

куроновой и пировиноградной кислот. Состав ЭПС, синтезированных составленными ассоциациями на этаноле, идентичен.

Таким образом, установлено, что взаимодействия между монокультурами в ассоциациях осуществляются через их трофические потребности: субстратную зависимость роста одного вида от другого, а также через метаболиты, которые являются необходимыми факторами роста и синтеза ЭПС. Использование микробной ассоциации позволяет повысить выход ЭПС при культивировании на метаноле, а также использовать простую минеральную среду без факторов роста при выращивании на этаноле, что технологичнее и эффективнее. Типы взаимодействий между монокультурами в ЭПС-образующих микробных ассоциациях могут различаться в зависимости от штаммовых особенностей и пищевых потребностей культуры-продуцента, а принцип составления ассоциаций заключается в учете трофических и функциональных особенностей входящих в них монокультур.

УДК 579.253:575.224

ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА НА НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ПРИ ОБРАБОТКЕ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Гриц Н.В., Фомичев А.Ю.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Белорусский государственный университет (кафедра биофизики), Минск, РБ

Ранее установлено, что озон, наряду с другими эффектами, обладает выраженным ДНК-тропным действием и индуцирует мутации у бактерий, а также ограничивает внутриклеточную репродукцию фаговой ДНК [1-2]. В данной работе стояла цель установить влияние озона на трансформирующую активность обработанной in vitro ДНК, выделенной из клеток *E.coli*, и выяснить последствия взаимодействия озона (индуцированных радикалов) с нативной ДНК и её предшественниками.

Препараты ДНК в буфере SSC обрабатывали в течение разного времени озоном в концентрации 0,5 мкг/мл воздуха, барботируя озонированный воздух со скоростью 0,1 л/мин. Трансформацию клеток *E.coli* осуществляли без их предварительной обработки для придания состояния компетентности.

Было установлено, что по мере увеличения дозы воздействия O_3 (время обработки от 0 до 60 сек) число трансформантов по 4-м исследованным генам (*leu*, *pro*, *his*, *arg*) существенно уменьшалось.

В числе возможных причин снижения трансформирующей активности ДНК могут быть: фрагментация ДНК (известно, что адсорбироваться и поглощаться бактериальными клетками может лишь ДНК размером не менее 0,3 МДа [3,4]); деспирализация ДНК за счет разрыва водородных связей и снижения стэкинг-взаимодействий между основаниями, стабилизирующих спиральную структуру; деструкция азотистых оснований в результате озонолиза.

Одним из подходов, позволяющих регистрировать нарушение структуры нуклеиновых кислот, может быть измерение оптической плотности контрольного и обработанных озоном образцов ДНК. Нами установлено, что озонирование ДНК в дозах, существенно снижающих ее трансформирующую активность (время воздействия от 15 сек до 3 мин при концентрации O_3 0,5 мг/л воздуха и скорости барботирования 0,1 л/мин), сопровождается уменьшением степени регулярности или спиральности ДНК, регистрируемой по величине гиперхромного эффекта, т.е. имеет место деспирализация (плавление) ДНК.

Известно, что величина гиперхромного эффекта (температуры плавления ДНК) при тепловой денатурации ДНК является функцией ионной силы раствора и указывает на вклад ионных взаимодействий в стабильность спирали [5]. В нашем случае при воздействии на раствор ДНК озоном гиперхромный эффект также уменьшался по мере увеличения концентрации ионов в буфере SSC.

Наблюдаемое снижение оптической плотности образцов ДНК, обработанных в течение 3-х и более минут, является следствием деструкции циклических хромофорных групп - азотистых оснований. Нельзя исключить, что деструкция оснований имеет место и на начальных стадиях озонирования, и это приводит к снижению величины регистрируемого гиперхромного эффекта в результате наложения двух событий. Если это так, то регистрируемый гиперхромный эффект не отражает реально степень плавления ДНК в результате озонирования, так как величина оптической плотности, отражающая процесс плавления, уменьшается на величину потерь оптической плотности за счет деструкции отдельных оснований. Нельзя исключить также, что наряду с описанными событиями, вклад в снижение трансформирующей активности озонированной ДНК вносит и ее фрагментация до молекул малого размера, неспособных адсорбироваться на поверхности клеточной стенки и поглощаться клеткой.

