

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:  
<https://www.researchgate.net/publication/237048963>

# Macromolecular Synthesis and E.coli Cells Division in Lag-phase During Diauxie.

ARTICLE *in* NAUCHNYE DOKLADY VYSSHEĬ SHKOLY. BIOLOGICHESKIE NAUKI · JANUARY 1986

---

READS

5

3 AUTHORS, INCLUDING:



Sergey Kuzmin

20 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

SEE PROFILE

## СИНТЕЗ МАКРОМОЛЕКУЛ И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК У *ESCHERICHIA COLI* В ЛАГ-ФАЗЕ ПРИ ДИАУКСИИ

*С. М. Кузьмин, Е. В. Ожиганова, М. П. Дульдьер*

Исследовали импульсное включение меченых маннита, глицерина, тимидина, уридина и гидролизата белка при росте клеток *Escherichia coli* на смеси маннита и глицерина. Включение углеводов и предшественников резко изменяется перед и после лаг-периода, что обусловлено, по-видимому, частичной синхронизацией популяции. Обнаружено три деления клеток: перед лаг-периодом (определяемым по кривой оптической плотности), в конце него и после его окончания. Деление клеток сопровождается снятием катаболитной репрессии с утилизации глицерина, возрастанием скоростей синтеза белка, РНК и ДНК. Скорости синтеза биополимеров резко уменьшаются в начале лаг-периода, но при этом синтез ДНК продолжается на достаточно высоком уровне.

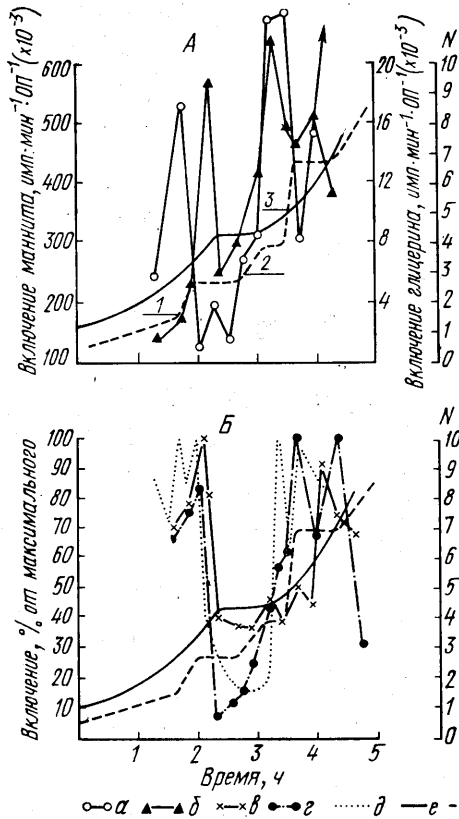
The pulse incorporation of radiolabelled mannitol, glycerol, thymidine, uridine and protein hydrolysate has been studied during the *Escherichia coli* growth. The incorporation of carbohydrates and predecessors is sharply changed before and after lag-phase, that is due evidently to the partial synchronization of cell population. Three cell divisions have been found: before lag-phase (determined by the curve of optical density), at the end of it and after it termination. Cell division is accompanied by removal of catabolic repression from glycerol utilization, by increase of protein, RNA and DNA synthesis rates. The rates of biopolymer synthesis decrease sharply at the beginning of lag-phase, but DNA synthesis is going on at a rather high level.

Исследование лаг-фазы в развитии популяции клеток имеет очевидное теоретическое и практическое значение, так как она часто занимает значительную долю времени развития культуры. Лаг-фаза наблюдается обычно при изменении условий культивирования, замене питательной среды. Общепринято [2], что лаг-фаза — это время адаптации популяции к новым условиям соответствующей перестройки метаболизма. Особым случаем является лаг-фаза при диауксии, т. е. росте клеток на двух источниках углерода и энергии. При этом клетки из двух источников утилизируют только один, а после его исчерпания переходят (обычно с лаг-фазой) на усвоение альтернативного. Лаг-фаза при диауксии по сравнению с лаг-фазой при смене среды обладает, на наш взгляд, как модель адаптации тем преимуществом, что условия ее возникновения более определены, поскольку они являются результатом внутреннего развития популяции, а не внешнего воздействия, структура которого (например, ионный состав среды, наличие — отсутствие продуктов распада, вторичных метаболитов, случайных примесей) обычно не поддается полному контролю. Для описания процесса адаптации клетки существенную роль играет характеристика процессов синтеза ДНК, РНК и белка как звеньев реализации генетической информации.

В связи со сказанным представляло интерес исследовать взаимосвязь интенсивности утилизации альтернативных источников углерода (маннита, глицерина) и активности биосинтеза ДНК, РНК и белка в лаг-фазе при диауксии. Сочетание источников углерода было выбрано нами по продолжительности лаг-периода (40 мин) [1], достаточной для подробного исследования кинетики.

