

ности прудов и плотности зарыбления от 1 до 8 тыс. экз./га проявляется тенденция к возрастанию биомассы зообентоса. При адекватном комплексе интенсификационных мероприятий пресс выедания зообентоса двухлетними карпами в широком интервале плотностей зарыбления нагульных прудов не оказывал угнетающего действия на его развитие.

В прудах с различным режимом эксплуатации доля бактерий от суммарной биомассы бактерий и зообентоса составляла в среднем от 61 до 88 %, что свидетельствует как об активности микробиальных процессов, так и о стабильности донного биоценоза исследуемых прудов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hall K., Kleiber P., Yesaki I.—Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 1972, v. 29. Suppl., p. 441.
2. Hayes F.—Intern. Verein Limnol., Stuttgart, 1955, Bd. 12, S. 111.
3. Антипчук А. Ф.—Гидробиол. ж., 1972, т. 8, № 2, с. 63.
4. Шпет Г. И., Харитонов А. Ф., Антипчук А. Ф., Бешлей Т. Г.—Матем. всеююз. совещ.: Применение минеральных удобрений в рыбоводных прудах. Киев, 1969, с. 17.
5. Наумова А. Н.—В кн.: Микробиология почвы и удобрения. М., 1933, вып. 108, с. 115.
6. Драбкова В. Г. Зональное изменение интенсивности микробиологических процессов в озерах.—Л., 1981.
7. Niewiadomska-Krüger D.—Pol. arch. hydrobiol., 1971, v. 18, N 2, p. 119.
8. Кузнецов Е. А.—Сб. науч. трудов ВНИИПРХ, 1979, вып. 26, с. 207.
9. Хабибуллин Э. Т., Ляхнович В. П.—В кн.: Основы биопродуктивности внутренних водоемов Прибалтики. Вильнюс, 1975, с. 314.
10. Воронова Г. П., Ляхнович В. П.—Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2, хим., биол., геогр., 1984, № 3, с. 32.
11. Головнев В. И., Ляхнович В. П., Астапович И. Т.—19-ая науч. конф. по изучению и освоению водоемов Прибалтики и Белоруссии: Тез. док. Минск, 1977, с. 35.

УДК 576.8.095.5

С. С. ТРИБУШ, К. М. БЕЛЯВСКИЙ

КОНЪЮГАЦИОННЫЙ ПЕРЕНОС F'-ПЛАЗМИД В СИСТЕМЕ E. COLI-PSEUDOMONAS

Наличие у *E. coli* K-12 F-фактора, детерминирующего донорскую способность бактерий, предоставляет возможность получения F'-плазмид, содержащих в автономном от хромосомы состоянии F-фактор и участок хромосомы различной длины. Такие генетические структуры, способные к конъюгационному переносу в бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, могут служить инструментом в решении многих проблем, связанных с передачей чужеродной генетической информации в неродственные бактерии, и ее выражением в новом хозяине.

Для решения ряда теоретических и практических задач представляется перспективным осуществление передачи F'-плазмид *E. coli* другим бактериям, в том числе псевдомонадам. В частности, такого рода исследования необходимы для изучения системы рестрикции ДНК *E. coli* K-12 и механизмов стабилизации чужеродной генетической информации в бактериях *Pseudomonas*. Имеющиеся в литературе данные о передаче и выражении генов между *E. coli* и *Pseudomonas* [1—3] доказывают принципиальную возможность преодоления таксономических барьеров между этими семействами при конъюгации. Экспериментальное осуществление такого рода работ затрудняется в связи с отсутствием систем переноса генов и с невозможностью поддержания достаточной стабильности переданных структур в клетках.

Исходя из изложенного, целью данной работы являлось изучение возможных путей конъюгационного переноса F'-плазмид *E. coli* K-12 в бактерии *Pseudomonas*.