В связи с наблюдаемой деструкцией азотистых оснований в составе молекул ДНК в данной работе определялась степень повреждаемости индивидуальных азотистых оснований при обработке O_3 в водных растворах, а также степень деструкции оснований при их гликозидировании, фосфорилировании нуклеозидов и в составе полинуклеотидов по схеме: азотистые основания → нуклеозиды → нуклеотиды (нуклеозидно-нофосфаты и нуклеозидтрифосфаты) → полинуклеотиды. Следует отметить, что подобные исследования уже проводились в других лабораториях, но полученные результаты противоречивы и требуют уточнения [6,7]. Все препараты использовали в эквимольных концентрациях (10^{-4} М). Озонолиз осуществляли в следующем режиме: концентрация O_3 - 0,5 мг/л воздуха; скорость продувки озонированного в коронном разряде воздуха - 0,1 л/мин; объем

обрабатываемых водных растворов - 5 мл. О степени деструкции азотистых оснований и их производных судили по электронным спектрам поглощения, полученным на спектрофотометре SPECORD M-40 в диапазоне 50000 см^{-1} - 33000 см^{-1} .

Для удобства сравнения степени деструкции озонем четырех оснований между собой оптические плотности обработанных растворов, полученные в области максимального поглощения, были нормированы по отношению к оптическим плотностям контрольных (необработанных) образцов. В результате получены кривые, позволяющие сравнивать основания по чувствительности к обработке озонем в одинаковых условиях озонлиза.

Установлено, что оптическая плотность растворов всех 4-х оснований (аденина, гуанина, урацила и цитозина) снижается в линейной зависимости от дозы воздействия (для гуанина, имеющего 2 максимума поглощения, отдельно рассчитывали показатели для двух длин волн). На основании углов наклона кривых, отражающих снижение поглощения по мере увеличения дозы воздействия, можно заключить, что азотистые основания по-разному чувствительны к озону, и их чувствительность возрастает в ряду аденин→урацил→цитозин→гуанин.

Ранее показано, что у разных производных азотистых оснований по мере усложнения химической организации (наличие остатка дезоксирибозы, фосфорилирования нуклеозидов) деструктивный процесс происходит неодинаковым образом [2]. В условиях наших экспериментов наибольшую чувствительность к озону проявляли нуклеозидмоно-фосфаты, несколько менее подвержены деструкции нуклеозид-трифосфаты и наиболее устойчивы полинуклеотиды. Существенной разницы в деструкции оснований и нуклеозидов при озонлизе их водных растворов не обнаружено.

Литература

1. Сьонг Ч., Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Мутагенный эффект озона в системе *Escherichia coli* K-12. // Вестн. Белорусского ун-та. Серия II. -1982. -№ 3. -С. 32-36.
2. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Действие озона на бактериофаги в системе фаг - клетка хозяин. // Микробиология. -Т 59. -С. 832-836.
3. Coslow S., Oishi M. Genetic transformation in *Escherichia coli* K-12 // Proc. Nat. Acad. Sci, USA. -1973. -V. 70. N1. -P. 84-87.
4. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. - 1988. -М.: Высшая школа.
5. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. -1973. -Л.: Наука.
6. Shinriki N. et al. Degradation of yeast RNA, yeast phenylalanin tRNA and tobacco mosaic virus RNA // Biochem. Biophys. Acta. -1981.-V. 655.-P. 323-328.
7. Герасимова Л.К. и др. Действие озона на нуклеиновые кислоты // Вестник Белорусского ун-та. Серия 2. Химия. Биология. География. -1984. -№ 1. -С. 32-35.

УДК 579.253:575.224

ПОВРЕЖДАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН У *E. COLI* И *B. SUBTILIS* ПРИ ОБРАБОТКЕ ОЗОНОМ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

Гриц Н.В., Фомичев А.Ю.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Белорусский государственный университет (кафедра биофизики), Минск, РБ

Широкое использование озона для обеззараживания питьевой и сточных вод, для сохранения качества и увеличения сроков хранения сельскохозяйственной продукции определяет необходимость детального изучения механизмов его действия на биологические объекты, наиболее удобными среди которых являются микроорганизмы. К настоящему времени доказана ДНК-тропность озона [1-3], идентифицированы клеточные структуры и отдельные процессы метаболизма, повреждающиеся под действием O_3 [4,5], определены генетические детерминанты, ответственные за чувствительность клеток микроорганизмов к действию данного агента [6,7]. Вместе с тем, недостаточная полнота и известная противоречивость накопленных экспериментальных данных диктуют необходимость в проведении дополнительных исследований последствий озонирования микробиологических объектов.

В данной работе стояла цель изучить на модели грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*B. subtilis*) бактерий повреждаемость их ригидной клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, подвергающихся воздействию молекул O_3 раньше других структур клетки, при разных условиях проведения озонлиза.

Обработку озонем осуществляли путем барботаж образцов в объеме 5 мл озонированным воздухом в течение разных промежутков времени. Концентрация O_3 составляла 5 мг/л воздуха, режим барботирования - 0,1 л/мин.

Одним из традиционных критериев оценки степени повреждающего действия внешнего фактора на бактерии является выживаемость обработанных клеток, регистрируемая по колониеобразующей способности по-