

(*Cheiranthus cheiri*), иногда на других растениях, особенно крестоцветных, им вызывается желто-коричневая пятнистость листьев, однако *A. cheiranthi* описывался и на загнивающих плодах.

Помимо вышеперечисленных видов на плодах помидор обнаружены также грибы *Cladosporium fulvum* и *Geotrichum candidum*.

*Cladosporium fulvum* Cook. Колонии желто-коричневого цвета. Конидиеносцы простые, слабо разветвленные, светло-коричневой окраски, ближе к вершине утолщающиеся, с односторонними узловатыми вздутиями. Конидии в цепочках, верхушечные и боковые, эллиптические, гладкие, бледно-коричневые, с 0-3 поперечными перегородками, размером 12-47 x 4-10 мкм.

*Geotrichum candidum* Link. Колонии беловатые, с неясным краем. Мицелий бесцветный. Конидиеносцы развиты слабо, постепенно они распадаются на отдельные клетки-оидии. Споры в цепочках, вначале цилиндрические, потом бочонковидные до почти шаровидных, 6-12 x 3-6 мкм. На плодах помидор вызывает водянистую гниль.

Из пятен на корнеплодах столовой свеклы выделен гриб *Ramularia beticola* Fautr. et Lamb. Мицелий бесцветный, конидиеносцы простые, короткие, у вершины с зубчиками. Конидии цилиндрические с закругленными концами, неокрашенные, с 0-3 перегородками, размером 22-30 x 4-5 мкм.

На свекле обнаружен также *Gliocladium catenulatum* Gilman et Abbot. Колонии белого цвета, с концентрическими зеленоватыми зонами в центре. Конидиеносцы мутовчато разветвленные, грубые, шероховатые. Кисточки 3-ярусные. Конидии эллипсоидные, размером 4-8 x 3-4 мкм, гладкие, светло-зеленые, в длинных слизистых колонках.

Комплекс микромицетов, развивающихся на овощных культурах включает также большое количество настоящих сапрофитов, особенно распространены представители родов *Aspergillus* Micheli и *Penicillium* Link.

УДК 557.21.044.14

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В СИСТЕМЕ ЗАКВАСОЧНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ Белясова Н.А., Гриц Н.В.

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

Лактококки являются основными компонентами большинства заквасок для производства самого широкого спектра кисломолочных продуктов. Этим бактериям принадлежит главная роль в процессе сквашивания молока, в основе чего лежит их способность превращать лактозу в лактат. Поэтому эффективность технологии получения кисломолочных продуктов и их качество в значительной мере зависят от свойств используемых в производстве штаммов лактококков. В свою очередь, совершенствование отдельных свойств исследуемых бактерий становится доступным при наличии систем генетического обмена между ними, разработке которых и посвящена данная работа.

В исследовании использованы заквасочные штаммы *Lactococcus lactis* и вирулентные бактериофаги лактококков, предоставленные отделом микробиологии БелНИКТИ мясной и молочной промышленности.

Одним из начальных этапов генетического исследования бактерий является создание коллекции маркированных штаммов. Эта работа основывается большей частью на методах мутагенеза. В серии экспериментов для бактерий *L. lactis* subsp. *cremoris* подобраны условия обработки клеток ультрафиолетом (УФ) и нитрозогуанидином (НГ), что позволило получать мутантные типы с частотой  $2 \cdot 10^{-5}$  и  $4 \cdot 10^{-4}$ , соответственно [1]. Известно [2], что в клетках лактококков присутствует обычно по несколько плазмид, на которых часто локализируются детерминанты фенотипически легко различимых признаков (утилизация лактозы и других углеводов, устойчивость к бактериофагам, метаболизм цитрата и др.). В ходе обработки бактерий акрифлавином получены варианты, утратившие способность сбраживать лактозу (частота элиминации 1,5%) и неспособные к продукции протеолитических ферментов (частота элиминации 0,4%). Электрофоретический анализ плазмидной ДНК *Lac*<sup>-</sup> клеток элиминантов позволил обнаружить потерю одной из трех выявленных ранее плазмид, молекулярная масса которой составляет 36 МДа, что позволяет сделать вывод о присутствии на этой плазмиде генов, ответственных за утилизацию лактозы. Следует отметить, что эволюционно (благодаря постоянному культивированию в богатых факторами роста средах) у лактококков выработалась зависимость по многим аминокислотам, витаминам и азотистым основаниям, что затрудняет работу по получению различно маркированных штаммов, пригодных для селекционной работы. Для создания коллекции таких штаммов использовали УФ- и НГ-мутагенез *Lac*<sup>-</sup> вариантов бактерий *L. lactis* subsp. *cremoris* с отбором антибиотикорезистентных клонов. В результате получена коллекция изогенных, отличающихся друг от друга различными признаками (способность утилизировать лактозу, устойчивость к ампициллину, тетрациклину, стрептомицину и канамицину) штаммов, пригодных для использования в конъюгационных скрещиваниях.

