

2. Остроумов С.А., Головки А.Э. Биотестирование токсичности поверхностно-активного вещества (сульфонола) с использованием проростков риса как тест-объекта // Гидробиологический журнал.– 1992.– Т.28, № 3.– С.15–23.
3. Остроумов С. А., Колесников М. П. Биокатализ переноса вещества в микрокосме ингибируется контаминантом: воздействие ПАВ на *Lymnaea stagnalis* // ДАН.– 2000.– Т. 373, № 2.– С. 278–280.
4. Остроумов С.А. Биологические эффекты при воздействии поверхностно-активных веществ на организмы.– М.: МАКС-Пресс, 2001.– 334 с.
5. Федорова А. И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды. – М.: Владос, 2001.– С. 247–249.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНЫХ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ НАФТАЛИНУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.Н. Хило, С.Л. Василенко, А.В. Лагодич, М.А. Титок

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
titok@bsu.by

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются классом широко распространенных устойчивых поллютантов, представляющих опасность для живых организмов. Основную роль в деградации ПАУ играет утилизация этих веществ микроорганизмами, способными их использовать в качестве источника углерода и энергии. Наиболее детально системы биodeградации ПАУ (например, нафталина) изучены у граммотрицательных бактерий, в частности псевдомонад. Подобная информация для грамположительных бактерий практически отсутствует.

Целью настоящей работы явилось выделение и первичная характеристика грамположительных бактерий, способных утилизировать нафталин.

Из различных природных источников на территории Беларуси с использованием метода накопительных культур было изолировано 9 штаммов грамположительных бактерий, способных использовать нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии.

С использованием физиолого-биохимических тестов и рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16S РНК все исследованные штаммы были условно разделены на четыре группы. В первую группу вошел штамм AL18, во вторую и третью группы вошло по два штамма (соответственно GP1, GP2 и GP3, GP4), а четвертая группы представлена бактериями четырех штаммов (GP5, GP6, GP7, GP8). Представители каждой группы обладали сходными физиолого-биохимическими свойствами и идентичными рестрикционными профилями генов 16S РНК (рис.1). Помимо этого бактерии каждой группы характеризовались определенной морфологией колоний, образующихся на полноценной агаризованной среде. Штамм AL18 (группа I) в процессе роста формировал круглые, ровные, выпуклые, матовые колонии вначале молочно белого цвета, со временем приобретающие розово-оранжевую окраску. Штаммы GP1, GP2 (группа II) образовывали круглые, ровные, выпуклые, матовые колонии молочно белого цвета, штаммы GP3 и GP4 (группа III) росли в виде круглых, ровных, выпуклых, блестящих белых колоний и, наконец, бактерии штаммов GP5, GP6, GP7, GP8 (группа IV) образовывали мелкие, круглые, ровные, выпуклые, блестящие прозрачные колонии, появляющиеся только на 5–6 сутки культивирования при температуре 28 °С.

Для представителей первой и четвертой группы частично была определена последовательность генов 16S РНК. На основании гомологии с известными, штамм AL18 был идентифицирован как *Bacillus sp.* (секвенированная последовательность имеет 94 % гомологии с геном 16S РНК штамма *Bacillus sp.* MG99), штамм GP6 можно отнести к бактериям

Paenibacillus naphthalenovorans (секвенированная последовательность имеет 88 % гомологии с геном 16S РНК штамма *Paenibacillus naphthalenovorans* PRN5).

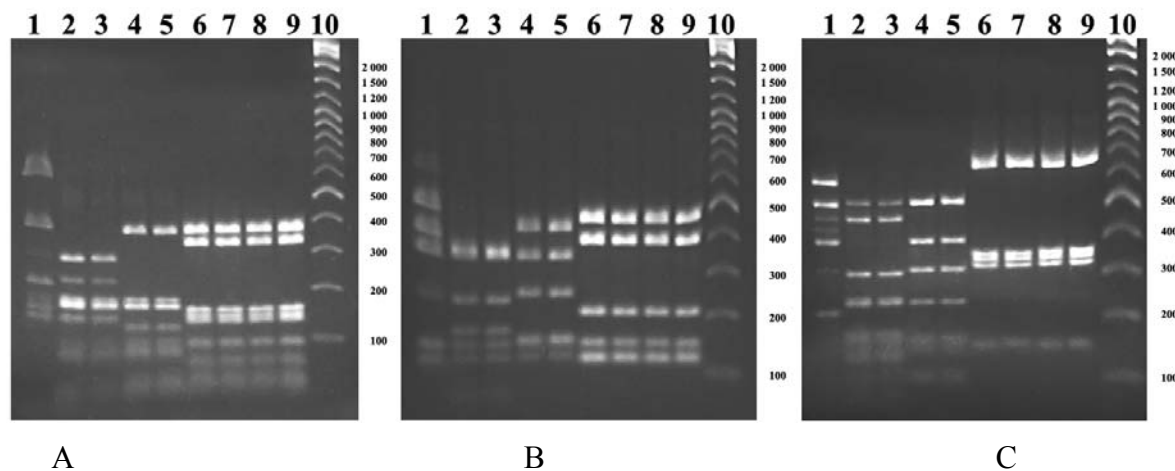


Рис. 1. Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов 16 S РНК ферментами Msp I (А), Rsa I (В) и Hae III (С). В качестве матрицы в полимеразной цепной реакции использовали татальную ДНК, выделенную из клеток штаммов: 1 – AL18, 2 – GP1, 3 – GP2, 4 – GP3, 5 – GP4, 6 – GP5, 7 – GP6, 8 – GP7, 9 – GP8; 10 – 1 kb репер.