Материал и методика

Бактерии и бактериофаги. В работе использовались штаммы *E. coli* K-12 (табл. 1), а также бактерии рода *Pseudomonas* из коллекции Проблемной НИЛ экспериментальной биологии Белгосуниверситета имени В. И. Ленина: 16 штаммов *Ps. aeruginosa*, 13 штаммов *Ps. fluorescens*, 8 штаммов *Ps. putida*, 61 штамм 36 видов *Pseudomonas* и 503 штамма, выделенные из природных источников и идентифицированные до рода *Pseudomonas*. Штамм *E. coli* K-12 AB51-11/F_{ts} lac⁺ (Tn10) любезно предоставлен доктором биологических наук Г. Б. Смирновым (НИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи, Москва). Применялись бактериофаги PRR1 и Q_φ.

Среды. Использовали жидкие и агаризованные полноценные питательные среды, приготовленные на основе аминокислот. Синтетические среды, буферные растворы, ЕМВ-агар, фаговый бульон и 0,7 %-ный фаговый агар готовили по [4, 5].

Методы. Приготовление бактериальных культур и фаголизатов, обработку бактерий акридиновым оранжевым осуществляли, согласно руководствам [4, 5]. Чувствительность клеток к бактериофагам определяли спот-тестом [5], а также методом двойных агаровых слоев [6]. Скрещивание бактерий проводили по [4, 7]. Для получения ауксотрофных мутантов бактерий рода *Pseudomonas* выращенную в полноценной питательной среде культуру бактерий в логарифмической фазе роста дважды центрифугировали, отмывали равным объемом 0,1 М цитратного буфера (рН 5,5) и обрабатывали нитрозометилмочевинной в концентрации 300 мкг/мл в течение 24 часов при 28 °С с аэрацией. Затем бактериальную культуру дважды центрифугировали, отмывали от мутагена фосфатным буфером (рН 7,2) и культивировали 18—24 ч при 28 °С в полноценной среде. Обогащение клеточной суспензии ауксотрофными мутантами проводили по [5].

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *E. coli* K-12

Штамм	Характеристика	Источник получения
C600	thr leu thi lac Str ^s	Коллекция лаборатории То же » »
C600/RP4	thr leu thi lac Str ^s /Tc ^r Km ^r Ap ^r	
W1655/F ⁺ lac ⁺	met Str ^s /lac ⁺	
J62	pro trp his lac Str ^r	
AB2463/F ⁺ 104	thr leu pro his arg thi lac gal mtl xyl recA Str ^r /thr ⁺ leu ⁺ pro ⁺	НИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи (Москва) Получены нами То же » »
JC1553/F ⁺ 131	his met arg leu lac mtl recA Str ^r /his ⁺ supD	
AB51-11/F _{ts} lac ⁺ (Tn10)	met arg recA Str ^r /T ^s lac ⁺ Tc ^r	
J62/F ⁺ lac ⁺	pro trp his lac Str ^r /lac ⁺	
J62/F ⁺ lac ⁺ , RP4	pro trp his lac Str ^r /lac ⁺ , Tc ^r Km ^r Ap ^r	» » »
J62/F ⁺ 104	pro trp his lac Str ^r /thr ⁺ leu ⁺ pro ⁺	
J62/F ⁺ 104, RP4	pro trp his lac Str ^r /thr ⁺ leu ⁺ pro ⁺ , Tc ^r Km ^r Ap ^r	

Результаты и их обсуждение

Для изучения конъюгационного переноса F'-плазмид от *E. coli* K-12 бактериям рода *Pseudomonas* первоначально была выбрана плазида F⁺lac⁺. Это обуславливалось прежде всего природной неспособностью исследуемых штаммов псевдомонад утилизировать лактозу в качестве источника углерода и энергии, что позволяет осуществлять отбор транс-

конъюгантов, воспринявших F'-плазмиду, без дополнительного генетического маркирования реципиентных бактерий. Кроме того, использование индикаторной среды ЕМВ для отбора Lac⁺ клеток *Pseudomonas* позволяет контролировать продолжительность выражения lac-оперона F'lac⁺-плазмиды в потомстве трансконъюгантов.