Культивирование клеток *Escherichia coli*, введение меченых соединений осуществляли по методам, описанным ранее [1]. Время импульсной метки составляло 60 с. Включение тимидина, уридина и гидролизата белка для удобства сопоставления оценивали в относительных единицах (в % от максимума каждого графика). Подсчет клеток проводили в камере Горяева при фазово-контрастном микроскопировании. Препарат готовили, добавляя к 0,5 мл исследуемой культуры каплю формалина и 0,5–2,5 мл раствора 0,1 %-ного альбумина, содержащего 0,1 % тритона X-100 [3].

Изменения включения меченых маннита, глицерина и предшественников РНК, ДНК и белка при росте *E. coli* В на смеси маннита и глицерина иллюстрирует рисунок. Видно, что рост культуры характеризуется увеличением оптической плотности и концентрации клеток. Кривая оптической плотности имеет характерный для диауксии двухфазный характер [2]. В начале роста в качестве источника углерода клетки используют маннит, после его исчерпания переходят с лаг-периодом на использование глицерина [1]. Кривая концентрации клеток сложнее. На ней обнаруживаются по крайней мере три частично синхронных деления (рис., А, 1, 2, 3). Первое деление начинается примерно за 30 мин до лаг-периода (имеется в виду лаг-период на кривой оптической плотности), второе — в конце лаг-периода, третье деление, самое синхронное (делится около 80 % клеток в течение 5–10 мин), — примерно через 15 мин после окончания лаг-периода. Из сопоставления кривых очевидно, что при диауксии оптическая плотность культуры не соответствует концентрации клеток. Наблюдаемое явление автосинхронизации клеточной популяции не является неожиданным. Первое синхронное деление, вероятно, является следствием начинающегося голодания по источнику углерода из-за исчерпания маннита, а голодание клеток — стандартный экспериментальный прием для их синхронизации. Известна также частичная синхронизация в лаг-фазе при переносе на новую среду [2].



Включение в кислотонерастворимые продукты источников углерода (А) и предшественников РНК, ДНК и белка (Б) при диауксии *Escherichia coli* В на смеси маннита (0,007 %) и глицерина (0,062 %):

а —  $^{14}\text{C}$  глицерин, б —  $^{14}\text{C}$  маннит, в —  $^3\text{H}$  тимидин, г —  $^3\text{H}$  уридин, д —  $^{14}\text{C}$ -гидролизат белка, е, ж — соответственно оптическая плотность суспензии и число клеток нанесены в произвольных единицах — ордината (N); 1, 2, 3 — порядковые номера клеточных синхронных делений. Инкубация с меткой 60 с

Все остальные представляемые результаты удобно рассмотреть в хронологической последовательности в сопоставлении с кривой числа клеток. Наиболее интересным обстоятельством, сопутствующим, по-видимому, первому делению, на наш взгляд, является временное снятие репрессии с утилизации глицерина (см. рис., А), которая восстанавливается после окончания деления. Первое деление, по-видимому, сопровождается также увеличением скорости синтеза белка, РНК и ДНК. После него клетки примерно еще 15 мин наращивают свою массу (кривая е), используя остатки маннита (кривая б), затем наступает лаг-период. В этот момент скорости метаболических процессов — утилизации углеводов, синтеза РНК и белка — резко уменьшаются. Уровень синтеза ДНК резко снижается, однако остается в лаг-периоде достаточно высоким по сравнению с уровнем синтеза РНК и белка. Депрессия метаболизма в начале лаг-периода, вероятно, обусловлена возникающим дефицитом свободной энергии. Согласно имеющимся данным [7], к этому моменту так называемый «аденилатный энергетический заряд» клеток достигает минимума, а общий фонд нуклеотидов может исчерпаться на 50 %. Показательным для характеристики депрессии является включение меченого маннита: оно резко снижается, хотя система утилизации маннита предсуществует и полностью индуцирована. Такое изменение нельзя, видимо, объяснить распадом ферментной системы усвоения маннита, поскольку его включение резко возрастает при выходе популяции из лаг-фазы. Иными словами, система утилизации продолжает существовать достаточно долго после исчерпания маннита.

Продолжающийся с пониженной скоростью синтез ДНК делает, по-видимому, возможным синхронное деление части популяции (примерно 40 % клеток) в конце лаг-периода. Во время этого деления (второго) активируется утилизация глицерина, как и при первом делении, но после завершения деления она продолжается, поскольку на этот раз катаболитная репрессия не возобновляется из-за отсутствия маннита. В результате утилизации глицерина, вероятно, преодолевается энергетический кризис, о чем можно судить, как уже говорилось, по возрастанию включения меченого маннита — процесса, имеющего к этому моменту лишь индикаторное значение. Во время второго деления усиливается в первую очередь синтез РНК, в то время как синтез белка несколько запаздывает и получает развитие после окончания деления. Особенность второго деления состоит в том, что оно происходит без предварительного наращивания биомассы, т. е. происходит измельчание клеток, наблюдаемое при их подсчете. Аналогичное явление деления клеток при постоянной оптической плотности отмечено при голодании клеток по источнику углерода [7]. Из приведенных результатов следует, что в жизни клетки синтез ДНК и деление имеют приоритетное значение и могут осуществляться за счет «внутренних резервов».

