

данных методов цитогенетического анализа для разработки методических подходов и принципов составления хромосомных паспортов.

C- and Ag-NOR-staining techniques, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and RAPD-PCR analysis were used to study karyotypes of four varieties and two lines of pea. It was shown that these comparative cytogenetic analysis methods were rather perspective for the development of methodical approaches and principles of making chromosome passports.

ТИТОК М.А., ЧЕРНОВА А.И., ПУНТУС И.Ф., ВАСИЛЕНКО С.Л., ХАМЗА Ф.Д.
Белорусский государственный университет,
Беларусь, 220030, Минск, пр-т Независимости, 4, e-mail: titok@bsu.by

ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Ароматические углеводороды попадающие в природную среду обитания в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также содержащиеся в выхлопных газах автомобилей, представляют серьезную опасность для всех звеньев естественных биоценозов, приводя к их изменению или полной трансформации. По химической природе их можно разделить на моноароматические (бензол, толуол, ксилол и др.) и полиароматические (нафталин, антрацен, фенантрен, бифенилы, пирен, бенз(а)пирен, дибенз(а)пирен, перилен и др.). Следует отметить, что промежуточным продуктом окисления некоторых моно- и полициклических ароматических углеводородов (например, бензола, толуола, ксилола, нафталина, фенантрена) является катехол и его производные, вследствие чего полная деградация этих соединений может происходить с участием одних и тех же ферментных комплексов. Основная роль в утилизации ароматических углеводородов в природной среде обитания принадлежит микроорганизмам. Большим метаболическим потенциалом в отношении этих соединений обладают бактерии рода *Pseudomonas*, способные к их полной или частичной трансформации. Кроме того, представители этой таксономической группы характеризуются широким спектром метаболических реакций и способны утилизировать целый ряд органических субстратов. Изучение организации природных штаммов-деструкторов является основой, позволяющей целенаправленно создавать эффективные биологические средства очистки окружающей среды от органических соединений.

Целью настоящей работы явилось изучение физиологических свойств и структурно-функциональной организации систем биodeградации у природных нафталинутилизирующих бактерий.

Материалы и методы

В работе использовали 102 штамма природных нафталинутилизирующих бактерий *Pseudomonas*, а также типовые штаммы *Pseudomonas* (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов и Вирусов, Москва, Россия) и типовые плазмиды группы IncP-9 и IncP-7 (коллекция кафедры генетики БГУ).

Среды. Бактерии выращивали в минимальной среде М9 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В качестве источника углерода и энергии использовали: глюкозу в концентрации 0,2 %, бромнафталин – 1 %. Нафталин, м-ксилол, о-ксилол, п-ксилол, керосин, дизельное топливо, бензиловый спирт, гексадекан наносили на крышку чашки Петри. Толуол и бензол вносили путем помещения на крышку чашки Петри запаянного с одного конца пластикового наконечника, содержащего 200 мкл одного из этих

соединений. Фенантрен, антрацен и нефть вносили в 3 мл минимальной жидкой среды по 5 мг.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозилового метода [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex Taq™ (Япония).

Для амплификации генов большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы (*nahAc*) и салицилат-1-гидроксилазы (*nahG*), а также *rep*-генов плазмид IncP-7 и IncP-9 использовали олигонуклеотидные праймеры при режимах амплификации, предложенных в работах [Ошибка! Источник ссылки не найден.3-5]Ошибка! Источник ссылки не найден..

Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью ферментов *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* в условиях, рекомендованных фирмой изготовителем (Fermentas, Литва). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали синтетические DNA Ladder Mix и 100-bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Электрофоретический анализ проводили согласно [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Модельные почвенные системы готовили согласно описанию, приведенному в работе [6].

Определение активности ферментов проводили в бесклеточных экстрактах на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Активность нафталиндиоксигеназы, салицилатгидролазы, катехол-2,3-диоксигеназы и катехол-1,2-диоксигеназы определяли согласно методами, описанными в работе [6]. Удельную активность ферментов выражали в наномолях потребленного кофактора или образующегося продукта в минуту на 1 мг общего клеточного белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически [6].