Конъюгационный перенос плазмиды F'lac⁺ от *E. coli* K-12 J62 в 601 реципиентный штамм *Pseudomonas* не осуществлялся с частотой большей, чем 10⁻⁸ на 1 донорскую клетку, судя по образованию Lac⁺ трансконъюгантов. В дальнейшем была осуществлена попытка опосредованной плазмидой RP4 передачи плазмиды F'lac⁺ в гетерологичных скрещиваниях, поскольку известна способность плазмиды RP4 мобилизовать некоторые неконъюгативные плазмиды [8]. С этой целью получен штамм *E. coli* K-12 J62, стабильно наследующий в автономном состоянии одновременно плазмиды RP4 и F'lac⁺. Донорские клетки *E. coli* K-12 J62 (RP4, F'lac⁺) в скрещиваниях с F⁻-реципиентными бактериями *E. coli* K-12 C600 передавали плазмиду F'lac⁺ с частотой 6·10⁻⁴, а плазмиду RP4 — с частотой 3·10⁻⁵. Вероятность одновременного выявления в трансконъюгантах маркеров обеих плазмид равна частоте передачи плазмиды RP4.

Таблица 2

Распределение реципиентных бактерий *Pseudomonas* по частоте восприятия F'lac⁺ и RP4 плазмид от *E. coli* K-12 J62

Фенотип трансконъюгантов	Число штаммов, воспринимающих плазмиду с частотой		
	10 ⁻³ — 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ — 10 ⁻⁶	10 ⁻⁷ — 10 ⁻⁸
Lac ⁺	2	9	0
Tc ^r Lac ⁺	6	17	17

В гетерологичных скрещиваниях донорских клеток *E. coli* K-12 J62 (RP4, F'lac⁺) и бактерий рода *Pseudomonas* использовались 106 реципиентных штаммов, способных воспринимать плазмиду RP4 от *E. coli* K-12 с частотой 10⁻³—10⁻⁶ на 1 донорскую клетку. В результате получены Lac⁺ и Tc^rLac⁺ трансконъюганты, что свидетельствует о передаче реципиентным клеткам *Pseudomonas* плазмид F'lac⁺ и RP4 (табл. 2). Как видно из представленных данных, частота формирования Lac⁺-трансконъюгантов зависит от используемого реципиента. Однако внутри одного и того же вида разные штаммы практически не отличались по способности воспринимать F'lac⁺ от донорских бактерий *E. coli*. В дальнейших экспериментах для изучения мобилизующей роли RP4 в отношении переноса плазмиды F'lac⁺ в гетерологичных скрещиваниях *E. coli* K-12 x *Pseudomonas* нами использовался один штамм дикого типа *Pseudomonas* sp. 256 и его ауксотрофный мутант *Pseudomonas* sp. 256-54 (pro, leu). В скрещиваниях *E. coli* K-12 J62/F'lac⁺, RP4 со штаммом дикого типа и его мутантом трансконъюганты Tc^r выявлялись с частотой 10⁻², трансконъюганты Tc^rLac⁺ — с частотой 10⁻³, а трансконъюганты Lac⁺ — с частотой 10⁻⁶—10⁻⁷. Особенностью отобранных на селективной среде трансконъюгантов Lac⁺ и Tc^rLac⁺ этих скрещиваний является утрата ими способности к росту на той же селективной среде в результате многократных пересевов. Наблюдение за ростом Lac⁺ и Tc^rLac⁺ трансконъюгантов на селективной среде с тетрациклином и лактозой в течение 1—2 пересевов позволило установить ряд закономерностей.

1. Трансконъюганты Tc^rLac⁺ приобретают чувствительность к специфическому для содержащих плазмиду RP4 бактерий фагу PRR1, сохраняют все плазмидные маркеры RP4 и ее конъюгативность в скрещиваниях с *E. coli* K-12 J62.

2. Трансконъюганты Lac^+ и Tc^rLac^+ не чувствительны к F-специфическому бактериофагу Q_β и не передают lac^+ маркер в скрещиваниях с *E. coli* K-12 J62.

3. Трансконъюганты Lac^+ и Tc^rLac^+ на среде ЕМВ с лактозой формируют темно-розовые без металлического блеска колонии и отличаются от колоний Lac^+ клеток *E. coli* K-12 и колоний Lac^- клеток *Pseudomonas*.

