

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVII, 11

SECTIO C

1972

Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS  
Zakład Mikrobiologii

Irena ŻELAZNA-KOWALSKA

**Indukcja lizogenego szczepu *Rhizobium meliloti* przez mitomycynę C**

Индукция мезогенного штамма *Rhizobium meliloti* митомицином C

Induction of Lysogenic Strain of *Rhizobium meliloti* by Mitomycin C

Jedne z pierwszych prac nad mechanizmem działania mitomycyny C (MC) wskazywały na hamowanie replikacji DNA przez ten antybiotyk (6). Te spostrzeżenia były potwierdzone przez Szybalskiego i Iyera (10). Autorzy tłumaczyli ten fakt powstawaniem krzyżowych wiązań w DNA, wywołanych zredukowaną formą MC, co w konsekwencji było powodem śmierci bakterii. W następnych latach stwierdzono, że MC działa w jednakowym stopniu alkilująco na DNA, wszystkie rodzaje RNA i rybosomy (12).

Stwierdzono, że stan lizogenii u niektórych bakterii warunkuje różnice we wrażliwości na pewne antybiotyki (2). W związku z tym zastosowano MC do indukcji fagów łagodnych. Okazało się, że szczep lizogeny *E. coli* K12 ( $\lambda$ ) był o 50% wrażliwszy na MC niż szczep wskaźnikowy Nielizogeny K12. Stwierdzono również indukcję faga  $\lambda$ . Inne szczepy *E. coli*, jako szczep lizogeny C-16 (P22) i szczep wskaźnikowy dla P-22 były w jednakowym stopniu wrażliwe na MC. Mitomycyna C nie indukowała także faga P-22 (2).

Stosunkowo wcześniej zastosowano MC do indukcji fagów u *Rhizobium*. Takahashi i Quadling indukowali defektywnego faga u *R. trifolii*.

Kierując się cytowanymi spostrzeżeniami, użyto mitomycyny C jako czynnika powodującego uwalnianie profaga z chromosomu *R. meliloti* i przechodzenie go w stan wegetatywny.

## MATERIAŁ I METODY

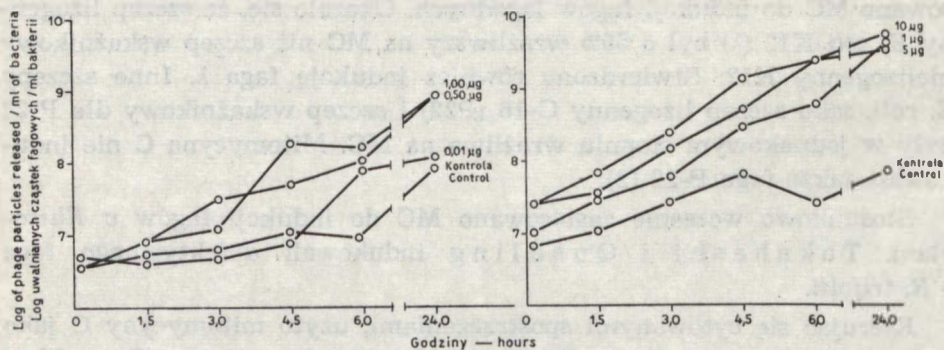
Szczep. Badania przeprowadzono na szczepie lizogennym *R. meliloti* 41 (16—3). Szczepem wskaźnikowym, wrażliwym na faga 16—3, był szczep *R. meliloti* 41.

Podłoża: stosowano podłoża płynne lub stałe RP\* z 1,2% lub 0,6% agarem o następującym składzie: NaCl—1,0 g, NH<sub>4</sub>Cl—3,0 g, glukoza—2,0 g, wyciąg drożdżowy Difco—1,0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—0,7 g, 125 ml 0,2 M Tris buforu, 200 ml 0,1 N HCl i uzupełniono do 1 l H<sub>2</sub>O destylowaną, pH pożywki 7,6. Przed wsiewem bakterii dodawano 1 ml 10<sup>-3</sup> M MgSO<sub>4</sub> na 100 ml pożywki. Stosowano też pożywkę MRP\*, różniącą się od pożywki RP\* brakiem wyciągu drożdżowego.