Результаты и обсуждение

Для отбора наиболее перспективных штаммов-деструкторов использовали два критерия. Первый касался показателей скорости роста в среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин. Второй – способности утилизировать спектр органических субстратов. В частности, исследовались полициклические (антрацен и фенантрен, пирен), моноциклические (бензол, толуол, ксилол и их производные), ациклические углеводороды (октан), являющиеся компонентами сырой нефти, а также продукты нефтепереработки (гексадекан, дизельное топливо, керосин) и некоторые другие ксенобиотики (бромнафталин, бензиловый спирт, камфора). Предполагалось, что показатель скорости роста может быть напрямую или косвенно связан с физиологическими особенностями организации изолированных микроорганизмов. В частности, он может быть обусловлен способностью генов биодegradации эффективно экспрессироваться в определенном генетическом окружении, а также зависеть от времени клеточного цикла, в ходе которого происходит удвоение и распределение генетического материала между дочерними клетками, в том числе и внехромосомного происхождения. Второй параметр характеризует метаболический потенциал изолированных бактерий.

Показателем скорости роста в среде с нафталином служило время, необходимое бактериальной популяции для достижения стационарной фазы роста (исходная концентрация бактерий составляла 10^3 кл/мл). На основании полученных данных природные нафталинутилизирующие бактерии были условно разделены на три группы: бактерии первой группы достигали стационарной фазы роста через 48 часов культивирования (57 штаммов), второй – через 72 часа (30 штаммов) и третьей – через 96 часов (24 штамма)

На следующем этапе работы с использованием метода жидкостной хроматографии была изучена динамика изменения концентрации нафталина в

модельной почвенной системе в процессе культивирования в ней бактерий группы I и III. Для этого использовалась стерильная почва с нафталином в концентрации 2 г/кг, в которую вносили нафталинутилизирующие бактерии в концентрации $10^3 - 10^4$ кл/мл. В результате было установлено, что присутствие в почве нафталинутилизирующих бактерий штамма NL19 (группа I) и NL32 (группа III) обеспечивало достоверное снижение концентрации нафталина, хотя его уменьшение наблюдалось и в отсутствие микроорганизмов (за счет испарения). При этом, через 7 дней количество нафталина в почве в присутствии бактерий штамма NL19 (группа I) снизилось до уровня отрицательного контроля, в то время как бактерии штамма NL32 (группа III) не обеспечивали полную деградацию нафталина через 21 день

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что физиологические параметры роста природных бактерий в среде с нафталином коррелируют с их способностью деградировать нафталин в модельной почвенной системе и могут быть использованы в качестве критерия для первичной характеристики штаммов-деструкторов

В результате анализа природных нафталинутилизирующих бактерий на способность утилизировать органические субстраты было выявлено 9 штаммов, способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии от восьми до двенадцати соединений, 64 штамма – от трех до семи соединений, а 7 штаммов – не обладали дополнительными биодegradационными возможностями. Следует отметить, что ряд штаммов, обладающих широким спектром утилизации органических соединений, характеризовались относительно высокой эффективностью утилизации нафталина (в частности, штаммы AL1, AL21, NL21, NL26 и NL61 отнесены к группе I).

Для дальнейшей характеристики были использованы штаммы, отнесенные на основании скорости роста в среде с нафталином к группе I.

С использованием техники полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом продуктов амплификации были идентифицированы внехромосомные генетические элементы. Установлено, что в клетках природных нафталинутилизирующих бактерий присутствуют плазмиды группы IncP-9, представленные δ - (19 штаммов), ζ - (4 штамма) и ι -подгруппой (23 штамма), а также внехромосомные генетические элементы группы IncP-7 (4 штамма). Для 7 штаммов плазмиды не были выявлены.

