

среде (3 мг/мл). Инкубировали смесь 30 мин при 30°C, после чего вносили в расплавленный «верхний» агар, как в пункте 4;

б) осуществляли все манипуляции, как в пункте 5, за исключением режима преинкубации, которую проводили при 37° С в течение 20 мин.

Все посеы инкубировали в течение 48 ч при 37°C, после чего учитывали плотность кольца (интенсивность роста клеток в нем) в методах 1—3 или подсчитывали количество колоний, образованных бактериями-ревертантами ( $Cys^+$ ) в методах 4—6. Результаты суммированы в табл. 3.

Таблица 3

**Характеристика методов анализа мутагенной активности НГ по отношению к бактериям *E.coli* HfrH H59  $Cys^-$**

Метод (№)	Среднее число колоний ревертантов на чашке	Плотность кольца ревертантов
1	—	++
2	—	++++
3	—	+++
4	19,3	—
5	20,8	—
6	18,6	—

Представленные результаты позволяют сделать выбор в пользу методов 2 и 5, однако для более полной их характеристики следует испытать различные концентрации химических веществ с мутагенной активностью, определив в каждом случае характер зависимости эффективности реверсии от концентрации мутагена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Христова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. —М.: Наука, 1989.
2. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. —М.: Мир, 2000.
3. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. —М.: Мир, 1984.

УДК 557.21.044.14

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

#### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОБМЕНА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИЕЙ У БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS***

The comparative analysis of such methods of the genetic information transfer of lactococcus, as conjugation, transduction and protoplast fusion carried out. The choice is made for the benefit of last method as the most effective and perspective.

В современном производстве биологически полноценных и экологически безопасных кисломолочных продуктов питания используются закваски и бактериальные концентраты, в состав которых входят штаммы бактерий рода *Lactococcus*. Для получения высококачественных продуктов необходимо использовать штаммы с определёнными

ными, наиболее ценными свойствами, и они должны быть высокопродуктивными. В свою очередь, совершенствование отдельных признаков исследуемых бактерий становится доступным при наличии систем генетического обмена между ними.

Любая генетико-селекционная работа с микроорганизмами требует наличия маркированных штаммов, которые отличаются друг от друга рядом признаков. Наиболее часто используемыми генетическими маркерами бактерий служат аллели генов, обеспечивающие различия по способности клеток утилизировать те или иные источники углерода, зависимости по факторам роста, резистентности к антибиотикам. Эти признаки являются селективными и позволяют вести прямой отбор рекомбинантных форм.

В ряде экспериментов нами было выявлено, что имеющихся различий между штаммами исследуемых лактококков недостаточно для подбора партнерских пар [1]. Возникла необходимость искусственно расширять круг различий между штаммами бактерий, в первую очередь по селективным признакам.

Для достижения этой цели были разработаны такие методы маркирования клеток молочнокислых бактерий, как элиминация плазмид и индуцированный мутагенез [1]. С помощью данных методов был получен ряд вариантов клеток лактококков, отличающихся способностью сбрасывать те или иные углеводы и чувствительностью к различным антибиотикам, которые планировалось использовать в качестве партнерских пар при переносе генетического материала.

Одним из наиболее простых в исполнении методов передачи генетического материала является конъюгация. В ряде экспериментов нами был осуществлен подбор донорских штаммов, способных осуществлять конъюгационный перенос генетического материала в соответствующие реципиентные клетки, а также оптимизированы условия конъюгации [2]. Результаты скрещивания одной из таких пар изогенных штаммов лактококков представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Результаты конъюгации бактерий  
*L. lactis ssp. cremoris* 10-2 (Lac<sup>-</sup> Tc<sup>R</sup>) и *L. lactis ssp. cremoris* 10-2 (Km<sup>R</sup>)**

Среда	Смесь доноров и реципиентов до скрещивания (кл./мл)	Смыв с фильтра через 16 ч (кл./мл)
MM9 + lac	$1,1 \cdot 10^7$	—
MM9 + lac + Tc	0	$8,2 \cdot 10^1$
MM9 + lac + Tc + Kc	0	0

Представленные результаты свидетельствуют о возможности конъюгационного переноса генов лактозного оперона от донорских клеток в изогенные реципиентные Lac<sup>-</sup>-клетки. При этом эффективность переноса детерминанты утилизации лактозы из донорских клеток в реципиентные достигала  $10^{-6}$  на клетку донора. В дальнейших экспериментах была проведена попытка переноса с помощью конъюгации ряда хромосомальных маркеров, которая не увенчалась успехом. Это привело к необходимости определения эффективности передачи наследственного материала у лактококков другими методами генной инженерии.