В период подготовки к третьему делению наблюдается общая активация метаболизма (возрастает включение меченого маннита, глицерина, синтез РНК и белка) при незначительной активации синтеза ДНК. Когда же после завершения синхронного деления резко активируется синтез ДНК, наблюдается некоторая депрессия метаболизма. В этот период процессы репликации и транскрипции находятся в противофазе, быть может, из-за конкуренции за матрицу. Вероятно, в клеточном цикле есть период, следующий за моментом деления, когда развивается кратковременная депрессия метаболизма. Этот период проявился только в третьем делении, возможно, благодаря высокой степени синхронизации, так как при менее синхронном делении в других случаях он становится незаметным из-за наложения активации метаболизма одной части клеток на депрессию метаболизма другой. Вопрос об инициации репликации в клеточном цикле представляет боль-

шой интерес [4, 5]. В третьем делении инициацию репликации определенно можно отнести ко II классу по Хелмштеттеру, когда она происходит после окончания репликации и деления (класс 0 — инициация до завершения репликации, I класс — между концом репликации и делением) [5]. Этот тип репликации характерен для медленно растущих клеток.

Анализ результатов в целом позволяет сделать заключение, что резкие изменения утилизации углеводов, синтеза ДНК, РНК и белка при диауксии определяются частичной синхронизацией популяции клеток и могут быть отнесены к разным стадиям клеточного цикла. Сведения о том, что некоторые ферменты в синхронных культурах синтезируются периодически, а также что временная пертурбация в условиях роста асинхронной культуры может индуцировать периодический синтез ферментов, в литературе имеются [4]. Недавно опубликована работа [6], в которой представлены результаты исследования синтеза ДНК, РНК и белка у *E. coli* при диауксии на смеси ацетата и глюкозы. Сопоставление этих данных с нашими показало следующее. Совпадают сведения о продолжении синтеза ДНК в лаг-периоде и о синхронизации деления клеток в конце лаг-периода (о чем авторы [6] сделали лишь предположение на основании усиления синтеза ДНК). Отличаются данные о синтезе РНК и белка: авторы рассматриваемой работы нашли, что изменений синтеза белка в лаг-периоде не происходит, а уровень синтеза РНК остается постоянным и даже снижается после лаг-периода. Различия в результатах легко объяснимы методическими различиями. Во-первых, поскольку авторы [6] концентрацию клеток не определяли и следили за развитием культуры только по оптической плотности, первое и второе деления они не обнаружили, а третье выявили лишь по синтезу ДНК. Во-вторых, меченые предшественники добавляли в инкубационную среду, и они постоянно включались в течение роста, характеризуя в основном количество соответствующего полимера, а не скорость его синтеза. В таких условиях быстрые изменения скорости синтеза могут не проявиться на кривой включения метки. Примененная нами импульсная метка характеризует как раз скорость синтеза.

Наиболее интересными обстоятельствами процесса адаптации клеточной популяции при диауксии, которые удалось выяснить в проведенных экспериментах, нам представляются следующие: автосинхронизация, определяющая, по-видимому, колебательный характер метаболических процессов, снятие катаболитной репрессии, связанное с моментом деления клеток, и приоритетное значение синтеза ДНК и процесса деления в жизни клеток.

Приносим благодарность В. С. Банникову и С. М. Безручко за создание условий, необходимых для выполнения данного исследования.

#### Литература

1. Кузьмин С. М., Ожиганова Е. В., Дульднер М. П. Исследование развития катаболитной репрессии при росте *Escherichia coli* на смеси углеводов. — Биол. науки, 1986, № 8, с. 92.
2. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978.
3. Collins C. H. Microbiological Methods. London, 1976.
4. Donachie W. D. The cell cycle of *Escherichia coli*. — In: Developmental Biology of Prokaryotes. Oxford, 1979, p. 11.
5. Helmstetter C. E. Initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. — Journ. Mol. Biol., 1974, v. 84, p. 1.
6. Madar R., Zaritsky A. Bacterial adaptation: macromolecular biosynthesis during diauxic growth of *Escherichia coli*. — FEMS Microbiol. Letters, 1983, v. 19, p. 295.
7. Walker-Simmons M., Atkinson D. A. Functional capacities and the adenylate energy charge in *Escherichia coli* under conditions of nutritional stress. — Journ. Bacteriol., 1977, v. 130, p. 676.

Поступила 23 ноября 1984 г.