Проведен рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, обеспечивающих синтез ключевых ферментов катаболизма нафталина. Установлено, что природные репликоны содержат уникальные сочетания генов *nahAc* и *nahG*, что может свидетельствовать о сопряженном характере изменения нуклеотидных последовательностей данных генетических детерминант.

На следующем этапе была изучена активность ключевых ферментов катаболизма нафталина, а именно нафталиндиоксигеназы (НО), салицилатидроксилазы (СГ), катехол-2,3-диоксигеназы (K2,3O) и катехол-1,2-диоксигеназы (K1,2O).

Выбор штаммов для анализа активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина был продиктован результатами предыдущих исследований. Представлялось важным установить наличие связи между активностью ферментов и скоростью роста на среде с нафталином (сравнить штаммы I, II и III группы), выяснить зависит ли активность ферментов от типов генов *nahAc* и *nahG* и, наконец, охарактеризовать детерминанты плазмидного (НО, СГ, K2,3O) и хромосомного (K1,2O) происхождения.

Анализ активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина (при использовании салицилата в качестве индуктора) позволил сделать следующие выводы.

Активность ключевых ферментов метаболизма нафталина не коррелирует со скоростью роста бактерий в среде с нафталином. Например, активность нафталиндиоксигеназы (НО) у штаммов I группы варьировала от 13,8 до 170,0

нмоль/(мин мг белка), у штаммов II и III группы от 22,7 до 172,9 нмоль/(мин мг белка). Такая же картина наблюдалась для салицилатгидроксилазы (СГ), активность которой у штаммов I группы варьировала от 2,5 до 79,3 нмоль/(мин мг белка), а у штаммов II и III группы определялась в интервале от 3,2 до 103,3 нмоль/(мин мг белка). Полученные данные позволяют предположить, что физиологические параметры роста бактерий в среде с нафталином зависят в большей степени от особенностей клеточного цикла (скорости деления клеток) и не связаны с эффективностью экспрессии генов, детерминирующих метаболизм нафталина. Тем не менее, использование в качестве штаммов-деструкторов бактерий I группы является предпочтительным, поскольку по сравнению с бактериями группы II и III они могут обладать селективным преимуществом при попадании в среду, содержащую ПАУ. Быстрое увеличение численности бактериальной популяции, обусловленное особенностями клеточного цикла, может обеспечить бактериям I группы большую конкурентоспособность в борьбе за выживание в сложившихся микробиоценозах.

Активность ключевых ферментов метаболизма не связана с типами генов *nahAc* и *nahG*. Бактерии, имеющие одинаковые комбинации данных детерминант обладают разной активностью (например для типа C18-V1/ pDTG1 активность НО составляла от 28,5 до 172,9 нмоль/(мин мг белка), а СГ – от 4,2 до 103,3 нмоль/(мин мг белка)).

Оптимальная комбинация хозяин-плазмида предполагает выбор плазмиды, содержащей детерминанты, обеспечивающие синтез ферментов (НО, СГ, K2,3O) с высокой ферментативной активностью и бактерий-хозяев, обладающих высокой скоростью роста на среде с нафталином (группа I), способных утилизировать широкий спектр органических субстратов и характеризующихся высокой активностью K1,2O. Анализируя полученные результаты можно полагать, что для конструирования эффективных штаммов-деструкторов предпочтительным является использование плазмид pNL4, pNL61 и pAL1. В качестве бактерий хозяев можно использовать штаммы NL21, NL26, NL61, AL1, AL21, характеризующиеся высокой скоростью роста в среде с нафталином (группа I), относительно высоким уровнем ферментативных активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина и способные утилизировать достаточно широкий спектр органических субстратов

Работа выполнена при финансовой поддержке, гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б08Р-102 и задания 1.08 ГППИ «Новые биотехнологии».

