

времени выращивания каждого из них. При этом в отличие от реципиентных бактерий клетки доноров содержат, как правило, не более двух мутаций и подвергаются воздействию мутагенного фактора в значительно меньшей степени. Помимо чисто технических неудобств, пониженная выживаемость реципиентных бактерий значительно снижает частоту образования рекомбинантного потомства и тем самым влечет за собой искажение результатов при картировании генов. Таким образом, скорость роста реципиентных бактерий является важным показателем их пригодности для использования в экспериментах по конъюгационному картированию. Как видно из рисунка, скорости роста бактерий «дикого» типа, донорного штамма SM326 (содержит мутацию *trpC*) и реципиентных бактерий AD3 (*ile1*, *phe1*, *orn1*, *his1*, *leu2*, *thr2*, *Nal^R*) практически не отличаются. Это свидетельствует об отсутствии множественных нарушений в геноме микроорганизмов после воздействия мутагенным фактором и подтверждает, что выбранные условия мутагенеза являются оптимальными.

В результате выполнения данной работы были оптимизированы условия мутагенеза, что позволило получить представительную коллекцию стабильных мутантных бактерий (в целом отобрано 26 различных мутаций), пригодных для использования в качестве реципиентных штаммов при картировании бактерий *P. mendocina* (табл. 2).

1. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
2. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Д. Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. М., 1984. С. 146.
3. Yanofsky C. // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 224. P. 783.
4. Adelberg E., Mandel M., Chen C. // Biochem. And Biophys. Res. Commun. 1965. Vol. 18. P. 788.
5. Mandel J., Greenberg J. // Biochem. And Biophys. Res. Commun. 1960. Vol. 3. P. 575.
6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., 1994. С. 333.

Поступила в редакцию 25.10.2002.

Светлана Леонидовна Василенко – младший научный сотрудник.

Наталья Павловна Максимова – кандидат биологических наук, заведующая кафедрой.

Марина Алексеевна Титок – кандидат биологических наук, доцент.

УДК 579.22:579.25

В.Е. МЯМИН, А.Г. ПЕСНЯКЕВИЧ, В.А. ПРОКУЛЕВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПУТИ УТИЛИЗАЦИИ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ*

The molecular study of phytopathogenic bacteria requires metabolites of the pectin utilization pathway. 2,5-Diketo-3-deoxygluconate (DKII) was purified through ion change column chromatography from the cultural liquid of a *kduD* mutant of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (strain P177). 2-Keto-3-deoxygluconate was prepared fermentatively by treatment of cultural liquid of P177 with 2,5-diketo-3-deoxygluconate dehydrogenase (crude cell extract of wild type *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 was used as enzyme preparation) and then purified the same way as DKII. Metabolites prepared by this method are useful for investigation of pathogenicity and virulence factors of phytopathogenic bacteria.

Большинство фитопатогенных и часть сапротрофных видов грамотрицательных бактерий способны разлагать и использовать в качестве источников углерода и энергии пектиновые вещества клеточных стенок растений. Для этих целей микроорганизмы используют действующий вне клетки комплекс пектолитических ферментов, разрушающих пектин до олигомеров различной длины. Полученные при таком гидролизе олигомеры здесь же, вне клетки, освобождаются от метильных групп и гидролизуются до дига-

* Авторы статьи – сотрудники кафедры микробиологии.



лактуроновых и галактуроновых кислот, которые и транспортируются в клетку. Внутриклеточные превращения дигалактуроновых кислот осуществляются в три этапа и приводят к образованию 2-кето-3-дезоксиглюконата, который и используется в метаболизме.

Как было показано при изучении фитопатогенных бактерий *Erwinia* [1], функционирование большинства генов, ответственных за продукцию и секрецию внеклеточных пектолитических комплексов, и генов внутриклеточного метаболизма пектиновых веществ подвержено влиянию промежуточных метаболитов, образующихся при утилизации пектина. Однако молекулярные механизмы такого влияния выяснены далеко не полностью, что связано в какой-то мере с ограниченным количеством экспериментов, в которых эти промежуточные метаболиты использовались в очищенном виде.

Данная работа посвящена получению и очистке 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата (ДК2) и 2-кето-3-дезоксиглюконата (КДГ) с использованием мутантных по гену *kduD* бактерий *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* 3-2 JN42 P177 (далее – *Eca* P177).

