

проводилась до стадии осаждения белков, что позволило получить более чистый препарат плазмидной ДНК. Электрофоретический анализ полученной пробы показал наличие 5 плазмидных полос (рис., трубка 3). Кроме ранее наблюдаемых двух крупных плазмид, были визуализированы 3 плазмиды, имеющие меньшую молекулярную массу.

Таким образом, можно заключить, что метод выделения плазмидной ДНК у бактерий рода *Streptococcus*, включающий в себя разрушение клеточной стенки предварительно обработанных  $\beta$ -меркаптоэтанолом клеток лизоцимом в течение 20 минут при температуре 37 °С в присутствии ингибитора нуклеаз диэтилпирикарбоната, является наиболее эффективным применительно к молочнокислым стрептококкам. Применение этого метода позволяет получать препарат плазмидной ДНК с высоким выходом и содержащий широкий спектр характерных для молочнокислых стрептококков плазмид.



Рис. Результаты гель-электрофореза выделенной ДНК бактерий *Str.lactis* L4.2

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kondo J., McKay L. Gene transfer systems and molecular cloning in group N Streptococci: a review // *J.of Dairy Science.*-1985.-V.68.-N.9. -P.2143-2159.
2. Klaenhammer T.R., McKay L.L., Baldwin K.A. Improved lysis of group N Streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid // *Appl. and Envir. Microbiol.* - 1978. - V. 35. - №3. - P. 592-600.
3. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С. Некоторые аспекты получения протопластов у *Streptococcus lactis* // *Прикладная биохимия и микробиология.* - 1990. - Т.26 - №4. - С.566-572.

УДК 579.8.017.6:577.152

### ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫХ ЦЕПЕЙ У БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

**Сокольчик Т.И., Селицкая Л.А., Леонтьев В.Н.**

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

Как известно, клетки микроорганизмов обладают гибким метаболизмом и способны к значительным перестройкам окислительного обмена веществ в ответ на изменение условий их культивирования. Наибольшим изменениям подвергается активность ферментов микросомальных и пероксисомальных систем окисления, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции источников углерода в реакциях гидроксирования различных по химической природе соединений и перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот [1].

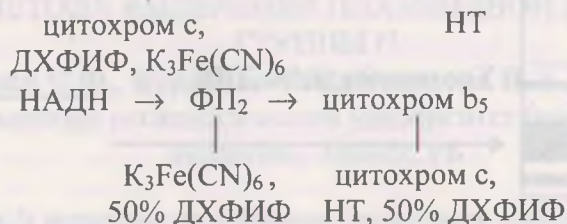
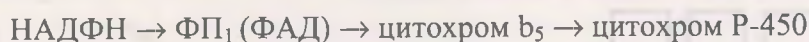
В связи с этим, для изучения особенностей функционирования монооксигеназных ферментных систем в клетках углеводородокисляющих микроорганизмов, а также для понимания действия факторов внешней среды на физиолого-биохимический статус микробных клеток, представлялось целесообразным исследовать влияние условий культивирования (типа субстрата, фазы роста микроорганизмов) на уровень ключевых ферментов окисления углеводов у бактерий рода *Pseudomonas*.

Исходя из механизма действия цитохром Р-450-содержащей гидроксильной ферментной системы [2], а также с целью изучения редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении различных углеводов микробными клетками, нами были измерены активности оксидоредуктаз в клетках бактерий

*Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas fluorescens* В-22, выращенных на различных субстратах, с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками (табл.1). Принцип метода основан на определении изменения поглощения света акцепторами электронов при переходе их из окисленной формы в восстановленную (схема). Участки редокс-цепей, с которых снимаются электроны, указаны на схеме штриховыми стрелками.

Как видно из табл.1, при выращивании клеток бактерий *P.aeruginosa* и *P.fluorescens* В-22 на углеводородных субстратах наблюдается активация как НАДН-, так и НАДФН-зависимых электронтранспортных цепей. Причем, исходя из максимальных значений НАДН- и НАДФН-феррицианидредуктазных активностей, можно сделать вывод

### СХЕМА



где ФП<sub>1</sub> - НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза, ФП<sub>2</sub> - НАДН-цитохром b<sub>5</sub>-редуктаза, ДХФИФ - 2,6-дихлорфенолиндофенол, НТ - неотетразолий синий.

Таблица 1

Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках *P.aeruginosa* и *P.fluorescens* В-22

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин*мг белка			
	Субстрат			
	глюкоза	гексан	гексен-1	цикло-гексен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
НАДН:2,6-ДХФИФ	1,71	2,30	2,70	2,61
НАДФН:2,6-ДХФИФ	2,21	2,94	3,07	1,20
НАДН:цитохром с	1,81	1,98	3,15	3,43
НАДФН:цитохром с	0,52	0,39	1,43	0,65
НАДН:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	21,47	79,90	83,24	64,40
НАДФН: K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	14,24	43,07	26,22	24,48
НАДН:НТ	0,35	0,35	0,06	0,27
НАДФН:НТ	0,14	0,27	0,21	0,19
<i>Pseudomonas fluorescens</i> В-22				
НАДН:2,6-ДХФИФ	4,11	4,94	7,44	5,28
НАДФН:2,6-ДХФИФ	1,65	1,67	2,83	1,62
НАДН:цитохром с	1,66	2,78	4,17	2,16
НАДФН:цитохром с	0,51	0,86	0,84	1,39
НАДН: K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	50,26	60,46	82,48	64,81
НАДФН: K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	27,78	31,30	56,10	30,13
НАДН:НТ	0,10	0,17	0,14	0,14
НАДФН:НТ	0,23	0,21	0,12	0,11

о том, что наибольшее влияние углеводородные субстраты оказывают на активность НАДН-цитохром b<sub>5</sub>-редуктаз и НАДФН-цитохром Р-450-редуктаз в клетках обоих видов бактерий, участвующих в транспорте электронов от НАДН к цитохрому b<sub>5</sub> и от НАДФН к цитохрому Р-450 соответственно.