Анализ роста изолированных нафталинутилизирующих штаммов в присутствии промежуточных продуктов метаболизма (салицилат и гентизат) позволил установить, что они не обладают выраженной способностью расти в присутствии указанных соединений, за исключением штаммов четвертой группы (GP5, GP6, GP7, GP8), утилизирующих только салицилат в качестве источника углерода. Полученные данные представляют определенный интерес и могут свидетельствовать об особенностях организации систем метаболизма нафталина у исследованных бактерий. Следует отметить, что для изученных в этом отношении грамположительных бактерий характерно, что катаболизм нафталина осуществляется через образование салицилата, превращающегося в гентизат [1].

Не менее интересные данные были получены при анализе способности исследованных бактерий расти в присутствии нефти (2 %) и ее производных (керосин, дизельное топливо, гексадекан). Наиболее выраженной способностью использовать все вышеперечисленные соединения в качестве источников углерода и энергии обладали штаммы группы I (AL18) и II (GP1, GP2). Кроме того, штамм AL18 мог утилизировать моноароматический углеводород толуол и трициклические ароматические углеводороды фенантрен и антрацен.

В настоящее время, для грамположительных бактерий отсутствуют данные о возможной внехромосомной локализации генов биodeградации нафталина, в то время как для грамотрицательных бактерий признак утилизации нафталина, как правило, имеет плазмидную природу [2]. Для установления локализации генов деградации нафталина у изолированных бактерий изучали стабильность наследования *nah*-фенотипа при культивировании бактерий в неселективной среде при различных температурных режимах (28 °C и 37 °C), а также были предприняты попытки выделить плазмиды щелочным методом. В результате было установлено, что все штаммы за исключением GP1, GP2 (группа II), могут расти при исследованных температурах. При этом зарегистрировано, что признак утилизации нафталина утрачивается у штаммов GP3, GP4 (группа III) с частотой 3–4 % при 28 °C и с частотой 34–35 % при 37 °C, а у штамма AL18 (группа I) с частотой 3 % при 28 °C и с частотой 12 % при 37 °C. При этом для штамма AL18 выявленные *nah*⁻ варианты не обладали способностью утилизировать фенантрен и антрацен. Для штамма GP5 утрата признака утилизации нафталина регистрирова-

лась только при температуре 37 °С (с частотой 1 %). Полученные данные свидетельствуют о возможной внехромосомной локализации генов биodeградации. Попытки выделить плазмиды щелочным методом из клеток штаммов GP3, GP4 и AL18 пока не увенчались успехом. Тем не менее, спонтанная утрата *nah*-признака в независимости от температурного режима (известно, что признак утилизации нафталина может не проявляться при повышенной температуре) может свидетельствовать в пользу внехромосомной локализации детерминант биodeградации. Данный факт является весьма примечательным, поскольку для грамположительных бактерий D-плазмиды не описаны.

Таким образом, в результате проведенного исследования из различных природных источников на территории Беларуси были изолированы грамположительные спорообразующие нафталинутилизирующие бактерии. Определенный интерес представляет штамм AL18, способный помимо нафталина утилизировать моноароматический углеводород толуол и трициклические ароматические углеводороды фенантрен и антрацен, а также нефть и продукты ее переработки и имеющий внехромосомную локализацию генов биodeградации. Выделенный штамм может быть использован в качестве основы для создания комплексных биоремедиационных препаратов для очистки загрязненных ПАУ территорий.

Литература

1. Habe H., Omori T. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria. // *Bio- sci. Biotechnol. Biochem.*– 2003.– V.67.– P.225–243.
2. Кочетков В.В., Боронин А.М. Плазмиды биodeградации нафталина, несовместимые с плазмидами групп IncP-2 и IncP-7 // *Генетика.*– 1985.– Т. 21.– С.522–529.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОКРУЖЕНИЯ В МИКРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА

А.И. Чернова, С.Л. Василенко, И.И. Овденко, М.А. Титок

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
titok@bsu.by*

Горизонтальный и вертикальный перенос генетического материала является одним из важнейших факторов, обеспечивающих адаптацию микробных сообществ к изменяющимся условиям окружающей среды. В этом плане определенный интерес представляют D-плазмиды, способные путем конъюгации передавать признаки биodeградации органических соединений среди бактерий различных таксономических групп [1]. В то же время транспозонная организация генов биodeградации, способствует распространению данных детерминант среди природных популяций за счет их встраивания в состав бактериальных геномов или других плазмид [2], что ускоряет процессы биоремедиации загрязненных территорий [3].

Известно, что экспрессия генетического материала, в том числе генов биodeградации, может изменяться в зависимости от генетического окружения. Это обуславливает поиск оптимального сочетания детерминант плазмидного и хромосомного происхождения.

Целью настоящей работы явилось изучение характера наследования D-плазмид группы IncP-7 и IncP-9 и эффективности экспрессии входящих в их состав генов биodeградации нафталина в зависимости от генетического окружения. Проведенное исследование является одним из начальных этапов поиска оптимального бактериального хозяина плазмид биodeградации при создании эффективных штаммов-деструкторов.

Следует отметить, что наиболее полно у плазмид биodeградации нафталина изучены молекулярно-генетические системы биodeградации, тогда как механизмы репликации и конъю-