Одним из таких методов, позволяющих переносить не только плазмидные, но и хромосомальные детерминанты, является трансдукция. Для осуществления трансдук-

ционного переноса генетического материала необходимо иметь бактериофаги, вирулентные для лактококков, а также набор различно маркированных бактерий, чувствительных к используемым фагам. В ряде экспериментов были определены условия, способствующие наиболее эффективной трансдукции [3]. Пример подобного эксперимента для бактериофага 46-84 представлен в табл. 2.

Таблица 2

**Трансдукционный перенос признака тетрациклинрезистентности в системе бактерий *L. cremoris* 24**

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

Как показано в табл. 1 и 2, эффективность конъюгации ( $1 \cdot 10^{-6}$  трансконъюгантов/кл донора) сопоставима с эффективностью трансдукции ( $1,0 \cdot 10^{-6}$  трансдуктантов/БОЕ). Однако число трансдуктантов, получаемых в одном эксперименте, значительно превышает число трансконъюгантов. Кроме того, число первых можно увеличить, используя для проведения трансдукции лизаты бактериофагов с более высоким титром (до  $10^{13}$  БОЕ/мл), в то время как число трансконъюгантов можно увеличить, лишь оптимизируя условия конъюгации. При этом в результате трансдукции с одинаковой частотой могут передаваться как плазмидные гены, так и хромосомальные, тогда как при конъюгации хромосомальные гены передаются гораздо реже, чем локализованные на плазмидах.

Таким образом, оба рассмотренных метода переноса генетического материала различаются по механизму, но похожи по существу: участок ДНК клетки-донора перемещается в клетку-реципиент. При трансдукции роль переносчика выполняет бактериофаг, а при конъюгации генетический материал передается через цитоплазматический мостик (пили). Ни один из этих методов не обеспечивает одновременный обмен несколькими детерминантами, расположенными на разных плазмидах. Кроме того, ни один из вышеописанных методов не позволяет получить межродовые гибриды. Эти проблемы можно решить, если использовать для переноса генетической информации такой метод, как слияние протопластов.

Среди четырех известных способов обмена генетической информацией у бактерий слияние протопластов имеет самостоятельное значение, так как позволяет объединять не только геномы, но и цитоплазмы клеток, принадлежащих не только к одному, но и к разным видам и даже родам.

В процессе слияния может участвовать сразу несколько клеток, и формирующееся рекомбинантное потомство часто наследует признаки более чем двух родительских клеток. Эта особенность может оказаться весьма полезной при конструировании заквасочных штаммов лактококков. При производстве кисломолочных продуктов традиционно в качестве заквасок используют многовидовые многоштабмовые комбинации. Это, с одной стороны, усложняет процедуру получения качественных заквасок, а с другой – способствует явлению фаголизиса, который зачастую обуславливает прерывание технологических операций в молочных производствах. Использование метода слияния



протопластов позволяет ограничить количество видов микроорганизмов в закваске с сохранением свойств и лучших качеств продукта.

В серии экспериментов нами были подобраны и оптимизированы условия получения, регенерации и слияния протопластов клеток лактококков [4, 5]. Полученные данные позволили с высокой эффективностью осуществить перенос генетического материала у молочнокислых бактерий методом слияния протопластов (табл. 3).

Таблица 3

**Параметры процесса слияния протопластов бактерий  
L.lactis ssp. lactis var. diacetylactis 540/4 (Tet<sup>R</sup>Rif<sup>S</sup>) x  
L.lactis ssp. lactis var. diacetylactis 599/11/1 (Tet<sup>S</sup>Rif<sup>R</sup>)**

Бактерии (генотип)	Концентрация клеток, кл./мл	ЭП, %	ЭР, %	ЭСР, кл./кл. рев.
540/4 (Tet <sup>R</sup> Rif <sup>S</sup> )	$K_{исх.} = 5,6 \cdot 10^8$ $K_{осм.} = 1,4 \cdot 10^4$ $K_{рев.} = 1,1 \cdot 10^8$	99,9	19,6	—
599/11/1 (Tet <sup>S</sup> Rif <sup>R</sup> )	$K_{исх.} = 1,8 \cdot 10^9$ $K_{осм.} = 9,6 \cdot 10^6$ $K_{рев.} = 2,6 \cdot 10^8$	99,5	13,9	—
фузанты (Tet <sup>R</sup> Rif <sup>R</sup> )	$K_{рев.} = 2,1 \cdot 10^4$	—	—	$1,1 \cdot 10^4$

Как показывают вышеприведенные данные, метод слияния протопластов позволяет с большей эффективностью передавать генетический материал, чем конъюгация и трансдукция.