Это может свидетельствовать о том, что цитохромы b<sub>5</sub> и Р-450 принимают непосредственное участие в окислении углеводородных субстратов, и содержание этих ферментов в клетках в данном случае непременно должно возрастать по сравнению с содержанием в клетках, выращенных на глюкозе.

В табл.2 представлены данные по содержанию цитохромов b<sub>5</sub> и Р-450 в клетках бактерий *P.aeruginosa* и *P.fluorescens* В-22, выращенных на различных субстратах, и в зависимости от фазы роста микроорганизмов.

Содержание цитохромов  $b_5$  и P-450 в клетках бактерий *P.aeruginosa* и *P.fluorescens* B-22

Субстрат	Содержание цитохрома $b_5$ , нмоль/мг белка		Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	
	Экспоненциальная фаза	Стационарная фаза	Экспоненциальная фаза	Стационарная фаза
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Глюкоза	0,01	0,01	0,03	0,02
Гексан	0,02	0,02	0,05	-
Гексен-1	0,04	0,04	0,08	0,04
Циклогексен	0,02	-	0,04	-
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-22			
Глюкоза	0,04	0,02	0,02	-
Гексан	0,12	0,05	0,10	0,08
Гексен-1	0,18	0,03	0,21	0,03
Циклогексен	0,04	0,04	0,23	0,02

Очевидно, что замена глюкозы на углеводороды вызывает индукцию синтеза цитохромов  $b_5$  и P-450 в клетках обоих видов бактерий, взятых в различных фазах роста. Кроме того, при переходе клеток из экспоненциальной фазы в стационарную цитохромный состав также изменяется в сторону уменьшения содержания ферментов в связи с истощением источника углерода в среде.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в окислении как насыщенных, так и ненасыщенных углеводородов клетками бактерий рода *Pseudomonas*, вероятно, участвует монооксигеназная ферментная система, содержащая все 4 компонента - НАДН-цитохром  $b_5$ -редуктазу, НАДФН-цитохром P-450-редуктазу, цитохром  $b_5$ , цитохром P-450, функционирующие как в НАДН-, так и в НАДФН-зависимых электротранспортных цепях, сопряженных с реакцией окисления органических субстратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hirai M., Shiotani T. et al. //Agric.Biol.Chem.1976. V.40, N 10. P.1979-1985.
2. Estabrook R.W., Hildebradt A. et al. //Biochem.and Biophys.Comm. 1971.V.42, N 42.P.132-139.

## РЕАКЦИЯ ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ - ДЕСТРУКТОРОВ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НА ДЕТЕРГЕНТНЫЙ СТРЕСС

**С.С.Ставская, И.А.Кривец, Н.И.Настоящая**  
Национальный технический университет Украины "КПИ"

Анионные поверхностно-активные вещества (АПАВ) широко используются в бытовой химии в качестве компонента синтетических моющих средств (СМС). Нами выделены бактерии, способные разрушать алкилсульфаты [1], однако механизм взаимодействия между этими веществами и бактериями-деструкторами до настоящего времени не изучен. В то же время додецилсульфат натрия (ДСН) является общеизвестным мембранотропным агентом и нашел применение в биохимии для получения фрагментов клеточных мембран. В связи с этим представлялось интересным выяснить, каким образом бактерии-деструкторы перестраивают свой липидный обмен в присутствии ДСН и обеспечивают устойчивость популяции к его литическому воздействию.

Объектом изучения служил штамм - деструктор алкилсульфатов *Pseudomonas aeruginosa* 1С [1]. Условия культивирования бактерий и проведения исследований жирнокислотного состава клеток описаны в [2]. Электронномикроскопические исследования проводили, как описано в [3]. ДСН определяли общепринятым методом с метиленовым синим [1]. Бактерии подвергали стрессовому воздействию путем импульсного (одноразового) внесения ДСН в культуральную жидкость с 4-6-часовыми (логарифмическая фаза) клетками таким образом, чтобы его конечная концентрация составляла 0,5; 0,7 и 1,0 г/л. Жирные кислоты (ЖК) анализировали после 15-, 30-, 90-минутного (острый опыт) и 5-, 10-, 13-, 18- и 20- часового (хронический опыт) контакта клеток с веществом. После внесения вещества нами отмечались приостановление роста культуры и выход в среду клеточного содержимого, что свидетельствует о лизисе части клеток. Наиболее характерные изменения наблюдались при воздействии 1 г/л ДСН. Установлено, что в липидах нарушается соотношение между основными ЖК. Так, отмечено существенное уменьшение содержания гексадеценовой кислоты при одновременном повышении уровня октадеценовой. В процессе развития детергентного стресса увеличивается степень ненасыщенности липидов, результатом чего может быть изменение их текучести (фазового состояния). Об этом свидетельствует отношение суммы всех насыщенных ЖК к сумме ненасыщенных (общий индекс насыщенности - ОИН) (таблица). По-