При скрещивании в «репликах» различных вариантов *Lac*<sup>+</sup> штаммов *L. lactis* subsp. *cremoris* с изогенными *Lac*<sup>-</sup> бактериями отобрано несколько клонов донорского типа, передающих в таких условиях *Lac*<sup>+</sup> детерминанты с более высокой частотой. Эти донорские бактерии использовали в экспериментах по конъюгационному обмену *Lac*<sup>+</sup>-детерминантой и генами антибиотикорезистентности при скрещиваниях в жидкой и на плотной среде разного состава [1]. Трансконъюганты удалось получить только в скрещиваниях на плотной полусинтетической среде (с использованием бактериальных фильтров) при селекции по признаку *Lac*<sup>+</sup> и контрселекции

по признакам  $Tc^r$  и  $Km^r$ . Частота образования таких трансконъюгантов достигала  $1 \cdot 10^{-6}$  на донорскую клетку (табл.). Таким образом, приходится констатировать, что конъюгационный обмен для исследуемых бактерий осуществляется с невысокой эффективностью и только для плазмидных детерминант.

Одним из широко используемых способов обмена генетической информацией у бактерий служит трансдукция, которая может осуществляться как с участием умеренных, так и вирулентных бактериофагов. Предварительный анализ 30-ти вирулентных фагов лактококков, выделенных на молочных заводах РБ, позволил разграничить их на 6 групп и отобрать 10 типовых фагов, различающихся между собой спектром литического действия, морфологией негативных колоний, чувствительностью к УФ и цитрату натрия. Эти фаги «размножили» на антибиотикорезистентных  $Lac^+$ - бактериях *L.lactis subsp.cremoris* и полученные методом «сливного» лизиса суспензии фагов смешивали с  $Lac^-$  и антибиотикочувствительными клетками *L.lactis subsp.cremoris*. В оптимизированных условиях трансдукции частота переноса исследуемых детерминант приближалась к  $10^{-6}$  (табл.) и существенно не различалась для плазмидного ( $Lac$ ) и хромосомального ( $Tc$ ) маркеров. Недостатком данной системы переноса генов является невысокая частота трансдукции и ограниченный круг чувствительных к имеющимся в распоряжении фагам штаммов лактококков.

Еще одним перспективным, хотя и наиболее трудоемким, методом генетического обмена служит слияние протопластов. Этот метод отличается от предыдущих возможностью получения рекомбинантного потомства для далеко отстоящих в генетическом родстве организмов. Для лактококков сама процедура получения протопластов затруднена из-за необычно сложного строения клеточной стенки этих бактерий, в состав которой входит большое количество белка.

Оптимизация условий получения протопластов у бактерий *L.lactis subsp.cremoris* позволила выявить наиболее важные из них, оказывающие существенное влияние на эффективность данного процесса: использование культуры клеток в поздней логарифмической фазе роста с инкубированием их в полусинтетической среде с факторами роста и d,l-треонином (0,2%); предварительная обработка клеток меркаптоэтанолом (0,01% при 30°C); обработка лизоцимом (500 мкг/мл, 60 мин) в гипертонической среде с сахарозой (0,6 М) при 37°C. Эффективность образования протопластов при этом составляла 90-99%, а частота реверсии протопластов в исходные клеточные формы в подобранных условиях достигала 36%.