Indukcja faga łagodnego przez mitomycynę C: 12-godzinna hodowlę szczepu *R. meliloti* 41 (16—3) inkubowano w pożywce RP\* z wytrząsaniem, odwirowano i rozcieńczono w tej samej objętości świeżej pożywki RP\*. Zawiesinę bakterii rozdzielono na równe objętości do różnych kolb. Jedna z tych kolb stanowiła kontrolę liczby bakterii i fagów uwalnianych spontanicznie. Do pozostałych kolb dodawano mitomycynę C (Nutritional Biochemical Corporations) w stężeniach 0,01, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 µg/ml. Bakterie hodowano z wytrząsaniem w temp. 28°C w ciemności. W celu zbadania liczby bakterii i fagów obecnych w hodowli pobierano próby w czasie 0 i po 10 min. oraz po 1,5, 3,0, 4,5, 6,0 i 24 godz. od dodania MC. Liczbę fagów określano metodą Adamsa.

## WYNIKI

W próbach kontrolnych miano fagów uwalnianych spontanicznie wynosiło 6 · 10<sup>7</sup> cząstek/ml, po 24 godz. inkubacji zależnie od doświadczenia (ryc. 1). Dawka MC 0,01 µg/ml nieznacznie podnosiła liczbę fagów w stosunku do kontroli, a 0,5 µg/ml mitomycyny C powodowało wzrost liczby fagów o 1 log. Antybiotyk w stężeniu 1 µg/ml wyzwał o 1 do 1,5 log więcej fagów niż w kontroli bez antybiotyku. Przy 5,0 µg/ml obserwowano niewiele mniejszą liczbę fagów (4 · 10<sup>9</sup>/ml) po 6 godz. działania MC. Natomiast dodanie 10 µg MC/ml powodowało już po 3 godz. działania wzrost miana fagów o 2 log w stosunku do kontroli.

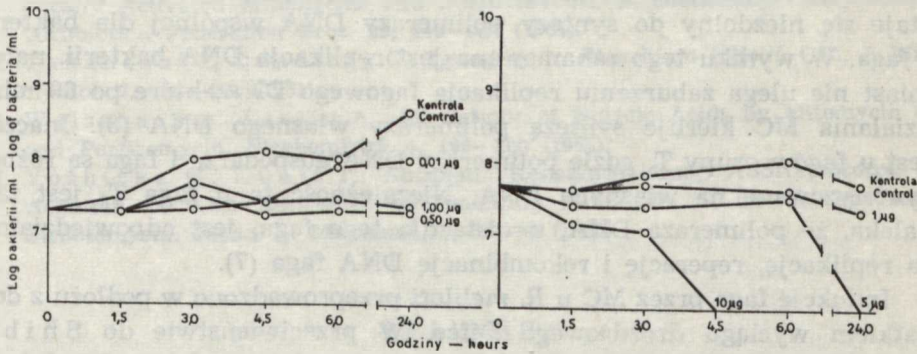


Ryc. 1. Indukcja fagów przez różne stężenia MC w lizogennym szczepie 41 (16—3)  
Induction of phages by different MC concentrations in the lysogenic strain 41 (16—3)



Przetrzymanie hodowli z 10  $\mu\text{g/ml}$  MC przez czas dłuższy niż 3 godz. powoduje wzrost liczby fagów prawie o 2 log w porównaniu do kontroli.

Obniżenie liczby bakterii obserwowano już przy stężeniu 0,01  $\mu\text{g/ml}$  (ryc. 2). Dawki 0,5 i 1,0  $\mu\text{g/ml}$  powodowały dalszy spadek liczby bakterii. Przy stężeniu 5  $\mu\text{g/ml}$  (ryc. 1) nie spotykano żywych bakterii w hodowli po 24 godz. Podobny skutek obserwowano przy 10  $\mu\text{g/ml}$  MC po czasie dłuższym niż 3 godz. działania.



