

наиболее распространенных ферментов (TEM, CTX-M, SHV) чаще встречаются в изолированном виде. Пять штаммов содержали детерминанты резистентности двух типов, ни в одном из изолятов не было обнаружено комбинаций трех и более лактамаз одновременно. Шесть штаммов не содержали генов β -лактамаз исследованных классов, и по-видимому, их устойчивость к лактамным антибиотикам обусловлена другими механизмами.

Исследовано наличие плазмид у почвенных изолятов грамотрицательных бактерий. Установлено, что большинство (83 %) выделенных устойчивых к антибиотикам культур *Pseudomonas* почвенного происхождения содержат плазмиды размером от 6 до 20 т.п.н. Возможную связь плазмид с признаками резистентности предстоит выяснить в дальнейшем.

Полученные результаты свидетельствуют о широком распространении факторов антибиотикоустойчивости среди сапрофитных НФБ окружающей среды.

Работа поддержана грантом РФФИ 07-04-96093.

1. И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности // КМАХ. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271–285.
2. Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, А.Н. Фаращук, Л.С. Страчунский Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности // КМАХ. – 2006. – Т. 8, № 3. – С. 243–259.
3. В.А. Руднов Современное клиническое значение синегнойной инфекции и возможности ее терапии у пациентов отделений реанимации // Инфекц. и антимикроб. тер. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 170–177.
4. С.В. Сидоренко Тенденции в распространении антибиотикорезистентности среди возбудителей внебольничных инфекций на территории Российской Федерации // Consilium medicum. – 2007. – № 1. – С. 75–79.
5. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, Методические указания МУК 4.2.1890-04 Edn. M., 2004.
6. Клонирование ДНК. Методы / Пер. с англ.; под ред. Д. Гловера. – М.: Мир, 1988. – 538с.
7. С.В. Сидоренко, А.Г. Березин, Д.В. Иванов Молекулярные механизмы устойчивости грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к цефалоспориновым антибиотикам // Антиб. и химиотер. – 2004. – Т. 49, № 3. – С. 3–13.

ШТАММЫ *RHODOCOCCUS* ДЛЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

А.Ю. Максимов, М.В. Кузнецова, Ю.Г. Максимова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
maks@iegm.ru

Биотрансформация и биокаталитический синтез органических соединений является одним из важнейших направлений современной биотехнологии. Широкое применение в прикладном биокатализе находят ферменты классов гидролаз и некоторые гидратирующие лиазы. Это связано как с потребностью в проведении реакций гидролиза, так и со свойствами самих ферментов и их продуцентов (технологическая стабильность, отсутствие потребности в растворимых кофакторах, возможность сверхсинтеза и др.). В частности, наиболее успешный опыт использования биокаталитических процессов в промышленности связан с процессами гидратации и гидролиза нитрилов.

У бактерий известны два основных пути метаболизма нитрилов: двустадийный гидролиз, в котором участвуют два фермента – нитрилгидратаза (КФ 4.2.1.84) и амидаза (КФ 3.5.1.4) и одностадийный гидролиз, осуществляемый нитрилазой (КФ 3.5.5.1).

Производство акриламида, осуществляемое в России и Японии путем гидратации нитрилгидратазой нитрила акриловой кислоты, является первым успешным примером крупнотоннажного биокаталитического синтеза [1, 2]. Гидролиз других нитрилов и амидов с

помощью бактерий, обладающих нитилазной или амидазной активностью, может быть использован для производства акрилата, никотината, напраксена, цианокарбоновых кислот и др. Успешное применение микроорганизмов в промышленном синтезе зависит от свойств биокатализатора: активности, pH- и термостабильности фермента.

Цель настоящей работы: селекция бактерий, метаболизирующих амиды и нитрилы карбоновых кислот, изучение свойств амидаз и нитрилгидратаз, определение структуры их генов.