Результаты и их обсуждение

В ходе проводимых в лаборатории молекулярной генетики бактерий при кафедре микробиологии БГУ исследований нами были получены мутантные по гену *kduD* – одному из генов пути утилизации пектиновых веществ – бактерии *Eca* P177 [2]. Одной из особенностей этих бактерий при выращивании в средах, содержащих пектин или полигалактуроновою кислоту, является накопление в культуральной жидкости продуктов деградации дигалактуроновой кислоты. Общее количество этих веществ в культуральной жидкости бактерий, выращенных до стационарной фазы в минимальной среде с глицерином и 0,5 % полипектата натрия, определенное с использованием окисления углеводов периодатом и последующей реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу [3], составляло 8,5 μM /мл. Проведенная по [3] нисходящая хроматография на бумаге показала, что накапливающиеся углеводы представляют собой смесь 5-кето-4-деоксиуроната, 2-кето-3-дезоксиглюконата и 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата с преобладанием последнего из этих соединений. Это и послужило основанием для использования культуральной жидкости бактерий данного штамма для получения очищенных метаболитов.

Для разделения ДК1, ДК2 и КДГ использовали метод ионообменной хроматографии на анионообменной смоле Dowex 1 $\times$ 8 в формиатной форме, рекомендуемой для получения больших количеств этих метаболитов [3]. Как было показано в работах [3–5], при проведении элюции органическими растворителями в низкой концентрации с колонки элюируются ДК1 и КДГ, в то время как ДК2 остается сорбированным на смоле. С учетом этого и данных хроматографии на бумаге для получения ДК2 на колонку объемом 280 cm^3 нанесли 200 мл культуральной жидкости бактерий штамма *Eca* P177 и затем провели элюцию ступенчатым градиентом концентраций муравьиной кислоты (0,05 и 0,5 М) со скоростью 15 $\text{мл}/\text{cm}^2\cdot\text{ч}$ при 20 $^{\circ}\text{C}$. В отбираемых в процессе элюции фракциях (объем каждой фракции составлял 140 мл) с 16-й по 22-ю, с 25-й по 33-ю и с 37-й по 40-ю были выявлены реагирующие с периодатом-ТБК вещества (рис. 1).

Согласно [3] 1 М периодата окисляет 1 М ДК1, ДК2 и КДГ с образованием 1 М β -формилпирувата и время, в течение которого реакция завершается, составляет 20 мин. Однако скорость протекания данной реакции различна для каждой из этих кислот. Если для ДК1 и КДГ за 1 мин протекания реакции образуется 35–40 % β -формилпирувата от максимально возможного уровня, то для ДК2 – 96–97 %. Кроме того, в нулевой точке реакции ДК1 характеризовался образованием 26–28 %, а ДК2 и КДГ – 7–8 % β -формилпирувата от максимально возможного уровня. Опираясь на эти данные,

мы исследовали скорости образования β -формилпирувата при периодатном окислении для объединенных фракций 16–22, 25–33 и 37–40 (рис. 2). Было установлено, что в первых двух объемах находятся ДК1 и КДГ, а в последнем – ДК2, что также подтверждалось нисходящей хроматографией на бумаге. При проведении периодат-ТБК-реакции общее количество ДК2 в 560 мл объединенных фракций 37–40 было оценено как 1050 μM .

С целью концентрирования ДК2 было решено провести его переосаждение по [6] на такую же ионообменную смолу, но в колонке меньшего объема. Для этого из содержащего ДК2 раствора следовало удалить муравьиную кислоту, что можно было сделать путем ее экстракции кратным объемом диэтилового эфира по [7]. Следует отметить, что, поскольку растворимость в воде муравьиной кислоты выше, чем у эфира, для ее максимального удаления

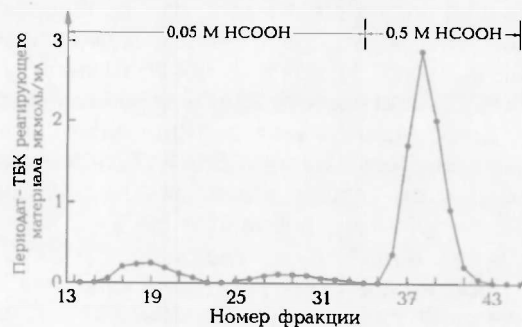


Рис. 1. Профиль элюции метаболитов, содержащихся в культуральной жидкости бактерий *Eca* P177

требовались большие количества диэтилового эфира, что делало такой путь неэкономичным. Поэтому, опираясь на данные [8], мы применили метод регенерации использованного эфира, для чего синтезировали палладиевый катализатор, в присутствии которого муравьиная кислота разлагается даже при комнатной температуре. Регенерированный таким образом эфир многократно использовали для экстракции муравьиной кислоты из водного раствора, что и позволило при минимальных затратах эфира в течение 16 этапов экстракции уменьшить концентрацию муравьиной кислоты с 0,48 до 0,025 мМ/мл без снижения концентрации ДК2. Освобожденный от муравьиной кислоты раствор (550 мл) наносили на колонку объемом 6,5 мл и затем проводили элюцию 1 М муравьиной кислотой. Определение количества ДК2 в отбираемых по 1 мл объединенных фракциях с 9 по 40 показало, что в 32 мл было получено 630 μM метаболита. Проведенная по описанной выше методике 40-кратная экстракция муравьиной кислоты диэтиловым эфиром позволила снизить ее концентрацию до 0,7 $\mu\text{M}/\text{мл}$ без уменьшения концентрации ДК2, что удовлетворяло требованиям, необходимым для дальнейшего использования раствора.