Ryc. 2. Działanie różnych dawek MC na przeżywalność bakterii  
Effect of different MC doses on the survival of bacteria

#### DYSKUSJA

Narastanie skutków działania indukującego mitomycyny C w zależności od dawki obserwowano u *E. coli* B<sub>1</sub>, poczynając od dawki 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (12). Taką dawką u *Rhizobium meliloti* było stężenie 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , przy którym zaznaczał się nieznaczny spadek liczby żywych komórek (ryc. 2). Dawka 5  $\mu\text{g/ml}$ , podobnie jak u *E. coli* (12), okazała się zabójcza. Po dłuższym czasie niż 6 godz. obserwowano lizę bakterii w hodowli. Dwukrotne zwiększenie dawki antybiotyku dawało analogiczny skutek, ale w czasie krótszym.

Działanie MC, choć nie jest specyficzne dla DNA, bo RNA i rybosomy są na nią wrażliwe, to jednak w pierwszej kolejności uszkadza DNA (8). Z doświadczeń Weisbach i Lissio, Suzuki i Kilgore wynikało, że komórki *E. coli* traktowane dawkami niższymi niż 0,1  $\mu\text{g/ml}$  na skutek zahamowania podziałów wytwarzały wydłużone formy ze zmianami w obrazie ziarn jądrowych w zależności od dawki MC. Stwierdzono również blokadę w syntezie białek u *Pseudomonas aeruginosa* przy 20–50  $\mu\text{g/ml}$  MC (4). Ponieważ efekt końcowy u *R. meliloti* był analogiczny, mianowicie następowała liza komórek, można więc wnioskować, że zmiany poprzedzające śmierć komórki były podobne.

Mitomycyna C, działając bezpośrednio na DNA, okazała się skutecznym czynnikiem indukującym bakterie lizogenne. W naszych badaniach uzyskano wzrost liczby cząstek fagów o ok. 2 log. Mechanizm indukcji bakteriofaga nie został dotychczas wyjaśniony. Przypuszczano, że w czasie zaburzenia syntezy DNA gospodarza przez induktor wytwarza się produkt inaktywujący represor i profag uwalnia się spod kontroli represora (1). Inni badacze uważali, że indukcja lizogenna polega na oderwaniu profaga od chromosomu wskutek zmian w DNA gospodarza, wywołanych induktorem (5,3). DNA *E. coli* K12 ( $\lambda$ ) uszkodzony przez MC staje się niezdolny do syntezy polimerazy DNA wspólnej dla bakterii i faga. W wyniku tego zahamowana jest replikacja DNA bakterii, natomiast nie ulega zaburzeniu replikacja fagowego DNA, które po 60 min. działania MC kieruje syntezą polimerazy własnego DNA (3). Inaczej jest u fagów grupy T, gdzie polimerazy DNA gospodarza i faga są różne, syntetyzowane na własnych DNA. Niezależność ta u faga T<sub>4</sub> jest tak daleka, że polimeraza DNA, swoista dla tego faga, jest odpowiedzialna za replikację, reperację i rekombinację DNA faga (7).

Indukcję faga przez MC u *R. meliloti* przeprowadzono w podłożu z dodatkiem wyciągu drożdżowego Difco. W przeciwieństwie do Shibuy i współprac. (6) brak tego składnika nie sprzyjał zwiększonej indukcji fagów u *R. meliloti*. Opracowana metoda może znaleźć zastosowanie do otrzymywania fagów z hodowli o dużych objętościach, często potrzebnych do badań genetycznych i biochemicznych.

Pracę wykonano w Instytucie Genetycznym Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie w r. 1966, podczas pobytu na stypendium naukowym Polskiego Ministerstwa Szkolnictwa Wyższego.

