

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS $\square$ *BRASSICACEARUM* БИМ В-446**

А.А. Муратова, Л.Н. Валентович

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
anya.muratova.93@mail.ru

Получение высокоэффективных бактериальных препаратов напрямую зависит от возможности направленно создавать штаммы, стимулирующие рост и развитие сельскохозяйственных растений, опираясь на знание о структуре и функционировании их геномов. Детальный молекулярно-генетический анализ обеспечивает возможность изучения механизмов синтеза первичных и вторичных метаболитов и создания штаммов с улучшенными свойствами для практического использования [1]. Эффективность изучения синтеза различных антимикробных веществ напрямую зависит от способности клеток бактерий воспринимать чужеродную генетическую информацию путем трансформации [2].

Целью настоящего исследования являлась оптимизация метода электропорации бактерий *P. $\square$ brassicacearum* БИМ В-446.

Объектом исследования являлись природные бактерии *P. $\square$ brassicacearum* БИМ В-446 – антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур. Исследованные бактерии выращивали в питательной среде LB с аэрацией (200 об/мин) при температуре 30 °С в течение 16 часов [3]. Для приготовления электрокомпетентных клеток использовали 300 $\square$ мМ раствор сахарозы, 3 $\square$ мМ раствор HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) [4] и дистиллированную воду.

В качестве стартового метода электропорации использовалась методика, предложенная в 1995 г. Cho J., Kim E. и So J. Для осуществления электрической трансформации штамма *P. $\square$ brassicacearum* БИМ В-446 компетентные клетки были приготовлены тремя различными методами. В первом случае после осаждения культуры проводили отмывку клеток раствором 3 $\square$ мМ HEPES, во втором – раствором 300 $\square$ мМ сахарозы, в третьем – в качестве отмывающего буфера использовали дистиллированную воду. Для проверки компетентности трех вариантов клеток использовали плазмиду pLS3063, которая стабильно наследуется в

бактериях рода *Pseudomonas*. В результате трансформации клеток *P. brassicacearum* БИМ В-446, обработанных 3 мМ раствором HEPES, было отобрано 680 трансформантов, несущих плазмиду pLS3063, при порации клеток, отмытых 300 мМ раствором сахарозы – 18 трансформантов, а при трансформации клеток, обработанных дистиллированной водой было отобрано только 4 клонa, несущих плазмиду pLS3063. Таким образом, было установлено, что для наиболее эффективной трансформации бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 подходит методика приготовления компетентных клеток с использованием в качестве отмывочного буфера раствор 3 мМ HEPES, что обеспечивает максимально возможный процесс переноса генетического материала.

1. Ligon, J.M. Genetically modified *Pseudomonas* strains with enhanced biocontrol activity / J.M. Ligon, D.S. Hill, S.T. Lam // Pat. 5756087. – Novartis Finance Corporation – 1999.

2. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable / M.W. Silby [et al.] // FEMS Microbiol Rev. FEMS Microbiol Rev. – 2011. – Vol. 35, No 4. – P. 652–680.

3. Epavier, A. Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture / A. Epavier, P. Lemanceau, C. Alabouvette // FEMS Microbiol. Ecol. – 1991. – Vol. 86. – P. 177–184.

4. Cho, J. Improved transformation of *Pseudomonas putida* KT2440 by electroporation / J. Cho, E. Kim, J. So // Biotechnol Tech. – 1995. – Vol. 9. – P.41–44.

OPTIMIZATION OF PREPARATIONS OF COMPETENT CELLS FOR ELECTROPORATION OF BACTERIA *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* BIM В-446

A.A. Muratova, L.N. Valentovich

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus*

anya.muratova.93@mail.ru

The effectiveness of studying the synthesis of various antimicrobial substances directly depends on the ability of bacterial cells to perceive heterogenous genetic information by transformation.

The purpose of this research was optimization of preparations of competent cells for electroporation method of bacteria *Pseudomonas*, which was proposed in 1995 by Cho J., Kim E. and So J. To implement the electric transformation of

P. brassicacearum strain BIM B-446, competent cells were prepared by three different methods. In the first case, after the culture precipitation, cells were washed with 3 mM HEPES solution, in the second case – with 300 mM sucrose solution, in the third case distilled water was used as washing buffer.

It was found that the most suitable method of preparation of competent cells is method using 3 mM HEPES solution as a washing buffer, which ensures the maximum possible transfer of genetic material.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ В КАЛЬЦИЙ-АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВЫХ ГРАНУЛАХ НА РОСТ И НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКАХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *VINCAMINORL*.

А.М. Наборовская, С.Н. Филиппова

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
ann_naborovs@mail.ru

Иммуобилизация является уникальным биотехнологическим приемом, который открывает широкие возможности для длительного субкультивирования культур клеток и тканей [1]. Соли альгиновой кислоты и хитозан являются наиболее часто применяемыми инкапсулирующими агентами. Хитозан, представляя собой положительно заряженный поликатионит, может реагировать с отрицательно заряженными молекулами альгината с образованием полиэлектролитных комплексов. В настоящее время в недостаточной степени изучено влияние хитозан-альгинатного носителя на физиолого-биохимические характеристики клеток культур лекарственных растений. Среди ценных лекарственных растений можно выделить *Vinca minor* L., в состав которого входят фармакологически ценные алкалоиды, а также широкий спектр фенольных соединений. В связи с этим целью настоящей работы являлось установление закономерностей влияния инкапсулирования клеток суспензионной культуры *V. minor* в Ca^{2+} -альгинат-хитозановых гранулах на ростовые параметры и содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов.

Процедуру иммобилизации клеток проводили согласно методике, описанной ранее с некоторыми изменениями [2]. Содержание суммы фенольных соединений анализировали на основе реакции комплексообразования с реактивом Фолина-Дениса [3]. Флавоноиды