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. 1984.- 480с.
2. *te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D.* Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1986.- vol. 8, № 8.- P.2541-2545.
3. *Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat L. et al.* Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environm. Microbiol.- 2002.- vol. 68, № 2.- P.957–962.
4. *Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л.* и др. Разнообразие генетических систем биодegradации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология.- 2005.- vol. 74, № 1.- P.60–68.
5. *Василенко С.Л., Титок М.А.* Особенности наследования плазмид биодegradации в клетках гомо- и гетерологичных хозяев // Микробиология.- 2008.- Т. 77, № 1.- С.21–28.
6. *Волкова О.В., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф.* и др. Влияние плазмид биодegradации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* // Прикладная биохим. и микробиол.- 2005.- Т. 41, № 5.- С.525-529.

Резюме

На основании результатов проведенного исследования предложены критерии для отбора эффективных штаммов деструкторов ПАУ, учитывающие скорость роста

бактерий в среде с нафталином, способность утилизировать органические субстраты и обладающие высокими активностями ключевых ферментов метаболизма нафталина.

On the basis of results of the conducted research, criteria for selection of effective strains that degrade PAH are offered, considering the growth rate with naphthalene as a sole source of carbon and energy, ability to utilise organic substrates and high activity of the key ferments of naphthalene metabolism.

На підставі результатів проведеного дослідження запропоновані критерії для відбору ефективних штамів деструкцій ПАВ, що враховують швидкість росту бактерій в середовищі з нафталином, здатність утилізувати органічні субстрати і що володіють високими активностями ключових ферментів метаболізму нафталіну.

ЦИГАНКОВА В.А.¹, ІУТИНСЬКА Г.О.².

¹*Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України
02094, Київ, вул. Мурманська, 1*

²*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Д 03680 ГСП, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154*

ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЮ ГОМОЛОГІЇ мРНК ПРИ НОРМАЛЬНОМУ І СТИМУЛЬОВАНОМУ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТУ РОСЛИН

Недостатнє фінансування сільськогосподарського виробництва потребує пошуку і розробки нових відносно недорогих елементів екологічно безпечних технологій ведення сільського господарства. Багаторічний досвід показує, що найперспективнішими з них є використання в сільському господарстві регуляторів росту рослин, за допомогою яких можливо не тільки скоротити витрати на виробництво сільськогосподарської продукції, але й збільшити вихід з одиниці площі кількості і підвищення якості сільськогосподарської продукції (тобто підняти врожайність культур), а також підсилити імунітет (захисні властивості) рослин при скороченні використання хімічних засобів захисту, підвищити посухостійкість і холодостійкість культурних рослин і забезпечити створення кращих умов для симбіозу рослин з мікрофлорою ґрунту.

Реальними для виробників стали регулятори росту рослин, створені в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України [1]. При перевірці дії цих регуляторів першочергова увага надається з'ясуванню механізму їх дії на функції генетичного апарату клітин (експресію генів), з метою пошуку сполук, не шкідливих для рослинного організму і навколишнього середовища.

Напрямок цієї роботи послужили: вивчення рівня експресії генів, а також ступеню гомології мРНК у рослин, що оброблялися та необроблялися регуляторами росту на різних етапах онтогенезу.

Матеріали та методи

В чашках Петрі або пластмасових коробочках, місткістю в 200 мл, заповнених перлитом, пророщували насіння і вирощували рослини квасолі і пшениці від початку проростання і до кінця їх вегетації, а на пшениці вивчали показники формування кореневої системи. Живильним середовищем служило середовище Мурасіге (MS) (контроль). В дослідні проби додавали регулятори росту (окремо Емістим і Аверком, або ж їх комбінацію).

Аверком – комплекс фізіологічно активних речовин (ауксинів, гіберелінів та цитокінінів, а також амінокислот, ліпідів, в т.ч. жирних кислот), що продукується авермектинсинтезуючим штамом *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 [2]. Продукент Аверкому був селекціонований у відділі загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України. Аверком позитивно впливає на мікробні