Pragnę wyrazić wdzięczność Prof. Dr Barna Györffyemu, ówczesnemu dyrektorowi Instytutu Genetycznego w Budapeszcie, obecnie nie żyjącemu, za wyjątkową życzliwość okazywaną podczas mojego pobytu w Instytucie. Serdecznie dziękuję również Dr Tiborowi Sikowi, w którego pracowni przeprowadzałam badania.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Kozak W.: Niektóre aspekty lizogenii i indukcji lizogennej. Postępy Mikrobiol. 9, 271—295 (1970).
2. Muschel L. H., Schmoker K.: Activity of Mitomycin C, other Antibiotics, and Serum against Lysogenic Bacteria. J. Bacteriol. 92, 967—971 (1966).
3. Pricer W. E., Weissbach A.: The Effect of Lysogenic Induction with Mitomycin C on the Deoxyribonucleic Acid Polymerase of *Escherichia coli* K12. J. Biol. Chemistry 239, 2607—2612 (1964).
4. Sakaki Y., Kagayama M., Egami F.: Effect of Mitomycin C and other Antibiotics on the Inducible Synthesis of Protocatechate 3,4-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. Z. Alg. Mikrobiol. 9, 134—152 (1969).
5. Seno T., Melechen N. E.: Macromolecular Synthesis in the Initiation of Bacteriophage P1 Induction. J. Mol. Biol. 9, 340—351 (1964).



6. Shiba S., Terawaki A., Taguchi T., Kawamata J.: Studies on the Effect of Mitomycin C on Nucleic Acid Metabolism in *Escherichia coli* Strain B. *Biken's Journal* 1, 179—193 (1958).
7. Speyer J. F., Rosenberg D.: The Function of T<sub>4</sub> DNA Polymerase. *Cold Spring Harb. Symp. Quantitative Biology* 33, 345—350 (1968).
8. Suzuki H., Kilgore W. W.: Effects of Mitomycin C on Macromolecular Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93, 675—682 (1966).
9. Suzuki H., Pangborn J., Kilgore W. W.: Filamentous Cells of *Escherichia coli* Formed in the Presence of Mitomycin. *J. Bacteriol.* 93, 683—688 (1967).
10. Szybalski W., Iyer V. N.: Crosslinking of DNA by Enzymatically or Chemically Activated Mitomycins and Porfiromycins, Bifunctionally "Alkylating" Antibiotics. *Federation Proc.* 23, 946—957 (1964).
11. Takahashi I., Quadling C.: Lysogeny in *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 7, 455—465 (1961).
12. Weissbach A., Lissio A.: Alkylations of Nucleic Acids by Mitomycin C and Porfiromycin. *Biochemistry* 4, 196—200 (1965).
13. Yoshioka M., Kunii T.: Antibiotic Resistance Group A *Streptococci*. I. Acquired *in vitro* Resistance to Penicillin, Mitomycin C, Tetracycline and Streptomycin. *Japan. J. Microbiol.*, 9, 87—99 (1965).

## РЕЗЮМЕ

Исследовали индукцию митомицина С на умеренный фаг 16—3 в лизогенном штамме 41 (16—3) *Rhizobium meliloti*. На бактерии *R. meliloti* в логарифмической фазе роста действовали 0,01—10 мкг/мл раствором митомицина С (МС).

Дозы МС от 5 до 15 мкг/мл увеличивали количество фаговых частиц, которые способны к образованию „бляшек“, от 1,5 до 2 логарифмов. Продолжительное действие МС (доза 5—10 мкг/мл) вызывало лизис бактерий.

## SUMMARY

Inducing action of mitomycin C on a temperate phage 16—3 in the lysogenic strain 41 (16—3) of *Rhizobium meliloti* was tested. *R. meliloti* culture in log phase of growth was treated with mitomycin C in concentrations ranging from 0.01 to 10 µg/ml. Mitomycin C doses from 5 to 10 µg/ml caused 1.5 to 2 log increase in the number of plaques as compared to a spontaneous release of the phage in non-treated control culture. Lower doses of the antibiotic were less effective in induction. Lysis of cells with a simultaneous release of the multiplied phage took place after 6 hrs at 5 µg/ml and after 3 hrs at 10 µg/ml concentration of mitomycin.

W. J. ... (mirrored bleed-through text from the reverse side of the page)

SUMMARY

... (mirrored bleed-through text from the reverse side of the page)