Следующим этапом работы было получение еще одного необходимого промежуточного метаболита внутриклеточного пути деградации пектиновых веществ – КДГ. Согласно [9] это соединение можно получить путем восстановления ДК2 в присутствии связанной с пиридиннуклеотидом 2,5-дикето-3-дезоксиглюконатдегидрогеназы (KduD). Поскольку нами уже установлено накопление значительных количеств ДК2 при культивировании мутантных по гену *kduD* бактерий *Eca* P177, было решено и для этих целей

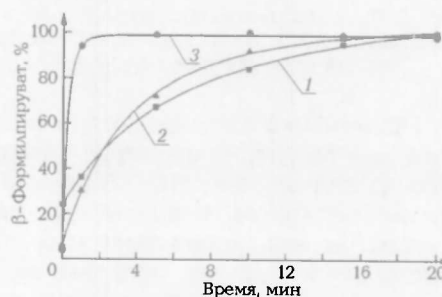


Рис. 2. Скорость окисления периодатом веществ, содержащихся во фракциях 16–22 (1), 25–33 (2) и 37–40 (3)

использовать не собственно очищенный ДК2, а такую же культуральную жидкость, в качестве же содержащего 2,5-дикето-3-дезоксиглюконатдегидрогеназу ферментативного препарата – экстракт клеток штамма *Eca* 3-2 JN42, выращенного для индукции синтеза KduD в жидкой питательной среде с полипектатом натрия. Основанием для такого выбора ферментативно-

го препарата послужили полученные нами ранее данные: клеточный экстракт при содержании белка 12,8 мг/мл имел специфическую активность фермента KduD 800 ед./мг белка (за единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 нМ НАДН за 1 мин).

Используемые для получения ферментативного препарата бактерии выращивали в условиях аэрации при +28 °С 20–24 ч. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 5000 об/мин и ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,0), содержащем НАД для стабилизации KduD. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе УЗНД-2Т при частоте 22 кГц двумя импульсами по 2 с.

Для осуществления реакции культуральную жидкость, отобранную после выращивания бактерий *Esa* P177 в минимальной среде с глицерином и полипектатом натрия, в равных объемах смешивали с 0,2 М фосфатным буфером (рН=7,0), добавляли НАДН и содержащий KduD препарат, а затем инкубировали полученную смесь при 28 °С.

После окончания реакции и удаления белка 200 мл реакционной смеси нанесли на колонку объемом 280 см³ с анионообменной смолой Dowex 1 x 8 в форматной форме и проводили элюцию муравьиной кислотой, отбирая фракции по 140 мл. Как видно из приведенных на рис. 3 данных, в полученных при элюции 0,05 М муравьиной кислотой фракциях с 14-й по 20-ю и с 23-й по 32-ю обнаруживались периодат-ТБК-реагирующие вещества. Дальнейшая элюция 0,5 М муравьиной кислотой показала наличие подобных веществ во фракциях с 36-й по 40-ю. Определение скорости окисления периодатом веществ, присутствующих в указанных фракциях, а также их подвижности при нисходящей бумажной хроматографии показало, что анализируемыми веществами в порядке их элюции являются ДК1, КДГ и ДК2. Количество КДГ в анализируемом объеме 1400 мл составило 720 мМ.

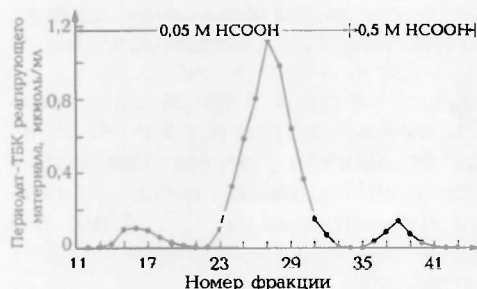


Рис. 3. Профиль элюции продуктов реакции, катализируемой 2,5-дикето-3-дезоксиглюконатдегидрогеназой бактерий *Esa* 3-2 JN42

Далее, по аналогии с методом концентрирования ДК2 была проведена 8-кратная экстракция диэтиловым эфиром и сорбция выделяемого вещества на колонку объемом 16 см³. После элюирования 1 М муравьиной кислотой было получено 25 мл раствора, содержащего 460 мМ КДГ. После снижения концентрации муравьиной кислоты путем 40-кратной экстракции диэтиловым эфиром данный препарат был использован в дальнейших исследованиях.