4. У трансконъюгантов Lac^+ и Tc^rLac^+ не выявляются стабильные Lac^+ клоны.

Возможной причиной наблюдаемой нестабильности трансконъюгантов Lac^+ скрещивания *E. coli* K-12 и *Pseudomonas* может быть «слабое» выражение в клетках псевдомонад генов lac -оперона, как это показано для *Ps. putida* [9]. Поэтому в следующей серии экспериментов использовалась производная этой плазмиды $F'_{\text{ts}} \text{lac}^+$ (Tn 10), содержащая дополнительно транспозон, детерминирующий устойчивость к тетрациклину, что позволяло контролировать перенос и экспрессию плазмиды с использованием антибиотика. В скрещивании донора *E. coli* K-12 AB51-11/ $F'_{\text{ts}} \text{lac}^+$ (Tn 10) и реципиента *Pseudomonas* sp. 256-54 Tc^r трансконъюганты формировались с частотой до 10^{-7} .

Уровни их резистентности к тетрациклину находились в пределах 80—200 мкг/мл (клетки реципиента были чувствительны к 20 мкг/мл этого антибиотика). Все без исключения Tc^r -трансконъюганты не наследовали lac^+ -маркер плазмиды F'_{lac^+} (судя по неспособности к росту на минимальной среде с лактозой и по отсутствию способности к ферментации лактозы на ЕМВ-агаре), а также были нечувствительны к F-специфическому бактериофагу Q_β . Маркер тетрациклинрезистентности не элиминировался из трансконъюгантов после обработки акридиновым оранжевым и не передавался ими реципиентам *E. coli* K-12 J62 и *Pseudomonas* sp. 256—56 (pro, leu, Str^r). Перечисленные свойства Tc^r трансконъюгантов позволяют предполагать, что они возникли в результате транслокации транспозона Tn10 из плазмиды в хромосому клеток *Pseudomonas* и последующей утраты переданной F-плазмиды.

Наряду с плазмидой F'_{lac^+} исследована передача и некоторых других F'-плазмид от *E. coli* K-12 бактериям *Pseudomonas*. В экспериментах с реципиентом *Pseudomonas* sp. 256-54 не был выявлен перенос как плазмиды F'_{104} , так и ее совместный перенос с плазмидой RP4. Также не был обнаружен перенос плазмиды F'_{104} от *E. coli* K-12 в ауксотрофные по треонину, лейцину или пролину мутанты 8 штаммов *Ps. aeruginosa* (B-2, B-4, B-5, B-6, B-7, B-9, B-10, B-12), 3 штаммов *Ps. fluorescens* (B-23, B-25, B-29) и 3-х штаммов *Ps. putida* (B-21, B-37, B-40). Кроме того, не установлен перенос плазмиды F'_{131} от *E. coli* K-12 в зависимые по гистидину мутанты 4 штаммов *Ps. aeruginosa* (B-4, B-7, B-9, B-10), штамма *Ps. fluorescens* B-25 и штамма *Ps. putida* B-37.

Наблюдаемая в предыдущей серии экспериментов нестабильность трансконъюгантов Tc^rLac^+ и невозможность конъюгационного переноса ряда F'-плазмид в гетерологичной системе *E. coli* K-12 — *Pseudomonas*, по-видимому, обуславливается влиянием реципиентных клеток на чужеродную ДНК. В пользу этого свидетельствуют данные некоторых авторов о возможности переноса «нетрансмиссивных» плазмид в условиях временной инактивации системы рестрикции реципиента [10—12]. Такая инактивация системы рестрикции, например, для бактерий *Ps. aeruginosa* осуществляется кратковременным культивированием их при 43 °C [10].

