыты показывают, что под влиянием рентгеновских лучей возникает значительное число дефицитных клеток клубеньковых бактерий, для развития которых необходимо обогащение среды комплексом аминокислот.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР
Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
17/X 1968

E. LOKK, V. TOHVER

ON THE CHARACTER OF BIOCHEMICAL DEFICIENCY INDUCED BY X-RAY IRRADIATION IN ROOT NODULE BACTERIA

Summary

Biochemically deficient forms induced in *Rhizobium leguminosarum*, 134, *R. meliloti*, 276, and *R. japonicum*, 631, by the use of X-ray irradiation were investigated relative to amino acid auxotrophy. The cells belonging to the colonies under investigation did not grow on minimum medium but showed development if a complex mixture of 20 amino acids or yeast extract was added.

Data presented in this paper show that among deficient cells amino acid auxotrophy was found with the frequency of 1.18—5.70 per cent in *R. leguminosarum*, 5.26—28.6 per cent in *R. meliloti*, and 25.2—55.3 per cent in *R. japonicum*. As a rule, the probability of arising deficiency relative to different amino acids lies approximately at the same level for a given species of the root nodule bacteria. Consequently, the most effective results were obtained if all the 20 amino acids under investigation were added simultaneously.

The experiments show that under the influence of X-ray irradiation a considerable number of auxotrophic cells with complex deficiency arise in root nodule bacteria.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology
Tartu State University

Received
Oct. 17, 1968