Таким образом, слияние протопластов клеток бактерий представляется наиболее перспективным из вышеописанных методов передачи генетического материала. К числу его преимуществ можно отнести:

- возможность передачи как плазмидных, так и хромосомальных детерминант;
- возможность получения межвидовых и межродовых гибридов;
- отсутствие необходимости подбора генетически совместимых изогенных штаммов (как при конъюгации);

- отсутствие необходимости поиска бактериофагов, способных инфицировать партнерские бактерии (что необходимо при трансдукции);

- образование большого количества вариантов рекомбинантного потомства с заданными свойствами, в том числе и фагоустойчивого, которое невозможно получить трансдукцией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Белясова Н.А., Чаевская Т.В., Богданова Л.Л. и др. Получение маркированных штаммов лактококков, пригодных для генетического обмена // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2001. – № 4. – С. 57–61.

2. Белясова Н.А., Домашова Т.В., Гриц Н.В. Создание системы генетического обмена для молочнокислых стрептококков // Труды БГТУ. Сер. химии и химической технологии. – 1996. – Вып. IV. – С. 27–30.

3. Чаевская Т.В., Беясова Н.А., Гриц Н.В. Трансдукционный перенос генетического материала в системе бактерий рода *Streptococcus* // Труды БГТУ. Сер. химии и химической технологии. – 1997. – Вып. V. – С. 32–36.

4. Беясова Н.А., Чаевская Т.В., Кандыбович И.И., Гриц Н.В. Получение и реверсия протопластов у некоторых штаммов бактерий рода *Lactococcus* // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – № 1. – С. 68–72.

5. Беясова Н.А., Чаевская Т.В., Караева О.А., Гриц Н.В. Разработка метода слияния протопластов и селекция гибридных бактерий у лактококков // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2002. – № 2. – С. 84–87.

УДК 666.5:576.1

Р.М. Маркевич, доцент; Е.С. Какошко, инженер;  
А.Е. Кротович, студент; Е.М. Дятлова, доцент

### ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА ОБРАЗЦОВ ГЛИН В ПРОЦЕССЕ ВЫЛЕЖИВАНИЯ

The influence of Gaidukovka field clay samples storage conditions (culture medium addition, duration and temperature of storage) upon the qualitative and quantitative composition of microflora and the properties of samples such as granulometric composition and filterability has been demonstrated.

На кафедре технологии стекла и керамики проводятся исследования по регулированию структурообразования глинистых дисперсий на основе местного сырья с целью получения керамических изделий с высокими технико-экономическими показателями. Глины белорусских месторождений различаются по химико-минералогическому составу и физическим свойствам, и поэтому необходимо установление закономерностей между составом, структурой, технологическими свойствами исходного сырья и процессами структурообразования. Одним из направлений этих исследований является изучение воздействия микроорганизмов.

Ранее нами было показано [1], что культуральная жидкость *Bacillus mucilaginosus* оказывает влияние на реологические, структурно-механические и сушильные свойства глины: возрастает содержание тонкодисперсных частиц, увеличивается пластичность, повышается прочность сухих и обожженных образцов из этой глины. Это может быть обусловлено непосредственным ферментативным воздействием на минералы, влиянием продуктов метаболизма, прежде всего органических кислот и экзополисахаридов, приводящих к диспергированию силикатов за счет процессов комплексообразования с ионами металлов.

Попытки выделения из образцов глин белорусских месторождений микроорганизмов, способных к разложению силикатов [2], привели к накоплению большого количества культур, каждая из которых, будучи выделенной в чистом виде и размноженной на жидкой питательной среде, оказывает в большей или меньшей степени воздействие на свойства глинистых дисперсий.

Следует, однако, отметить, что организация производства микробных препаратов из чистой культуры в условиях керамического производства связана со значительными затратами. Вместе с тем было замечено, что в условиях обработки глинистых суспензий и пластических масс культуральной жидкостью *Bacillus mucilaginosus* и выделенных культур существенно активизируется естественная микрофлора глин.