Объектами исследования являются выделенные из почвы штаммы *Rhodococcus*, обладающие высокой трансформирующей активностью в отношении нитрилов и амидов. Трансформацию нитрилов и амидов с использованием биомассы выделенных штаммов проводили при 25°C в 10 mM калий-натрий фосфатном буфере, pH 7,2. Ферментативную активность измеряли ранее разработанными методами по изменению концентрации продукта в реакционной среде за минуту. Нитрилгидратазную активность определяли спектрофотометрическим методом [3]. Единица активности (1ЕД) соответствует 1 мкмоль продукта реакции/мг сухих клеток/мин. Влияние температуры и pH среды на активность ферментов изучали на препарате, полученном обработкой биомассы ультразвуком (22 кГц, 20 mA, 5×20 сек. на установке УЗДН-2) с последующим центрифугированием и фракционированием бесклеточного экстракта сульфатом аммония. Амплификацию ДНК проводили с применением сконструированных нами праймеров для выявления генов амидаз, нитрилгидратаз и нитрилаз на термоциклире Т3 (Biometra). Секвенирование ДНК проводили с использованием системы MegaBASE1000 (GE Healthcare).

В результате селекции из образцов подзолистых, бурых и аллювиальных почв на суглинистой основе, распространенных в Средней полосе России, нами выделены 24 культуры нитрилметаболизирующих бактерий, идентифицированные как *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *P. fluorescens*, *Arthrobacter* sp., обладающие амидазной активностью (более 5 мкмоль/мг/мин), превышавшей нитрилгидратазную.

У штаммов *Rhodococcus* с высокой скоростью роста на трудногидролизуемом субстрате - изобутиронитриле определена субстратная специфичность, термо- и pH-стабильность изучаемых гидролитических ферментов.

Скорость трансформации амидов у выделенных культур была выше, чем нитрилов, за исключением штамма 11-8 (рис. 1).

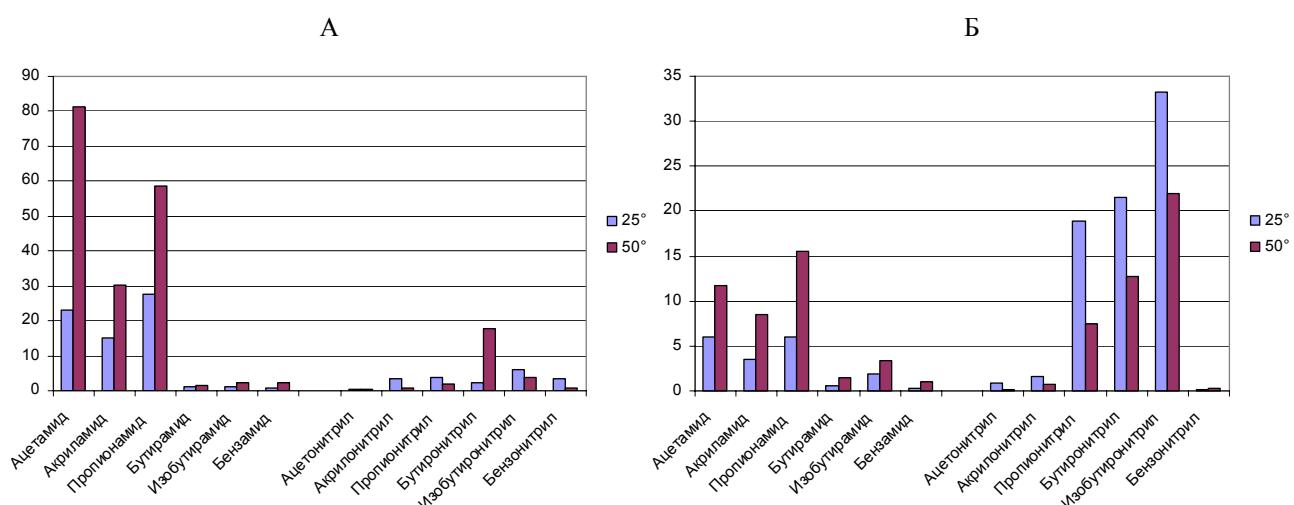


Рис. 1. Активность амидазы и нитрилгидратазы штаммов *R. erythropolis* П11-1-3 (А) и *R. rhodochrous* 11-8 (Б).

В нашей работе наилучшими субстратами для амидаз большинства штаммов оказались короткоцепочечные алифатические ацетамид и пропионамид. Никотинамид и бензамид гидролизовались с высокой скоростью штаммом 6-2-1. По-видимому, большинство амидаз выделенных бактерий относятся к группе алифатических, гидролизующих преимущественно короткоцепочечные неразветвленные амиды.

