

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-

югационного переноса практически не исследованы. Отсутствие в литературе сведений, касающихся спектра хозяев Nah-плазмид в первую очередь обусловлено тем, что признак утилизации нафталина не всегда эффективно экспрессируется в бактериях отличных от природных хозяев [4], и отсутствие хорошо диагностируемых селективных маркеров не позволяет изучать их наследование в клетках чужеродных бактерий.

Для изучения способности плазмид pAL1 (IncP-7) и pNL10 (IncP-9) передаваться и наследоваться в клетках гетерологичных хозяев на первом этапе было осуществлено встраивание транспозонов miniTn5, детерминирующих соответственно устойчивость к канамицину и стрептомицину, в состав плазмидных репликаонов. В данных экспериментах транспозон мини-Tn5 в составе суицидного вектора pUT был введен в клетки природных хозяев, содержащие данные плазмиды, при этом частота транспозиции транспозонов составила 10^{-4} – 10^{-5} . При скрещивании полученных Km^R- и Sm^R-вариантов с реципиентными бактериями *P. putida* M2 (met-) были отобраны транспозонсодержащие варианты плазмид, сохранившие способность обеспечивать деградацию нафталина. Полученные таким образом штаммы *P. putida* M2, содержащие плазмиду pAL1 с транспозонами мини-Tn5 (канамицинрезистентный и стрептомцинрезистентный варианты) и плазмиду pNL10 (канамицинрезистентный вариант) были использованы в качестве донорных в конъюгационных скрещиваниях. В качестве реципиентов было использовано 23 штамма псевдомонад. Было установлено, что использованные плазмиды способны передаваться в клетки всех исследованных в этом отношении бактерий рода *Pseudomonas*. При этом в большинстве бактерий рода *Pseudomonas* плазмиды наследовались стабильно (*P. aurantiaca*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. caryofilly*, *P. aureofaciens*, *P. vignae*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. marginata*, *P. mendocina* PM2, *P. aeruginosa*), а в некоторых утрачивались с невысокой частотой – 2–6 % (*P. chlororaphis*, *P. lachrimans*, *P. mendocina*). Наибольшая степень утраты наблюдалась для плазмиды pAL1 в клетках бактерий *P. palleronii* и *P. artrofaciens* (47 % и 27 %, соответственно).

Для определения биодеградативного потенциала штаммов, содержащих плазмиды pAL1 и pNL10, были проведены эксперименты по изучению их скорости роста на плотной и в жидкой среде с нафталином (в качестве единственного источника углерода и энергии), а также изучена эффективность биодеградации нафталина плазмидсодержащими бактериями в модельной почвенной системе.

Высокая скорость утилизации нафталина может быть обусловлена способностью генов биодеградации эффективно экспрессироваться в определенном генетическом окружении, а также зависеть от времени клеточного цикла, в ходе которого происходит удвоение и распределение генетического материала, в том числе и внехромосомного происхождения, между дочерними клетками.

Для первичной характеристики штаммов-деструкторов была изучена скорость их роста на агаризованной минимальной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин. В результате этих экспериментов было установлено, что плазмидсодержащие бактерии на плотной среде с нафталином способны формировать изолированные колонии с разной скоростью. На основании полученных данных было отобрано 6 плазмидсодержащих штаммов: *P. putida* KT2442, *P. putida* M F19, *P. mendocina* PM2, *P. stutzeri* B975, *P. lachrimans* B146 и *P. aureofaciens* B1249, характеризовавшихся разной скоростью роста, для которых была изучена динамика роста в жидкой минимальной среде, содержащей нафталин в качестве единственного источника углерода.

На основании полученных результатов все изученные штаммы были условно разбиты на три группы. Первая группа плазмидсодержащих бактерий *P. putida* KT2442, *P. lachrimans* B146 и *P. mendocina* PM2 характеризовалась самой высокой скоростью роста, вторую группу составили плазмидсодержащие штаммы *P. putida* M F19 и *P. stutzeri* B975 MF19, скорость роста которых была несколько ниже и, наконец, бактерии *P. aureofaciens* B1249 и *P. vignae*

1025, несущие плазмиды pAL1 и pNL10 фактически не способные нормально размножаться в жидкой среде с нафталином.

Следующий этап работы был посвящен изучению динамики роста плазмидсодержащих бактерий в модельных почвенных системах. Для работы были отобраны три штамма, содержащие плазмиду pAL1: *P. putida* KT2442 и *P. mendocina* PM2, как наиболее быстро растущие, и штамм *P. stutzeri* B975, характеризующийся средней скоростью роста. В почвенные образцы (100 г.), содержащие нафталин (в концентрации 1г/кг), вносили 10^6 – 10^7 клеток бактерий. В качестве контроля использовали почву с нафталином, в которую бактерии не вносились, а также почва без нафталина. Установлено, что исследованные плазмидсодержащие бактерии способны достаточно эффективно размножаться в почве. Наибольшей скоростью роста характеризовался штамм *P. putida* KT2442/pAL1, численность которого увеличилась через 4 дня на два порядка и сохранялась на этом уровне в последующие дни культивирования. Увеличение численности бактерий *P. mendocina* PM2/pAL1 и *P. stutzeri* B975/pAL1 на два порядка регистрировали только на 8 сутки, а на 15 день культивирования наблюдалось снижение числа жизнеспособных клеток в 10 раз. При этом бактерии *P. putida* KT2442/pAL1 характеризовались и наибольшей эффективностью утилизации нафталина. Уже на 8 день концентрация нафталина в образце почвы с данными микроорганизмами снижалась до уровня контроля (почва без нафталина). В то же время образцы почвы с инокулированными штаммами *P. mendocina* PM2/pAL1 и *P. stutzeri* B975/pAL1 на 15 день культивирования содержали нафталин.

Таким образом, из приведенных данных, можно заключить, что наиболее оптимальными бактериальными хозяевами плазмиды pAL1 из всех исследованных штаммов являются бактерии *P. putida* KT2442, характеризующиеся высокой скоростью роста на плотной и в жидкой среде с нафталином, а также обеспечивающие полную деградацию нафталина в почве за 7 дней. Данные микроорганизмы можно рассматривать как потенциальный штамм-деструктор, который не только имеет положительную динамику роста в почвенной системе и эффективно деградирует нафталин, но и является потенциальным донором плазмиды pAL1 для переноса почвенным бактериям, повышая их адаптивный потенциал в условиях загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами.

Литература

1. Sayler G.S., Hooper S.W., Layton A.C. et al. Catabolic plasmids of environmental and ecological significance // *Microbiol. Ecol.*– 1990.– V.19.– P.1–20.
2. Top E., Springael D., Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters // *FEMS Microbiol. Ecol.*– 2002.– V.42.– P.199–208.
3. Dejonghe W., Goris J., El Fantroussi S. et al. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons // *Appl. Environ. Microbiol.*– 2000.– V.66.– P. 3297–3304.
4. Боронин А.М., Цой Т.В. Генетические системы биodeградации: организация и регуляция экспрессии // *Генетика.*– 1989.– Т.25.– С.581–594.

ВЫСОКИЕ ДОЗЫ «ИНАКТИВИРОВАННОГО» НИТРОПРУССИДА НАТРИЯ ИСКАЖАЮТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ВНУТРИКИШЕЧНОМ И ИНТРАТЕКАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

А.Г. Чумақ, К.М. Люзина, С.А. Руткевич, Т.В. Каравай
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Нитропруссид натрия, химический донор монооксида азота, удовлетворяющий критериям типичного ксенобиотика [1], широко применяется как в экспериментальных исследова-