

средними значениями G+C ($\text{Arg4} \ll \text{Arg2}$), что, как мы уже говорили, не характерно для бактерий. Значение 3GC у *Thermotoga maritima* равно 0,522 при относительно низких уровнях 1GC и 2GC. Перекрест между Arg4 и Arg2 в нашей выборке бактерий расположен между G+C = 0,330 и G+C = 0,291. GC-насыщенность *Thermotoga maritima* равна 0,461, а соотношение Arg4 и Arg2 в её геноме такое же, как у экстремально GC-бедных бактерий. По аналогии с историей эволюции *Haloquadratum walsbyi*, можно предположить, что в геноме у предка *Thermotoga maritima* существовало сильное мутационное АТ-давление, сменившее своё направление на прямо противоположное в недавнем прошлом.

Судя по геномам *Haloquadratum walsbyi* и *Thermotoga maritima*, большой разрыв между частотами использования Arg4 и Arg2 является своего рода «следом» пребывания в условиях сильного мутационного давления.

Признаком сильного мутационного GC-давления является экстремальная GC-насыщенность третьих положений кодонов в большинстве генов данного генома. Вследствие этого замены АТ на GC гораздо чаще происходят в первых и во вторых положениях кодонов, чем в третьих положениях, которые уже насытились гуанином и цитозином. Проявлением сильного мутационного давления является высокая частота несинонимичных нуклеотидных замен.

По нашим данным, геномы бактерий несут в себе след пребывания их общего предшественника под воздействием сильного мутационного GC-давления, которое могло вызвать в его геноме мутации, приведшие к тому, что его потомки образовали отдельное царство живых организмов.

Геномы архей несут в себе след пребывания их общего предшественника под воздействием сильного АТ-давления. Этот процесс, повышающий частоту несинонимичных и нонсенс мутаций, мог явиться причиной возникновения особенностей, характеризующих царство архей.

Отдельные прокариотические организмы (*Haloquadratum walsbyi* и *Thermotoga maritima*) «прошли» через сильное мутационное давление противоположного направления в недавнем эволюционном прошлом.

1. Y. Nakamura et al. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000 // Nucl. Ac. Res. – 2000. – Vol.28. – N.1. – P.292.
2. S. Cuadros-Orellana et al. Genomic plasticity in prokaryotes: the case of the square haloarchaeon // The ISME Journ. – 2007. – Vol.1. – P.235–245.
3. N. Sueoka, Directional mutation pressure and neutral molecular evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – Vol.85. – P.2653–2657.

РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННОГО АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО СООБЩЕСТВА МИКРОСИМБИОНТОВ ЛЮЩЕРНЫ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

В.С. Белова

*ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, С.-Петербург-Пушкин-8, Россия
genet@yandex.ru*

Восстановление деградированных почв, в том числе и засоленных, особенно остро стоит для южных районов России. Перспективным экологически чистым подходом для решения проблемы засоленности почв может стать выращивание бобовых растений, некоторые из которых являются умеренными галотолерантами. Бобовые способны накапливать азот из атмосферы в результате их симбиоза с клубеньковыми бактериями (ризобии). Вместе с тем, ризобии способны существовать в почве в сапрофитном состоянии. Известно, что почвенное сообщество может составлять до 7000 различных видов микроорганизмов, однако, данные о популяциях ризобий, составляющих существенное меньшинство в почвенных

бактериальных азотфиксирующих сообществах, практически отсутствуют [1]. Задачей исследования было выделить природные изоляты клубеньковых бактерий люцерны, находившихся длительный период времени в сапрофитном состоянии в деградированных почвах, подвергнутых экстремальному засолению, и изучить их генетическое разнообразие и симбиотические свойства.

Образцы почв были отобраны в районе юго-западного предгорья гор Мугоджары (Челкарский район, Казахстан), где основным типом засоления является хлоридное. Определение степени засоления почв проводили согласно методике [2, 3]. Выделение бактерий из почвенных вытяжек проводили с использованием стерильных микровегетационных опытов [4]. Видовую принадлежность природных изолятов определяли методом ARDRA [5], плазмидный состав - по методу Экхардта [6].