Применение полученных препаратов в экспериментах по изучению генетической регуляции факторов патогенности у бактерий *Erwinia carotovora* и *Erwinia chrysanthemi* [10–12] показало, что качество полученных таким образом препаратов позволяет выявить особенности экспрессии генов, участвующих во взаимодействии этих фитопатогенов с растениями-хозяевами. Поскольку и у других, обладающих пектолитическими свойствами фитопатогенных и сапротрофных бактерий промежуточные метаболиты пути утилизации пектиновых веществ могут играть роль регуляторов, использование таких препаратов для изучения их метаболизма может найти широкое применение.

В опубликованных до настоящего времени работах по изучению влияния промежуточных метаболитов пути утилизации пектина на экспрессию бактериальных генов использовались вещества, полученные либо с помощью ферментов бактериального происхождения, либо путем химической модификации углеводов без участия ферментов. Поскольку неферментативный

способ получения ДК2 и КДГ либо их аналогов [13] является более затратным и трудоемким, то большинство исследователей использовали клеточные экстракты или же очищенные ферменты бактерий. Исходными веществами в таких процессах служили глюкуроновая, альтроновая кислоты и 2,5-дикето-3-дезоксиглюконат для КДГ [3, 14–17], а для получения ДК2 – ненасыщенная дигалактуриновая кислота и 5-кето-4-дезоксигуранат [3–5, 16–18]. В большинстве описанных случаев в качестве субстратов использовали химически чистые продукты и очищенные препараты ферментов. Проведенное же нами получение промежуточных метаболитов пути утилизации пектинов не потребовало никаких существенных затрат на подготовительных этапах благодаря применению легко нарабатываемой культуральной жидкости бактерий *Esa* P177, клеточного экстракта бактерий *Esa* 3-2 JN42 и в качестве исходного вещества – доступного и относительно дешевого полипектата натрия.

1. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. Vol. 50. P. 213.
2. Мямин В.Е., Песнякевич А.Г. // Проблемы микробиологии и биотехнологии. Мн., 1998. С. 67.
3. Preiss J., Achwell G. // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238. P. 1571.
4. Collmer A., Bateman D.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. Vol. 78. P. 3920.
5. Condemine G., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J. // *J. Gen. Microbiol.* 1984. Vol. 130. P. 2839.
6. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985. С. 284.
7. Рабинович В. А., Хавин З. Я. Краткий химический справочник. Л., 1991.
8. Органикум: В 2 т. М., 1992. Т. 2. С. 415.
9. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J. // *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169. P. 1223.
10. Мямин В.Е., Песнякевич А.Г. // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия. Мн., 2000. С. 64.
11. Мямин В.Е., Песнякевич А.Г. // Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. М., 2001. С. 117.
12. Мямин В.Е., Песнякевич А.Г. // Микробиология и биотехнология XXI столетия. Мн., 2002. С. 141.
13. Nasser W., Condemine G., Anker D., Robert-Baudouy J. // *FEMS Microbiol. Letters.* 1991. Vol. 81. P. 73.
14. Pouyssegur J., Stoeber F. // *J. Bacteriol.* 1974. Vol. 117. P. 641.
15. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Quesnau Y., Robert-Baudouy J. // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. P. 663.
16. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J. // *J. Gen. Microbiol.* 1985. Vol. 131. P. 1205.
17. Moran F., Nasuno S., Starr P. // *Arch. of Bioch. and Bioph.* 1968. Vol. 25. P. 734.
18. Chatterje A. K., Thurn K., Tyrell I. // *J. Bacteriol.* 1985. Vol. 162. P. 708.

Поступила в редакцию 07.10.2002.

Владислав Евгеньевич Мямин – ассистент.

Александр Георгиевич Песнякевич – кандидат биологических наук, доцент.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой.

УДК 595.33:502.4 (476)

Л.Л. НАГОРСКАЯ, М.Д. МОРОЗ

РАКУШКОВЫЕ РАКИ (*CRUSTACEA: OSTRACODA*) ОЗЕР БЕРЕЗИНСКОГО БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА*

The fauna of ostracods from 7 lakes of the Berezina Biosphere Reserve was studied. The 9 species were found belonging to 4 families: *Candonidae* – 4 species and juveniles of genus *Pseudocandona*; *Notodromadidae* – 1, *Cyprididae* – 2 and *Lymnocytheridae* – 2 species. Species diversity indices of ostracods inhabited shallow, swamped, «macrophyte type» – lakes in the reserve, was the least of ones for other water bodies types in Belarus. According to species ecological patterns we used indicator species for the comparing of hydrochemical conditions in the lakes. We gave the vector of processes for some lakes as well.

* Авторы статьи – сотрудники Института зоологии НАН Беларуси.

