

4. Аносов В.Я., Озерова М. М., Фиалков Ю. Н. Основы физико-химического анализа.-М: Наука, 1976.
5. Глесстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей. - М.-Л.: Изд-во иностр. лит., 1948.
6. Френкель Я. И. Кинетическая теория жидкостей. -Л.: Наука, 1945.
7. Гутман В. Химия координационных соединений в неводных растворах. -М.: Мир, 1971.

УДК 557.21.044.14

Т.В.Чаевская, аспирант;

Н.А.Белясова, доцент;

Н.В.Гриц, доцент

ТРАНСДУКЦИОННЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В СИСТЕМЕ БАКТЕРИЙ РОДА STREPTOCOCCUS

The conditions, wich allow to produce high dencity suspensions of lactic acid bacteria bacteriophages were optimised. A method was developed for the transductional transfer antibiotic resistance genes between lactic acid bacteria of three spesias.

Усовершенствование свойств микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ или, как теперь говорят, "конструирование штаммов с заданными свойствами" возможно лишь при одном условии - если для данной группы микроорганизмов разработаны методы обмена генетической информацией. Ранее мы разработали систему конъюгационного переноса генов для лактококков, используемых в производстве кисломолочных продуктов [1]. Оказалось, что этот вид обмена у лактококков осуществляется только на плотной среде и с низкой частотой. В результате удалось перенести только плазмидные, но не хромосомальные гены.

Целью настоящей работы являлась разработка метода трансдукционного обмена генетической информацией у молочнокислых бактерий, используемых для составления заквасок в Республике Беларусь. В качестве исходного материала служили 30 бактериофагов молочнокислых стрептококков, выделенных в разное время на молочных предприятиях Беларуси и предоставленных нам отделом микробиологии БелНИКТИ мясной и молочной промышленности, а также 8 штаммов чувствительных к данным фагам лактококков, относящихся к трём видам: *Str. lactis*, *Str.diacetilactis*, *Str.cremoris*.

Процесс размножения бактериофагов на чувствительных бактериях в сильной степени зависит от условий его осуществления [2], и начальные эксперименты по перекрестному титрованию фагов на исследуемых бактериях выявили необходимость разрешения ряда практических задач:

1) подбор сред для лучшего размножения фагов на клетках молочно-кислых стрептококков;

2) оптимизация условий для получения лизатов бактериофагов в высоком титре, поскольку трансдукция возможна лишь с концентрированными суспензиями фагов (не менее 10^8 БОЕ/мл);

3) разграничение фагов на типовые группы с целью исключения из исследования аналогичных вариантов.

Решение данных задач позволило оптимизировать следующие условия размножения бактериофагов на молочнокислых бактериях:

- использование метода "сливного" лизиса на чашках Петри с 1,5%-ной агаризованной средой ГО (на основе обезжиренного молока) в качестве нижнего слоя и 0,7%-ной агаризованной средой 48А (на основе пептона и дрожжевого экстракта) в качестве верхнего слоя;

- использование чувствительных бактерий в поздней логарифмической стадии роста;

- проведение адсорбции и инкубирования смеси бактерий и фагов при температуре 30°C ;

- осуществление инфицирования чувствительных бактерий фаговыми частицами с множественностью 0,1.

В таких условиях удается получать лизаты исследуемых бактериофагов с титром $7-9 \cdot 10^9$ БОЕ/мл - достаточно высокая концентрация для осуществления процесса трансдукции.

Серия экспериментов была посвящена характеристике основных свойств исследуемых бактериофагов с целью исключения из коллекции близкородственных линий. В первую очередь изучалась морфология негативных колоний, образующихся на газонах чувствительных культур в 0,7%-ной агаризованной среде 48А. В соответствии с этими признаками выделено 6 морфологических типов фагов, представители которых отличались величиной, степенью прозрачности, формой, наличием ореола и характером края негативных колоний. При перекрестном титровании фагов на чувствительных культурах обнаружилось, что внутри типовых морфологических групп выделяются подгруппы, соответствующие градации анализируемых фагов по спектру литического действия (табл.1). Для более полной характеристики фагов у них определяли тип нуклеиновой кислоты, а также отношение к цитрату натрия (ингибирующий фактор) и воздействию ультрафиолета (табл. 1).