Солеустойчивость природных изолятов определяли по изменению оптической плотности культур (OD_{600}), выращенных в течение 3 дней в жидкой среде ТУ [2]. Симбиотические свойства изолятов изучали в стандартных условиях стерильных микровегетационных опытов [4]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2000.

Почвенные образцы были отобраны с 11 участков в двух районах Приаралья, подвергнутых засолению. Каштановые почвы в районе-1 были покрыты солевой коркой (шор), однако, на них было отмечено произрастание одиночных бобовых растений *Glycyrrhiza glabra*. Почвы в районе-2 – это засоленные песчаные почвы, на которых произрастали кустарники из семейства бобовых *Halimodendron halodendron*. Отобранные почвенные образцы имели содовый pH 9.8 (район 1) и хлоридно-сульфатный pH ~7 (район 2) типы засоления. Кроме того, было установлено, во всех образцах, за исключением одного, наблюдались следы азота, а количество углерода резко варьировало (рис. 1). Титр ризобий, симбионтов люцерны, в деградированных почвах составил около 10^{1-3} .

В почвенном микробном сообществе были обнаружены изоляты обоих видов ризобий, инокулирующих люцерну: *Sinorhizobium meliloti* и *S. medicae*. Всего было выделено 17 независимых изолятов, которые были способны расти при высоких концентрациях соли (0.6 M NaCl), а 53% изолятов – на 0,8 M NaCl. Установлено, что все изоляты, выделенные из засоленных почв и находившиеся длительный период времени в сапрофитном состоянии, сохранили симбиотическую активность по отношению к люцерне посевной. Вместе с тем, 41% изолятов был не способен формировать азотфиксирующий симбиоз с 2-мя из 9 различных видов растений-хозяев, относящихся к одной группе перекрестной инокуляции.

Все изоляты содержали две видоспецифичные высокомолекулярные симбиотические плазмиды. Кроме того, в геномах подавляющего числа природных изолятов (более 60%) были выявлены дополнительные криптические плазмиды, число которых составляло от 1 до 3, а молекулярная масса варьировала от 50 до 310 тпн (рис. 2). Всего было выявлено 10 различных плазмидных профилей. Плазмида с молекулярной массой около 180 тпн была

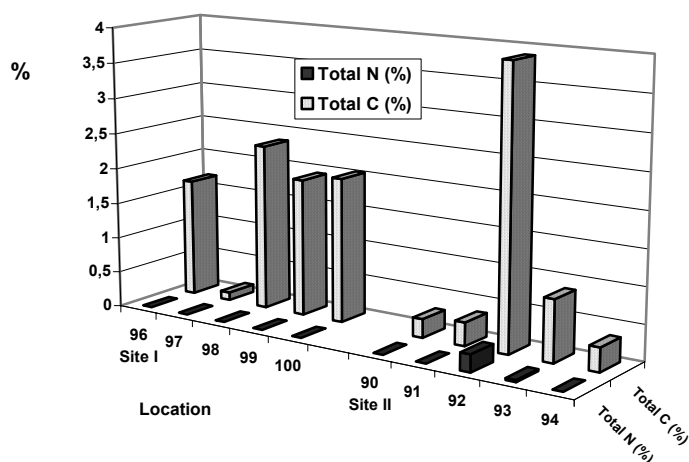


Рис. 1. Пояснения в тексте.

выявлена у 47% изолятов. Согласно литературным данным плазмиды такого размера могут участвовать в контроле ряда адаптивных свойств ризобий.

Изучение молекулярно-генетического разнообразия у природных изолятов ризобий, подвергшихся солевому стрессу в сапрофитном состоянии в пустынных почвах, позволило выявить у них высокий уровень геномного полиморфизма. Было установлено, что изоляты, выделенные из двух различных районов, существенно различались по числу, выявленных у них RFLP типов симбиотически важных *nodD* локусов и *betS* локуса, который участвует в контроле транспорта основного осмопротектора ризобий – бетаина (рис. 3 и 4). Из общего числа выявленных RFLP типов, число которых составило 7 для каждого из изученных локусов, только 2 RFLP типа, в каждом случае, являлись общими для изолятов, выделенных из двух различающихся районов.

