

верхности почвы, отличаются исключительной выносливостью к колебаниям рН, влажности, засоленности, их обычно обозначают как убиквисты. Незначительным количеством видов представлены водоросли Cf- и X-жизненных форм, Cf-форма – микроскопические талломы азотфиксирующих сине-зеленых водорослей, способные давать слизистые разрастания на поверхности почвы, требовательны к влаге и могут образовывать обильную слизь.

X-форма – одноклеточные желто-зеленые и зеленые водоросли, отличающиеся неустойчивостью против засухи и экстремальных температур.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

При исследовании видового состава водорослей дерново-подзолистой песчаной почвы после оптимизации путем торфования и землевания выявлено 38 видов, принадлежащих к 6 отделам: Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta, Euglenophyta и Rhodophyta.

В экологическом отношении выявленные почвенные водоросли являлись эдафотрофными. В спектре экобиоморф доминирующее положение занимали представители H-формы.

## **Литература**

1. *Корягин Ю. В.* Почвенная биология. – Пенза, 2001. 280 с.
2. *Ваулина Э.Н.* Состав и распределение водорослей в некоторых характерных почвах БССР: автореф. дис. канд. биол. наук // Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова, Л., 1956. 19 с.
3. *Михеева Т.М.* Альгофлора Беларуси. Таксономический каталог. Минск: БГУ, 1999. 396 с.
4. *Зенова Г.М., Штина Э.А.* Почвенные водоросли. М.: МГУ, 1990. 80 с.
5. *Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.Е.* Методы изучения почвенных водорослей. Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 2001. 60 с.
6. *Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М.* Биология почв. – М.: МГУ, 2005. 448 с.

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ Н-БУТАНОЛА**

**А. А. Черешнев**

Энергетическая безопасность и энергетическая независимость являются залогом быстрого экономического развития любого современного государства. Для Республики Беларусь, не обладающей достаточным количеством природных энергоресурсов, актуальным является поиск альтернативных видов топлива. В этом плане определенный интерес представляет возобновляемый экологически чистый вид биотоплива на осно-

ве биобутанола. Биобутанол имеет целый ряд преимуществ перед другими видами биотоплива. В частности, октановое число н-бутанола очень близко к бензину и он легко с ним смешивается; его использование не требует переделки двигателей автомобилей; он менее гигроскопичен, менее летуч, имеет меньшую коррозионную активность, что позволяет его перекачивать по трубопроводам и разливать с помощью обычных бензозаправочных колонок; является экологически чистым, в его выхлопах не содержится ни азота, ни серы, ни ароматических углеводородов; его получение не требует реорганизации имеющихся производств [1]. Все это позволяет рассматривать биобутанол в качестве перспективной замены биоэтанола и биодизелю. По предварительным оценкам, к 2020 году биобутанол в мире будет производиться на сумму 247 миллиардов долларов [2].

Традиционно биобутанол микробиологическим синтезом получали с использованием бактерий рода *Clostridium*. Однако его производство не является рентабельным, поскольку отсутствуют эффективные штаммы-продуценты, что обусловлено чувствительностью бактерий *Clostridium* к бутанолу, образованием большого числа побочных продуктов, а также сложной генетической регуляцией его синтеза.

Целью настоящей работы являлось получение рекомбинантного штамма *C. acetobutylicum* SGM с повышенной продукцией н-бутанола.

Для получения эффективного штамма-продуцента *C. acetobutylicum* на первом этапе использовали метод химического мутагенеза. В результате оптимизированных условий обработки бактерий N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином с последующей стадией обогащения, было получено 22 мутантных варианта, способных расти на среде, содержащей 3% бутанола. Полученные клоны были проверены на сохранность мутантного фенотипа. Для этого отобранные варианты в течение трех пассажей последовательно пересеивали на селективные среды, содержащие 2 %, 2,5 % и 3 % бутанола. В результате данных экспериментов были отобраны варианты, стабильно наследующие признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5 % в течение трех последовательных пассажей (всего 7 штаммов).

Для всех отобранных мутантов исследовали сольвентогенную активность. В результате было установлено, что только четыре мутантных штамма характеризуются снижением синтеза бутанола по отношению к исходному штамму *C. acetobutylicum* S1. Остальные мутанты продуцировали бутанол на уровне исходного штамма или выше.

Для дальнейших молекулярно-генетических манипуляций использовали мутантный вариант 5Н, стабильно наследующий признак устойчивости к бутанолу и продуцирующий бутанол в более высоких концен-

трациях, чем исходный штамм. Кроме того, с использованием метода газожидкостной хроматографии было установлено, что липидный состав клеточных мембран у варианта 5Н изменился в сторону увеличения количества насыщенных жирных кислот. При этом фиксировали появление 2-гексил циклопропаноктановой насыщенной жирной кислоты, отсутствующей у исходных бактерий. Следует отметить, что увеличение количества насыщенных жирных кислот (в том числе, производных циклопропановой кислоты) обеспечивает бактериям *C. acetobutylicum* стабилизацию мембранных структур и уменьшает их проницаемость для бутанола [3].

