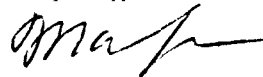


На правах рукописи



**Жарикова
Наталья Владимировна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
D-ПЛАЗМИД ШТАММОВ РОДА *RAOULTELLA***

03.00.03. - Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа 2005

Работа выполнена в Институте биологии Уфимского научного центра
Российской академии наук

Научные руководители: кандидат биологических наук
Маркушева Татьяна Вячеславовна

кандидат биологических наук
Журенко Евгения Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Чемерис Алексей Викторович

доктор технических наук, профессор
Ягафарова Гузель Габдулловна

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов
Пермского научного центра Уральского
отделения РАН

Защита диссертации состоится «30» ноября 2005 г. в 14 часов на заседании
Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01. при Институте
биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054,
г. Уфа, проспект Октября, 71

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского
научного центра РАН

Автореферат разослан «29» октября 2005 г.

Ученый секретарь Регионального
диссертационного совета, к.б.н.



Бикбулатова С.М.

2006-4

21940.97
3

18861

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Известно, что микробная конверсия является основным процессом, приводящим к вовлечению в обмен веществ сложно утилизируемых синтетических производных. Высокий метаболический потенциал и пластичность бактерий загрязненных биотопов в значительной степени обусловлены наличием в их клетках экстрахромосомных генетических элементов. Отмечено, что на уровне плазмидных генов, контролирующих первичные этапы окисления субстратов, происходит формирование и эволюция новых субстратных специфичностей, в то время как гены центральных путей часто имеют хромосомную локализацию.

До настоящего времени исследования разнообразия молекулярно-генетических систем метаболизма хлорароматических соединений касались в основном плазмиды pJP4 штамма *Ralstonia eutropha* JMP134 (Don et al., 1985; Plumeier et al., 2002; Trefault et al., 2004) и организация большинства катаболических плазмид остается неизвестной.

Цель и задачи исследования.

Цель настоящей работы - выявить особенности структурно-функциональной организации плазмидных систем деградации хлорфеноксиуксусных кислот новых природных штаммов бактерий.

Задачи:

1. идентифицировать штаммы-деструкторы хлорфеноксиуксусных кислот согласно молекулярным критериям систематики;
2. исследовать пути метаболизма молекул хлорфеноксиуксусных кислот и получить количественные и качественные характеристики процессов конверсии субстрата;
3. выявить роль плазмид в генетическом контроле деградации хлорфеноксиуксусных кислот;



4. изучить структурно-функциональные особенности плазмид катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот, а именно:

4.1. установить размер и характер полиморфизма длин рестрикционных фрагментов плазмид;

4.2. показать плазмидное детерминирование процессов деградации хлорфеноксиуксусных кислот, а также устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов;

4.3. определить возможность горизонтального переноса плазмид и их экспрессии в разных бактериальных хозяевах;

4.4. выявить уровень гомологии плазмид с модельной плазмидой pJP4 штамма *Ralstonia eutropha* JMP134.

Научная новизна исследования. Выделено 3 новых штамма бактерий-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот. Установлено, что последовательности генов 16S рРНК штаммов идентичны и наиболее близки к последовательности типового штамма рода *Raoultella* вида *planticola*. На примере штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T впервые описаны процессы использования молекул 4-ХФУК (4-хлорфеноксиуксусной кислоты), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты) и 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты) в качестве источников углерода и энергии для представителей рода *Raoultella*. Среди метаболитов были выявлены хлорфеноксиуксусная, феноксиуксусная и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновая кислоты. Установлено, что деградация хлорфеноксиуксусных кислот *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T находится под контролем плазмид, которые получили следующие обозначения: pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T, соответственно. Эти плазмиды были классифицированы как новые D-плазмиды. Обнаружен полиморфизм вышеуказанных плазмид по *Bam*HI-, *Hind*III- и *Pst*I- сайтам рестрикции и определены их размеры, которые составили для pRP33-4ch и pRP36T – 110 тпн, а для pRP36D – 127 тпн. Выявлено, что на исследованных плазмидах также расположены детерминанты

резистентности к антибиотикам и солям тяжелых металлов. Установлено, что плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T являются конъюгативными и способны экспрессировать катаболические функции, а также функции резистентности к антибиотикам и солям тяжелых металлов в различных бактериальных хозяевах. Выявлено, что плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T не имеют существенной гомологии с плазмидой деградации 2,4-Д pJP4 *Ralstonia eutropha* JMP134.

Практическая значимость работы. Полученные данные раскрывают особенности организации молекулярно-генетических систем катаболизма хлорированных феноксиуксусных кислот и вносят вклад в понимание процессов функционирования путей деградации ксенобиотиков. Выделенные штаммы и их плазмиды могут быть применены для создания штаммов-деструкторов *in vitro*, а также в разработках перспективных технологий очистки окружающей среды.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались и обсуждались в ходе работы VIII-го Экологического конгресса (Корея, 2002), Первого конгресса европейских микробиологов (Словения, 2003), конференции ELSO (Германия, 2003), I-го Международного конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002), 2-го Международного Семинара-школы «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии» (Москва, 2004), 7-ой и 9-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2003, 2005), международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды» (Саратов, 2005).

Гранты. Работа была проведена при содействии Программы Президиума РАН «Поддержка молодых ученых», РФФИ №02-04-97911, и трех Грантов ФЦП «Интеграция науки и высшего образования России», в том числе, исследовательского гранта Э0029, гранта № 3 4312 на проведение стажировки и гранта № Д 3278/12742003 для участия в работе Первого Конгресса европейских микробиологов (Словения, Любляна 2003г).