Анализ изолятов с помощью ISRM1021 фингерпринтинга позволил выявить 11 генетически различных изолятов. У 5 изолятов, выделенных в обоих районах различной засоленности, были выявлены идентичные IS-фингерпринты, что позволило сделать вывод о доминировании данного генотипа в деградированной почве.

На основании полученных данных был проведен анализ филогенетического родства между изучаемыми изолятами ризобий люцерны, выделенных из засоленных почв (рис. 5). Обнаружено, что среди проанализированных изолятов можно выделить кластеры существенно различающиеся по данным геномным характеристикам. При этом 2 кластера имели 50% уровень сходства и 2 кластера 75%.

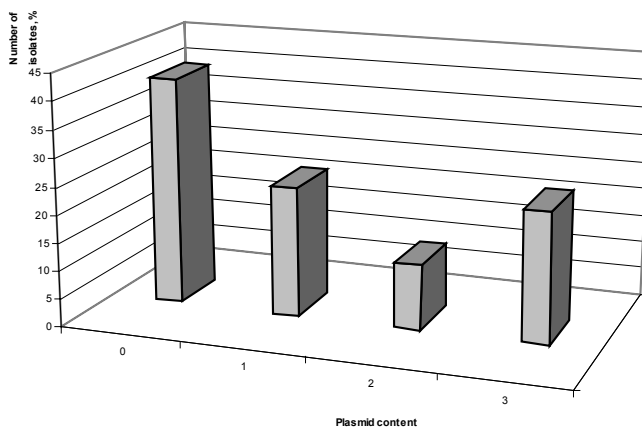


Рис. 2. Пояснения в тексте.

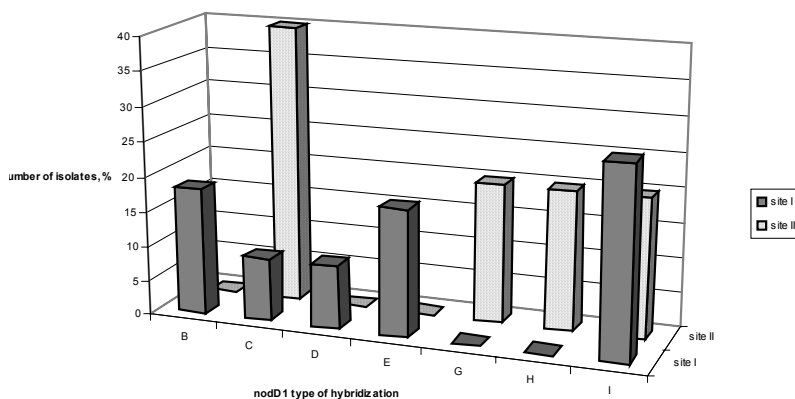


Рис. 3. Пояснения в тексте.

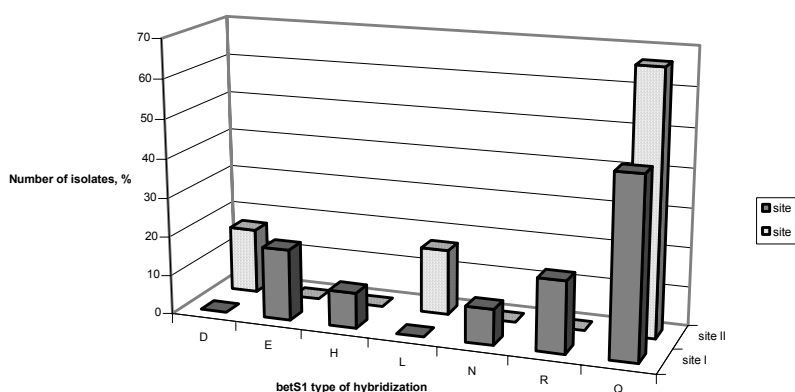


Рис. 4. Пояснения в тексте.