Слияние протопластов *L.lactis subsp.cremoris* осуществляли в гипертонической среде с  $CaCl_2$  (0,01%) и полиэтиленгликолем 1000 (40%). При этом в 1 мл суспензии формировалось  $1,4 \cdot 10^3$  рекомбинантных форм, а частота слияния составляла  $6,1 \cdot 10^{-4}$  на родительскую клетку, восстановившую клеточную стенку. Анализ полученных  $Lac^+$ - и  $Km^r$ - рекомбинантов позволил сделать вывод о стабильном наследовании переданных признаков (независимо от их локализации в клетке) при культивировании в неселективных условиях.

Таблица

Перенос генов в системе бактерий *L.lactis subsp.cremoris*

Способ обмена	Детерминанты	Локализация детерминант	Частота переноса детерминант
Конъюгация	$Lac^+$ $Km^r$	Плазмидная Хромосомальная	$0,9 \cdot 10^{-6}$ кл./донорскую кл. $< 5 \cdot 10^{-7}$ кл./донорскую кл.
Трансдукция	$Lac^+$ $Tc^r$	Плазмидная Хромосомальная	$1,6 \cdot 10^{-6}$ кл./БОЕ $1,1 \cdot 10^{-6}$ кл./БОЕ
Слияние протопластов	$Lac^+$ $Km^r$	Плазмидная Хромосомальная	$6,1 \cdot 10^{-4}$ кл./кл.ревертантов $6,4 \cdot 10^{-4}$ кл./кл.ревертантов

Таким образом, разработанные для бактерий *L.lactis subsp.cremoris* способы генетического обмена позволяют осуществлять перенос как плазмидных, так и хромосомальных маркеров. Наиболее эффективно данный процесс происходит при слиянии протопластов лактококков, причем анализ полученного потомства свидетельствует о формировании истинных рекомбинантов при передаче хромосомальных детерминант. Наследование воспринятой при слиянии протопластов плазмиды с генами лактозного оперона также оказалось стабильным.

#### Литература

1. Белясова Н.А., Домашова Т.В., Гриц Н.В. Создание системы генетического обмена для молочнокислых стрептококков. // Труды БГТУ. Вып. 1У. Химия и химическая технология. - 1996. - С. 27-30.

## ХАРАКТЕР ЗАВИСИМОСТИ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ И ДРУГИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ *HIRSCHIOPORUS LARICINUS* ОТ pH СРЕДЫ

Бойко М.И.

Донецкий государственный университет, Донецк, Украина

Изучение влияния физико-химических факторов на рост грибов представляет не только общебиологический интерес, но и помогает в решении проблем, связанных с использованием чистых культур в биотехнологии [1]. Необходимость создания условий для культивирования *Hirschioporus laricinus* - нового активного продуцента протеиназ молокосвертывающего действия [2,3] потребовала определения оптимальных значений pH среды. На рост и развитие грибов большое влияние оказывает pH среды. Согласно З. Э. Беккер [4] от уровня кислотности среды зависит поступление питательных веществ в клетку и проявление различных физиологических процессов.

Установлено, что в 5-ти суточном возрасте гриб накапливает биомассы на средах с pH 5,42 (0,51 г/л) и 6,61 (0,57 г/л) достоверно больше, чем на среде с pH 4,40 (0,40 г/л). В 10-ти суточном возрасте наибольшее количество сухого вещества образуется на среде с 5,42 pH. Достоверного отличия в накоплении биомассы грибом в этом возрасте, произраставшим на средах с pH 4,40 и 6,61, не выявлено. Начиная с 15-ти суточного возраста гриб развивается лучше на среде с pH 6,61 (2,14 г/л), чем на остальных средах (1,17 и 1,69 г/л). Обнаруженное свойство, возможно, связано с различной скоростью потребления глюкозы продуцентом в зависимости от pH среды.