С использованием техники перекрывающейся ПЦР и ферментов рестрикции была сконструирована плазида pCB20Pg, содержащая экспрессионную кассету, представленную тиолазным промотором и последовательностью генов groESL бактерий *C. acetobutylicum*, кодирующих синтез белков теплового шока. С использованием техники ПЦР был изолирован ген, детерминирующий синтез термостабильной  $\alpha$ -амилазы бактерий *B. subtilis* 406, который был встроен в состав плазмиды pCB20Pg под контролем промотора p43. Полученная конструкция обозначена как pSOLAMY.

Поскольку особенностью кластридий является наличие системы рестрикции-модификации (например, созданная конструкция pSOLAMY содержит 36 сайтов узнавания для рестриктазы *Cac824I*, входящей в состав системы рестрикции-модификации бактерий *C. acetobutylicum*), конструкцию pSOLAMY перед введением в клетки данных микроорганизмов подвергали модификации. Для этого её вводили в бактерии *E. coli* XL1 Blue, содержащие плазмиду pJQM со встроенным геном метилазы бактерий *C. acetobutylicum*, экспрессия которого обеспечивалась промотором *lac*-оперона в присутствии индуктора IPTG. После модификации плазмиду pSOLAMY вводили в клетки *C. acetobutylicum* 5Н с использованием метода электропорации, в результате чего был отобран генно-модифицированный штамм, обозначенный *C. acetobutylicum* SGM. Установлено, что генно-модифицированные бактерии *C. acetobutylicum* SGM, стабильно наследующие плазмиду pSOLAMY<sup>-</sup> в течение 40 поколений, характеризовались увеличением времени экспоненциальной (в 1,6 раз) и стационарной (в 1,3) фаз роста относительно исходного штамма *C. acetobutylicum* 5Н. Кроме того присутствие данной плазмиды увеличивало устойчивость штамма к стрессовым факторам среды (в частности, повышенной температуре).

Оптимизированы условия ацетобутилового брожения генно-модифицированных бактерий *C. acetobutylicum* SGM. Установлено, что через 72 культивирования бактерий *C. acetobutylicum* SGM при 37°C в

13 % ржаной среде с пониженной вязкостью, которая достигалась обработкой ржаного затора ферментными препаратами Амилекс 4Т и Вискоферм образуется до 24,02 г/л бутанола (исходный штамм продуцировал до 18 г/л бутанола). При этом суммарное количество растворителей составляло 37,22 г/л (для исходного штамма это значение не превышало 27 г/л).

Таким образом, в результате проведенного исследования был получен генно-модифицированный штамм *C. acetobutylicum* SGM с повышенной продукцией н-бутанола. На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. С использованием оптимизированных условий мутагенеза был отобран мутантный штамм *C. acetobutylicum* 5Н, продуцирующий на 20% больше бутанола, стабильно наследующий признак устойчивости к бутанолу в концентрации 2,5% и характеризующийся изменённым качественным и количественным составом липидов клеточной мембраны;

2. Получена генно-инженерная конструкция pSOLAMY, содержащая гены amy406 и groESL, детерминирующие соответственно утилизацию крахмала и синтез белков теплового шока. После предварительной модификации (с использованием индуцируемой системы экспрессии гена метилазы бактерий *C. acetobutylicum*) плазида pSOLAMY введена в клетки *C. acetobutylicum* 5Н;

3. Установлено, что генно-модифицированные бактерии *C. acetobutylicum* SGM продуцируют до 24,02 г/л бутанола, что на 33,44% выше, чем у исходного штамма. При этом суммарное количество растворителей составляло 37,22 г/л, что превышает исходный штамм на 37,85 %

#### Литература

1. *Szulczyk, K. R.* Which is a better transportation fuel—butanol or ethanol? // International Journal of Energy and Environment. 2010. Vol. 1. № 3. P. 501-512.
2. [https://experts.umn.edu/en/publications/separation-and-purification-of-biobutanol-during-bioconversion-of-biomass\(75a60300-df33-4105-b324-4a31aa48379c\).html](https://experts.umn.edu/en/publications/separation-and-purification-of-biobutanol-during-bioconversion-of-biomass(75a60300-df33-4105-b324-4a31aa48379c).html)
3. *Bowring S.N., Morris J.G.* Mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* // J. Appl. Bacteriol. 1985. Vol. 58. № 6. P. 577–584.

### РАЗВИТИЕ СИМПТОМОВ ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КЛЕТКАХ КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИАМИНОВ

**А. А. Чичко, В. С. Мацкевич, В. В. Самохина, В. В. Демидчик**

Ключевым триггером запрограммированной клеточной гибели (ЗКГ) у высших растений является повышенная концентрация активных форм