

- siella выделяют индоллил-3-уксусную кислоту // Там же.—1990.—6, № 6.— С. 93—95.
3. Кайзер К., Мюррей Н., Дэвис Р. В. Клонирование ДНК. Методы.—М.: Мир, 1988.— 538 с.
 4. Клонирование и характеристика гена *recA* из *Pseudomonas aeruginosa* / Е. Н. Зайцев, Е. М. Зайцева, И. В. Бахланова и др. // Генетика.—1986.—22, № 11.—С. 2721—2727.
 5. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—110.
 6. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Ibid.—1982.—19, N 3.—P. 295—268.
 7. Горовиц Р. Л., Солонин А. С. Плазмидные векторы «инсерционной инактивации» маркера устойчивости к триметоприму // Генетика.—1987.—23, № 3.— С. 397—404.
 8. Fellay R., Frey J., Krisch H. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria // Gene.—1987.—52, N 2.—P. 147—154.
 9. Isolation and properties of a new site-specific endonuclease *BmeI421* from *Bacillus megaterium* 142 / A. A. Fomenkov, V. M. Gramarov, L. V. Andreev et al. // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 21.—P. 10399.
 10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—477 с.
 11. Алексеев М. Ф., Гуньковская И. В. Метод быстрой трансформации энтеробактерий и некоторые факторы, влияющие на его эффективность // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.— С. 47—51.
 12. Патон Е. Б. Механизмы регуляции экспрессии генов рибосомных белков L11, L1, L10 и L7/12 *Escherichia coli*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1990.—44 с.
 13. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
 14. Characterization of the genes coding for the *EcoRV* restriction and modification system of *Escherichia coli* / L. Bougeleret, M. Schwarzstein, A. Tsugita, M. Zabeau // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 8.—P. 3659—3676.
 15. Plasmid vector *pBR322* and its special-purpose derivatives. A review / P. Balbas, X. Soberon, E. Merino et al. // Gene.—1986.—50, N 1.—P. 3—40.
 16. A bacterial clone synthesising proinsulin / L. Villa-Komaroff, A. Efstradiadis, S. Broome et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1978.—75, N 8.—P. 3727—3731.
 17. Maloy S. R., Nunn S. R. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1981.—145, N 2.—P. 1110—1112.
 18. Craine B. L. Novel selection for tetracycline- or chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* // Ibid.—1982.—151, N 1.—P. 487—490.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев
Ин-т биохимии и физиологии
микроорганизмов АН РФ, Пушкино

Получено 01.04.92

УДК 577.21

**Т. Н. Шевченко, А. В. Рой, А. Ю. Мирюта,
Н. А. Клименко, Т. П. Перерва**

СКРИНИНГ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК В ШТАММАХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

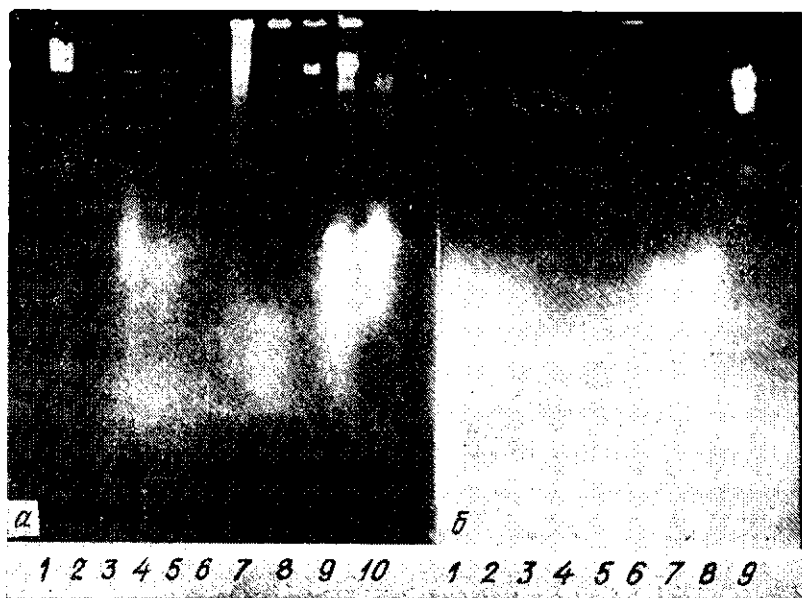
Ряд штаммов *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Ps. putida* проанализирован с целью детекции плазмидных ДНК. Показано, что штаммы, обладающие способностью утилизировать поверхностно-активные вещества, содержат плазмидные ДНК. Это же свойство в отношении мочевины не коррелирует с наличием плазмид и, по-видимому, кодируется хромосомными генами.