Полученные материалы показывают, что остаточное количество глюкозы в питательной среде на 5-е сутки роста продуцента составляет от 8,10 до 9,10 мг/мл в зависимости от варианта опыта, против исходного 10 мг/мл. Однако, достоверного отличия между вариантами опыта не выявлено. В 10-ти суточном возрасте наибольшее количество глюкозы поглощается грибом на среде с pH 4,40 (2,80 мг/мл), а в 15-ти суточном - на среде с pH 5,42 (3,85 мг/мл). Достоверного отличия в поглощении глюкозы *H. laricinus* на 20-е сутки роста между вариантами опыта не обнаружено. На 25-е и 30-е сутки развития гриба наименьшее количество глюкозы поглощается на средах с pH 4,40 (5,70 и 6,20 мг/мл) и 5,42 (5,60 и 6,50 мг/мл), а наибольшее - на среде с pH 6,61 (6,40 и 8,00 мг/мл).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что только к концу опыта прослеживается прямая зависимость между поглощением глюкозы и накоплением биомассы продуцентом.

Установлено, что МСА культурального фильтрата продуцента, произраставшего на средах с различным pH, неодинакова. Активность фермента гриба до 25-ти суточного возраста увеличивается, затем несколько понижается. Это характерно для всех вариантов опыта. Наибольшая активность фермента наблюдается на 25-е сутки развития гриба. Для выявления оптимальной кислотности среды для образования молокосвертывающего фермента проведена сравнительная характеристика активности фермента на средах с различным pH.

Наибольшая молокосвертывающая активность гриба в 5-ти суточном возрасте обнаружена на среде с pH 4,40 (7,30 мин.), а самая низкая - на среде с pH 6,61 (10,0 мин.). В 10-ти суточном возрасте *H. laricinus* между вариантами опыта достоверного отличия в активности фермента не выявлено. Это, возможно, связано с прошедшей адаптацией гриба к pH среды. На 15-е, 20-е и 25-е сутки активность фермента достоверно выше на среде с pH 4,40 (4,30, 2,30 и 1,55 мин.), чем на средах с pH 5,42 (5,25, 3,55 и 2,30 мин.) и 6,61 (5,20, 4,25 и 4,00 мин.). На 30-е сутки активность фермента гриба, произраставшего на среде с pH 6,61 (9,00 мин.) достоверно ниже, чем на средах с pH 4,40 (3,05 мин.) и 5,42 (3,54 мин.).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что компоненты питательной среды - глюкоза, пептон и другие в зависимости от pH среды, возможно, используются на разные потребности продуцента. При условии кислой среды глюкоза в большей мере используется на образование фермента, чем биомассы, а на среде близкой к нейтральной эти процессы имеют обратную зависимость. Большее накопление сухого вещества грибом - ниже активность молокосвертывающего фермента. Для получения молокосвертывающего фермента продуцент *H. laricinus* необходимо культивировать на среде с кислотностью 4,40 pH.

### Литература

- 1) Соломко Э. Ф. Физиолого-биохимические свойства и биосинтетическая активность высшего базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kunn в глубинной культуре: Автореф. дис. ... д-ра биол. Наук. - К, 1992. - 49 с.
- 2) Патент Украины № 6228 С 12 N 9/58, С 12 N 15/00/(С 12 Т 9/58, С 12 R 1 645). Штамм *Hirschioporus laricinus* M-81 (Karst) Ryv. - продуцент молокосвертывающего ферменту /М. И. Бойко, С. Ф. Негруцкий, Т. В. Мірошніченко, М. О. Соболю, Ю. С. Варенко. - Опубл. 29.12.94. Бюл. № 8-1.
- 3) Бойко М. И., Негруцкий С. Ф., Федотов О. В., Полях В. А. Влияние различных источников углеродного питания на молокосвертывающую активность *Hirschioporus laricinus* // Философские и естественно-научные аспекты антропологии. - Санкт-Петербург-Донецк, 1992. - С. 117-120.