Табл. 1. Характеристика фагов молочнокислых стрептококков

Фаг	Морфологический тип	Спектр литического действия	Выживаемость (%) в присутствии цитрата натрия	Выживаемость (%) при УФ-облучении
1	2	3	4	5
237-32	1	32	0,07	1,32
83-32	1	32	0,08	1,43
24-36	1	84, 36	20,00	0,78
19-38	1	84, 36	21,00	0,76
6-38	1	84, 36	20,50	0,81
11-36	1	84, 36	21,10	0,85
10-36	1	84, 36	21,00	0,80
29-38	1	84, 36, 32	100	3,70
20-38	1	84, 36, 32	100	3,47
46-84	1	18, 24, 32, 36	0,50	1,23
12-32	2	32	0,10	1,26
258-32	2	32	0,095	1,34
3-32	2	32	0,095	1,17
154-32	2	32	0,19	1,30
234-24	3	32, 24	0,28	0,70
119-32	3	32, 24	0,25	0,76
66-84	3	32, 24	0,23	0,77
236-84	3	32, 24	0,25	0,63
158-32	4	32, 24	8,33	0,63
250-19	4	18, 23, 19	0,30	0,50
165-18	5	19, 23	4,05	1,42
203-23	5	19, 23	4,02	1,51
158-18	5	19, 23	4,20	1,36
5-19	5	19, 23	4,30	1,47
241-18	5	19, 23	4,30	1,38
251-23	5	19, 23	4,15	1,40

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
163-19	5	19, 23	4,17	1,49
79-18	5	19, 23	4,12	1,50
265-17	6	17	0,75	0,93
170-17	6	17	0,80	0,86

Примечание. 1. В графе “спектр литического действия” содержатся номера штаммов молочнокислых стрептококков, чувствительных к данным фагам; 2. Все фаги содержат двуниевую ДНК.

Анализ представленных данных позволяет заключить, что среди исследуемых бактериофагов встречается множество идентичных, характеризующихся сходными спектрами литического действия, морфологией негативных колоний, отношением к УФ-облучению и цитрату натрия. Таким образом, в результате проделанной работы удалось отобрать 10 типовых фагов молочнокислых стрептококков, которые использовали в дальнейших экспериментах: 237-2, 24-36, 29-38, 46-84, 154-32, 66-84, 158-32, 250-19, 203-23, 170-17.

Для осуществления трансдукции необходимо иметь набор бактерий, чувствительных к используемым фагам и по-разному маркированных. Такие варианты получали с помощью нитрозогуанидинового мутагенеза по отработанной ранее методике [3]. В результате создана коллекция изогенных штаммов *Str.cremoris* 24, устойчивых к тетрациклину (5 мкг/мл), канамицину (50 мкг/мл) и стрептомицину (100 мкг/мл). Эти бактерии служили донорами генетического материала - на них размножали бактериофаги. Полученные лизаты смешивали с суспензиями клеток дикого типа *Str.cremoris* 24.

В экспериментах по трансдукционному переносу маркеров антибиотикорезистентности варьировали длительностью адсорбции фагов на чувствительных клетках (0-40 мин). Это оказалось необходимым для определения условий, способствующих наиболее эффективной трансдукции, поскольку малое время адсорбции могло быть недостаточным, чтобы дефектные фаговые частицы могли успеть сорбироваться на клетках, а слишком длительный этап адсорбции мог привести ко вторичной инфекции трансдуктантов. Пример подобного эксперимента для бактериофага 46-84 представлен в табл.2.

Как следует из данных таблицы, оптимальной длительностью адсорбции можно считать 20 минут: частота трансдукции при этом составляет $1 \cdot 10^{-6}$ кл/БОЕ. Все отобранные таким образом антибиотикорезистент-

ные трансдуктанты сохраняли способность сквашивать молоко и остальные, характерные для бактерий *Str.cremoris*, 24 признака.

Табл.2. Трансдукционный перенос признака тетрациклин-резистентности в системе бактерий *Str.cremoris* 24

Длительность адсорбции, мин	0	10	20	30	40
Концентрация трансдуктантов, кл/мл	190	190	300	240	220
Эффективность трансдукции	$6,3 \cdot 10^{-7}$	$6,3 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$8,0 \cdot 10^{-7}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$

Таким образом, создана система, позволяющая с достаточной эффективностью переносить хромосомальные гены между клетками молочнокислых стрептококков с помощью вирулентных фагов, выделенных в Беларуси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белясова Н.А., Домашова Т.В., Гриц Н.В. Создание системы генетического обмена для молочнокислых стрептококков. Труды БГТУ. Вып.3. Химия и химическая технология. - 1996. -С.27-30.
2. Основы бактериофагии / Под редакцией Габриловича И.М. - Изд-во Вышэйш. школа, 1973.
3. Гриц Н.В., Белясова Н.А., Богданова Л.Л. Создание системы изогенных партнерских штаммов молочнокислых стрептококков для конъюгационного обмена // Труды БелНИКТИММП, 1997 (в печати).

УДК 579.861:576.8

Н.А.Белясова, доцент;
Т.В.Чаевская, аспирант;
Н.В.Гриц, доцент

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

Protoplasts were isolated from 3 strains of starter cultures of the genera *Streptococcus*. The conditions of preincubation, action of lysozyme, 2-mercaptoethanol, the type of caused and regeneration medium, the type and concentration of stabilizer were optimized.

Из четырех известных способов обмена генетической информацией у бактерий слияние протопластов имеет самостоятельное значение, по-