Введение. Очистка сточных вод промышленных предприятий от вредных примесей — важная экономическая задача, решение которой представляется весьма перспективным с использованием микроорганизмов. В настоящее время для утилизации поверхностно-активных веществ, а также мочевины, являющихся загрязняющими примесями сточных вод

© Т. М. Шевченко, А. В. Рой, А. Ю. Мирюта, Н. А. Клименко, Т. П. Перерва, 1992

предприятий легкой промышленности, в очистных сооружениях используется несколько видов микроорганизмов, среди которых наиболее распространены различные штаммы родов *Pseudomonas*, *Bacillus*. Для повышения способности к биодegradации таких штаммов путем генетической модификации существенным является поиск внехромосомных генетических детерминант, определяющих этот процесс. В связи с вышесказанным мы провели скрининг плазмидных ДНК в штаммах, выделенных из сточных вод промышленных предприятий.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *Ps. putida*, *Ps. alcaligenes*, *B. subtilis* из коллекции НТИЦ «Водообработка» ИКХВ



Скрининг плазмидных ДНК в штаммах микроорганизмов: а—микроорганизмы, выращенные в среде, содержащей синтанол (1—*Ps. putida* 1; 2—*B. subtilis* SHgW; 3—*B. subtilis* 9; 4—*B. subtilis* 11; 5—*B. subtilis* AT8; 6—*Ps. putida* 36; 7—*Ps. alcaligenes* 81; 8—*Ps. alcaligenes* 3; 9—*Ps. putida* 101; 10—*Ps. alcaligenes* 95); б—то же без синтанола (1—*Ps. putida* 1; 2—*B. subtilis* SHgW; 3—*B. subtilis* 9; 4—*B. subtilis* 11; 5—*B. subtilis* SHgW, трансформированная плазмидной ДНК из *B. subtilis* 9; 6—*Ps. putida* 36; 7—*Ps. alcaligenes* 81; 8—*B. subtilis* SHgW, трансформированная плазмидной ДНК из *B. subtilis* 11; 9—ДНК фага λ , рестрицированная *Hind*III)

АН Украины. Микроорганизмы выращивали в солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 16; K_2HPO_4 — 4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2; цитрат Na — 1; MgSO_4 — 1; глюкоза — 2; а также синтанол — 5 и мочевина — 1—5. Плазмидные ДНК выделяли по методу [1]; электрофоретическое разделение осуществляли в 0,8 %-м агарозном геле; трансформацию *B. subtilis* — согласно [2].

Результаты и обсуждение. Скрининг плазмидных ДНК проводили в бактериальных штаммах, выделенных из сточных вод предприятий легкой промышленности. Для этой цели использовали коллекцию штаммов *Ps. putida*, *Ps. alcaligenes*, *B. subtilis*. В процессе анализа обнаружено несколько штаммов микроорганизмов, содержащих внехромосомные генетические детерминанты (рисунок). При длительном пассировании штаммов *Ps. putida*, *Ps. alcaligenes* в культуральной среде, не содержащей поверхностно-активных веществ, таких, например, как синтанол, наблюдали элиминацию плазмидных ДНК в штаммах *Ps. putida* 1, *B. subtilis* 9, *B. subtilis* 11, что может служить косвенным доказательством возможного участия выявленных нами плазмидных детерминант в биодegradации синтанола. В то же время исключение из культуральной среды мочевины не сопровождалось появлением бесплазмидных колоний изучаемых штаммов.

Важной особенностью, на наш взгляд, является наличие плазмидных ДНК, предположительно задействованных в процессе биodeградации поверхностно-активного вещества синтанола, в штаммах *B. subtilis*. Известно, что штаммы *B. subtilis* наряду с *Escherichia coli* наиболее часто используются в биотехнологии. В связи с этим мы исследовали способность ДНК плазмиды, выделенной из штамма *B. subtilis* 9 и обозначенной нами *pMA9*, трансформировать бесплазмидные штаммы *B. subtilis* *SHgW*. Трансформанты отбирали на агаризованной среде, содержащей синтанол в концентрации 10 мг/мл и подавляющей рост бесплазмидных штаммов. После стандартной процедуры трансформации штаммов *B. subtilis* изучали наличие плазмидных ДНК в трансформированных штаммах. Оказалось, что обнаруженные плазмидные ДНК способны трансформировать клетки штаммов *B. subtilis* *HSgW* и стабильно поддерживаться в клетках в условиях селективного давления.

Эти наблюдения открывают перспективы в создании векторных молекул для *B. subtilis* на основе геномов плазмид *pMA9*, *pMA10*.

Сравнивая полученные нами результаты с опубликованными ранее, следует отметить, что в ряде штаммов *Ps. putida* обнаружены также плазмидные ДНК, участвующие в биodeградации амфолитных поверхностно-активных веществ [3]. В дальнейшем представляется интересным выделение непосредственно генов, детерминирующих биodeградацию синтанола. Исследования в этом направлении проводятся нами в настоящее время.

Summary. A member of *B. subtilis*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. putida* strains has been analyzed to detect plasmid DNAs. The authors have showed, the strains capable to utilize the surface-active substances to contain plasmid DNAs. The utilization of urea does not correlate with plasmid carrying and appears to be coded by chromosomal genes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харди К. Дж. Выделение бактериальных плазмид / Плазмиды. Методы.— М.: Мир, 1990.— С. 11—18.
2. Spizizen J., Reilly B. E., Evans A. H. Requirements for transformation in *B. subtilis*// Ann. Rev. Microbiol.— 1966.— 20, N 1.— P. 341.
3. Таранова А. А., Овчаров А. Ф., Ротмистров М. Н. Бактериальная деструкция амфолитных поверхностно-активных веществ // Биотехнология.— 1990. № 4.— С. 31—33.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев
Ин-т коллоид. химии и химии воды
АН Украины, Киев

Получено 18.02.92