Показано, что большинство амидаз высокоактивны при повышенной температуре (наибольшая активность при 50-55 °C). Оптимальная pH реакционной среды для работы нитрилгидратаз обоих штаммов составила 6,5-7,0, с сохранением 80 % активности от 5,5 до 8,5. Амидазная активность штаммов достигала максимального значения при pH 8,0-8,5.

Для идентификации генов, кодирующих ферменты гидролиза нитрилов, проведен ПЦР-анализ с применением набора праймеров, специфичных к известным в настоящее время видам амидаз, нитрилгидратаз и нитрилаз.

Методом ПЦР получены фрагменты ДНК штаммов *Rhodococcus*, родственные генам амидаз трех типов: *R. erythropolis* (AY026386, Genbank), *R. erythropolis* (M88614, Genbank), *Rhodococcus* sp. N-771 (рис. 2).

Установлена гомология секвенированных фрагментов последовательности гена амидазы *R. erythropolis*, M88614 [4] на 93-96% (рис. 3) и *Rhodococcus* sp. N-771 на 83-98%.

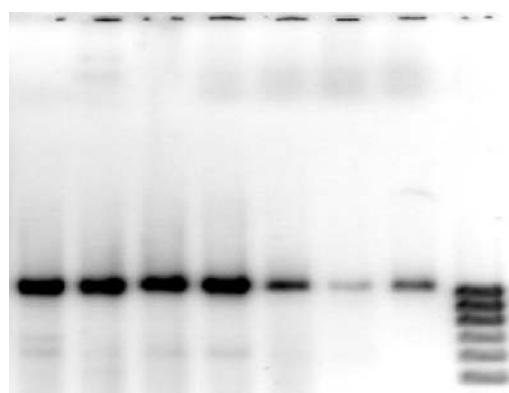


Рис. 2. ПЦР-анализ генов амидаз у почвенных изолятов *R. erythropolis*.

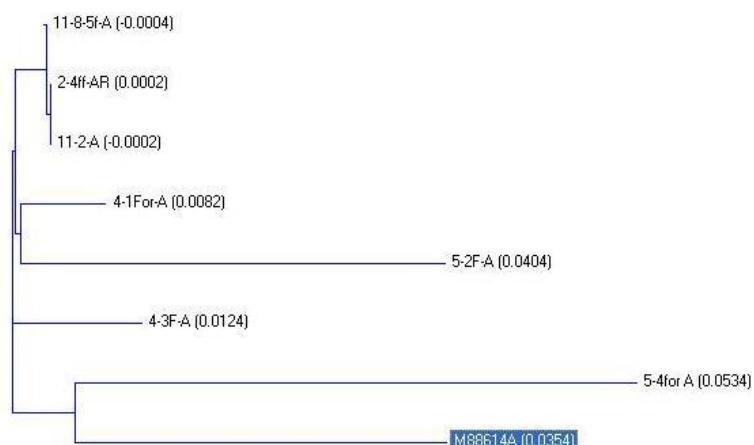


Рис. 3. Филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей генов амидаз почвенных изолятов и *R. erythropolis* M88614 (Genbank).

Эксперименты по иммобилизации бактерий показали, что клетки *Rhodococcus*, в отличие от грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas*), хорошо сорбируются на пористых углеродных материалах, таких как активированные древесные угли, неактивированный гранулированный уголь, углеродные ткани и волокна (рис. 4).

При этом повышается стабильность и увеличивается срок службы биокатализатора, появляется возможность его повторного или многократного использования и применения в проточных реакторах.

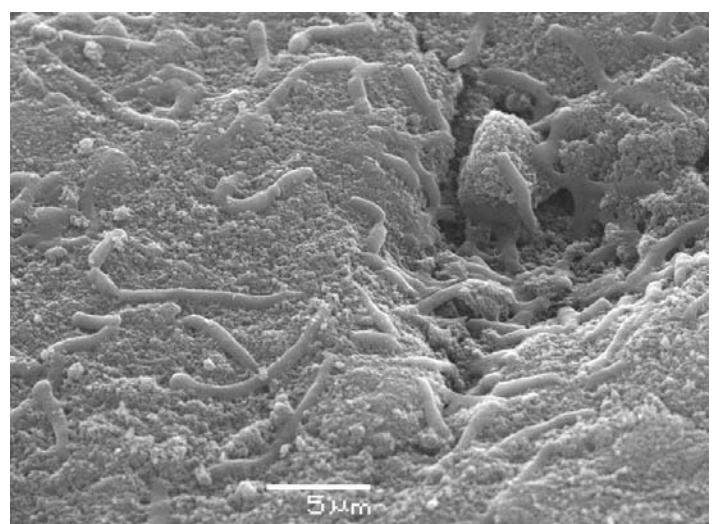


Рис. 4. Клетки *R. erythropolis*, иммобилизованные на древесном угле.