Чтобы оценить влияние этого феномена на выход трансконъюгантов в системе скрещивания *E. coli* K-12 — *Pseudomonas*, были повторены эксперименты по передаче плазмиды F'_{lac^+} от *E. coli* K-12W1655 стрептомицинрезистентному варианту штамма *Pseudomonas* sp. 256-56 с предварительным прогреванием реципиентных бактерий при 52 °C в течение различных промежутков времени. В результате установлено, что наи-

большая частота Lac⁺-трансконъюгантов ($5 \cdot 10^{-6}$) наблюдается при 3—4-минутной обработке реципиентных клеток, что свидетельствует в пользу предположения о роли системы рестрикции в наследовании F' плазмид, переданных бактериям *Pseudomonas* от *E. coli*. Однако полученные трансконъюганты утрачивали стабильность наследования плазмиды после двух расщепов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности конъюгационного переноса плазмиды F'lac⁺ клеток *E. coli* K-12 в бактерии *Pseudomonas* и в то же время — о крайне нестабильном наследовании их в новом хозяине.

Выводы

1. Показана возможность мобилизации RP4 плазмидой конъюгационного переноса F'lac⁺ в бактерии *Pseudomonas*, способные с высокой частотой воспринимать плазмиду RP4.

2. Обнаружен перенос плазмиды F'lac⁺ в системе скрещивания *E. coli* K-12 — *Pseudomonas* после предварительного культивирования реципиентных клеток при повышенной температуре, экспериментально подобранный оптимум которого для штамма *Pseudomonas* sp. 256-56 составляет 3—4 мин при 52 °C.

3. Особенностью поведения F'lac⁺ плазмиды в клетках исследованных бактерий *Pseudomonas* является нестабильность ее наследования, что может быть использовано для введения в хромосому реципиентов различных транспозонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Datta N., Hedges R.— *J. Gen. Microbiol.*, 1972, v. 70, p. 453—460.
2. Mergeay M., Gerits J.— *J. Bacteriol.*, 1978, v. 135, 1, p. 18—28.
3. Mergeay M., Bogen A., Ugrain C., Hansdorff N.— *J. Bacteriol.*, 1978, v. 136, 3, p. 1187—1188.
4. Клаус Р., Хейс У.— Сборник методик по генетике микроорганизмов. М., 1970.
5. Миллер Дж.— Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
6. Gratia A.— *Ann. Inst. Pasteur.* 1936, v. 57, p. 652—694.
7. Chandler P., Krishnapillai V.— *Genet. Res.*, 1974, v. 23, 3, p. 239—250.
8. Willetts N., Crowther C.— *Genet. Res.*, 1981, v. 37, 3, p. 311—316.
9. Baumberg S., Cornelis G., Panagiotakopoulos M., Roberts M.— *J. Gen. Microbiol.*, 1980, v. 119, p. 257—262.
10. Rolfe B., Holloway B.— *J. Bacteriol.*, 1966, v. 92, 1, p. 43—48.
11. Bradley D., Choen D.— *J. Gen. Microbiol.*, 1976, v. 97, 1, p. 91—103.
12. Cornelis G., Colson C.— *J. Gen. Microbiol.*, 1975, v. 87, 2, p. 285—291.

УДК 577.472(28)

В. А. БАБИЦКИЙ, Г. А. ИНКИНА, Т. А. МАКАРЕВИЧ,
Р. З. КОВАЛЕВСКАЯ, Р. А. ДЕРЕНГОВСКАЯ

ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКИ ПАЛЯВААМ (Чукотка)

Сообщение 2. Бактериофлора, водоросли и фауна перифитона

Разработка мероприятий по рациональному использованию биологических ресурсов северных рек признана важнейшей задачей ближайшей и долгосрочной перспективы [1]. В этих условиях гидроэкологические исследования приобретают важнейшее значение, поскольку всякая деятельность по освоению Севера не может планироваться без экологически обоснованных норм поступления в водотоки загрязняющих веществ.

В предыдущем сообщении [2] приведены сведения о методах и принятых при расчетах предположениях. Дана характеристика распределения сухого органического вещества перифитона и его сольности на разных станциях в реке и в двух ее притоках: руч. Кукэвеемкей, подверженном антропогенному воздействию, и чистом руч. Двойной.

В предлагаемой работе исследуется состав и развитие фито- и зооперифитона, а также бактериоперифитона на изученном участке реки.