Результаты анализа геномного полиморфизма природных изолятов люцерны по *nodD* и *bet* локусам, а также результаты типирования изолятов по IS-фингерпринтингу и анализу плазмид дают основание сделать вывод о том, что в деградированных почвах, подвергнутых экстремальному засолению, имел место интенсивный перенос генов между природными изолятами клубеньковых бактерий люцерны.

Работа была выполнена при поддержке международного гранта INCO-Copernicus, РФФИ 08-04-01230-a.

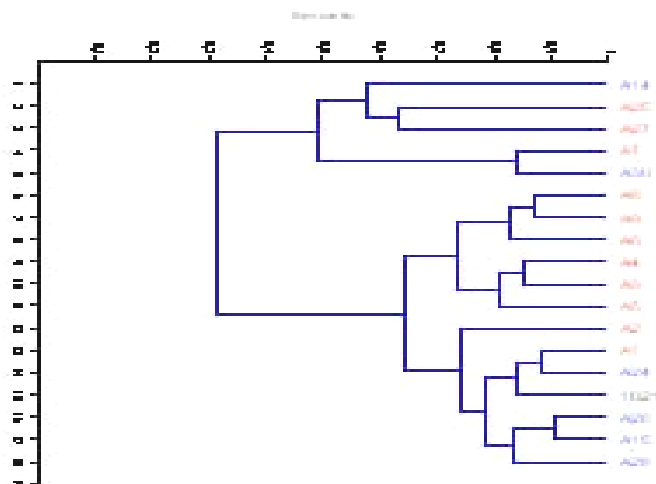


Рис. 5. Пояснения в тексте.

1. U. Priefer et al., 2008 (в печати).
2. М.В. Ибрагимова, М.Л. Румянцева, О.П. Онищук, В.С. Белова, О.Н. Курчак, Е.Е. Андронов, Н.И. Дзюбенко, Б.В.Симаров, Симбиоз клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti* с люцерной *Medicago sativa* в условиях засоления // Микробиология. - 2006. - Т.75. - №1. - С.94-100.
3. H.L. Bohn, B.L. McNeal, G.A. O'Connor, Salt affected soils.// Soil Chemistry. 3rd Edition. - 2001. - P. 280-302.
4. Б.В. Симаров, А.А. Аронитам, Н.И. Новикова, Генетические основы селекции клубеньковых бактерий // Под ред. Симарова Б.В. Л. Агропромиздат. - 1990. - 192 с.
5. М.Л. Румянцева, В.В. Якуткина, Т. Дамман-Калиновски, Л.А. Шарытова, М. Келлер, Б.В. Симаров, Сравнительный анализ структурной организации генома у клубеньковых бактерий люцерны видов *Sinorhizobium medicae* и *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. - 1999. - Т.35. - N2. - С.178-186.
6. Е.Е. Андронов, М.Л. Румянцева, В.В. Сагуленко, Б.В. Симаров, Влияние растения-хозяина на генетическое разнообразие природной популяции *Sinorhizobium meliloti*.// Генетика. - 1999. - № 10. - С. 1169-1177.

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ У БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* В-162 – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
veremeenkokatya@yandex.ru

В настоящее время идет поиск новых штаммов микроорганизмов, пригодных для использования в качестве биопестицидов. Наиболее перспективными в этом отношении являются ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* флуоресцирующей группы, способные к синтезу высокоактивных антибиотиков широкого спектра действия – феназинов, пирролнитринов, диацетилфлороглюцинолов и др. (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*) [1]. Феназины представляют собой низкомолекулярные соединения, синтезирующиеся в ходе реакций ароматического пути [2]. Обладая способностью присоединять электроны и превращаться в стабильные анионы, данные вещества являются важнейшими генераторами окислительного стресса в клетках различных микроорганизмов, на чем основано их антимикробное действие [3].

Объектом исследований являлся штамм *P. aurantiaca* В-162, клетки которого обладают способностью к синтезу феназиновых антибиотиков (71–75 мг/л). На его основе в результате нескольких серий последовательных мутагенезов с помощью N⁺-нитро-N⁻