С учетом полученных результатов штаммы 11-1-3 и 4-1 могут быть рекомендованы к применению для трансформации алифатических нитрилов, а 6-2-1 – также и для получения никотиновой кислоты. Штамм 11-8 может использоваться для биологической очистки от нитрильных и амидных загрязнителей. Свойства биокатализаторов на основе селекционированных штаммов могут быть улучшены путем иммобилизации клеток родококков на углеродных материалах.

Исследования поддержаны грантами РФФИ №07-04-96071, 07-04-97617 р-ОФИ, программами РАН «Биоразнообразие и генетика генофондов» и ОБН РАН «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами».

1. Астаурова, О.Б., Погорелова Т.Е., Фомина О.Р. и др. Регуляция биосинтеза ферментов биодеградации нитрилов у *Rhodococcus rhodochrous* M0 // Биотехнология. – 1991. – № 5. – С. 10–14.
2. Zhou Z., Hashimoto Y., Kobayashi M. Nitrile degradation by *Rhodococcus*: Useful microbial metabolism for industrial productions // *Actinomycetologica*. – 2005. – Vol.19, N.1. – P.18-26.
3. Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В. и др. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 // Прикл. биохим. микробиол. – 2003. – Т.39. № 1. – С. 63–68.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=152055>.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНА *терA*, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА БИОСИНТЕЗ МЕЛАНИНА У *SINORHIZOBIUM MELIOTI*, И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ ШТАММОВ

Е.А. Найденова, Е.П. Чижевская, Б.В. Симаров

ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

genet@yandex.ru

Способность синтезировать меланин наблюдается у разных групп живых организмов: у бактерий, грибов, растений, животных. Однако, функции этого пигмента не всегда понятны. Например, для большинства патогенных бактерий способность синтезировать меланин связывают с повышенной вирулентностью. У клубеньковых бактерий люцерны значение этого пигмента до сих пор не изучено [1]. Цель настоящей работы состояла в выявлении и изучении генов биосинтеза меланина у одного из природных изолятов (штамм CA15-1) *Sinorhizobium meliloti*, выделенного из почв Средней Азии (Узбекистан). Данный штамм (фенотип *Мер*⁺) синтезирует меланин на среде с добавлением ионов меди и тирозина, а также при длительном хранении на обычных питательных средах. Для этого на первом этапе с использованием *Tn5*-мутагенеза были получены два мутанта *Tmer-1* и *Tmer-2*, утратившие способность к синтезу меланина (фенотип *Мер*⁻) (рис. 1).

Фрагменты ДНК мутантов *Tmer-1* и *Tmer-2*, содержащие транспозон, были клонированы и секвенированы. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что инсерция транспозона у каждого из мутантов произошла в различные участки кодирующей области одного и того же гена. Данный ген является структурным геном фермента тирозиназы, содержит 1485 пн, что соответствует 494 аминокислотным остаткам. При сравнении полученной последовательности с последовательностями из международной базы данных GeneBank была обнаружена 100% гомология с геном *терA* тирозиназы штамма GR4 *S. meliloti* и 98% гомология с аналогичными генами

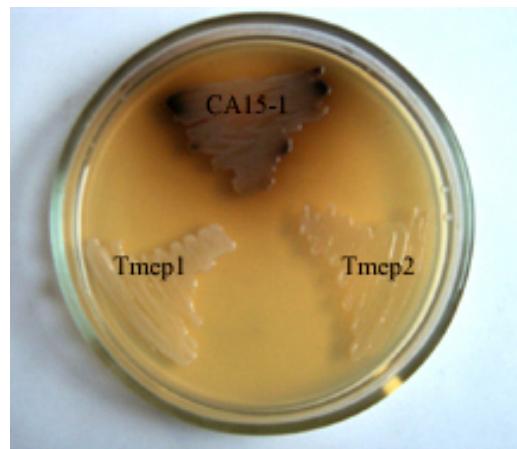


Рис. 1. Пояснения в тексте.