Публикации. Результаты диссертации изложены в 10 печатных работах.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы. Диссертация изложена на 114 страницах, содержит 20 рисунков и 11 таблиц. Библиография включает 171 наименование, из них 12 отечественных и 159 зарубежных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили природные штаммы бактерий, выделенные из смешанных популяций почвенных экотопов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства.

Бактериальные культуры были идентифицированы согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Для выявления основных морфологических и морфометрических характеристик клеток и их структурно-популяционных особенностей использовали современные методы электронной микроскопии. Работу проводили на электронном микроскопе H-300 «Hitachi».

Идентификацию штаммов согласно молекулярным критериям осуществляли на основе секвенирования генов 16S рРНК с использованием универсальных праймеров (Edwards et al., 1989). Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов был проведен с помощью сервера BLASTA. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTALW. Построение бескорневых филогенетических деревьев исследуемых бактерий производили с помощью методов, реализованных в пакете программ TREECON.

Анализ содержания хлорированных феноксиуксусных кислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству «Методы определения микроколичеств пестицидов» с небольшими модификациями.

Продукты метаболизма хлорфеноксисуксусных кислот идентифицировали методом хромато-масс-спектрометрии, анализируя совокупность данных о сроках удерживания соединений в хроматографической колонке и данных анализа масс-спектров, основанных на зависимости структура – характер распада. Работу проводили на хромато-масс-спектрометре NERMAG R-30-10 с хроматографом Carlo Erba MEGA 5360. Полученные данные интерпретировали, используя систему обработки данных MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138000 масс-спектров Base Date WILEY138L.

Определение устойчивости исследуемых штаммов к антибиотикам проводили методом диффузии в агар с применением дисков (Лабинская, 1978).

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса, с небольшими модификациями. Ферментативное расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции и фракционирование методом электрофореза проводили по стандартным методикам (Маниатис и др., 1984). Элиминацию плазмид индуцировали акридиновым оранжевым (Герхард, 1990).

Для проведения трансформации использовали штамм *Escherichia coli* HB101. Компетентные клетки готовили по традиционным методам (Sambrook et.al., 1989). Конъюгацию клеток бактерий осуществляли согласно принципам, изложенным в руководстве «Методы общей бактериологии» (1984), с небольшими модификациями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация штаммов 33-4ch, 36D и 36T на основе морфолого-морфометрических, физиолого-биохимических признаков и анализа последовательностей генов 16S рНК. Выявление индивидуальных морфологических и морфометрических характеристик клеток исследуемых штаммов показало, что на момент анализа микробные популяции образцов 33-4ch (~88% от общего числа клеток популяции), 36D (~95%), 36T (~93%) была представлена молодыми и зрелыми клетками правильной или слегка искривленной формы овалов и коротких палочек размерами 0,46-0,47/0,9-1,32

мкм, 0,46-0,47/0,72-1,16 мкм и 0,44/0,6-2,1 мкм, соответственно. Молодые клетки имели плотно упакованную структуру и высокую электроннооптическую плотность, в то время как для старых и лизированных клеток была характерна рыхлая цитоплазма и более низкая электроннооптическая плотность (рис. 1).

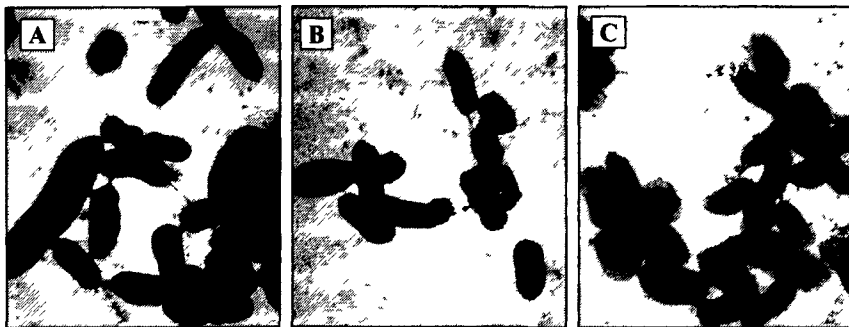


Рис. 1. Электронно-микроскопические изображения клеток микробных популяций штаммов (X 18000): А - 33-4ch, В - 36D, С - 36Т.

Установлено, что клетки исследуемых штаммов на плотных средах образовывали крупные гладкие блестящие колонии выпуклой формы слизистой консистенции. Оптимальный рост культур наблюдался в пределах от +22°C до +37°C, при значениях pH, близких к нейтральным. Окраска по Грамму отрицательная. Определено отношение штаммов к различным источникам углерода, оксидазная, каталазная и другие активности.

Первичный анализ секвенированных фрагментов, содержащих переменные участки нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК, показал, что штаммы принадлежат к филогенетической подгруппе энтеробактерий гамма-подкласса протеобактерий. Для окончательного анализа были секвенированы почти полные последовательности (не менее 1400 нуклеотидов, соответствующие позициям 42-1481 тпн по номенклатуре *E.coli*) генов 16S рРНК. На основании сравнительного филогенетического анализа изучаемых последовательностей с привлечением ресурсов GenBank было показано, что последовательности генов 16S рРНК исследуемых штаммов

идентичны и входят в кластер видов рода *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* и *Raoultella trevisanii*, в котором наиболее близким к ним является типовой штамм вида *Raoultella planticola* (99.8%). Такой уровень сходства соответствует внутривидовому для *R. planticola* (99,8%) (рис. 2).

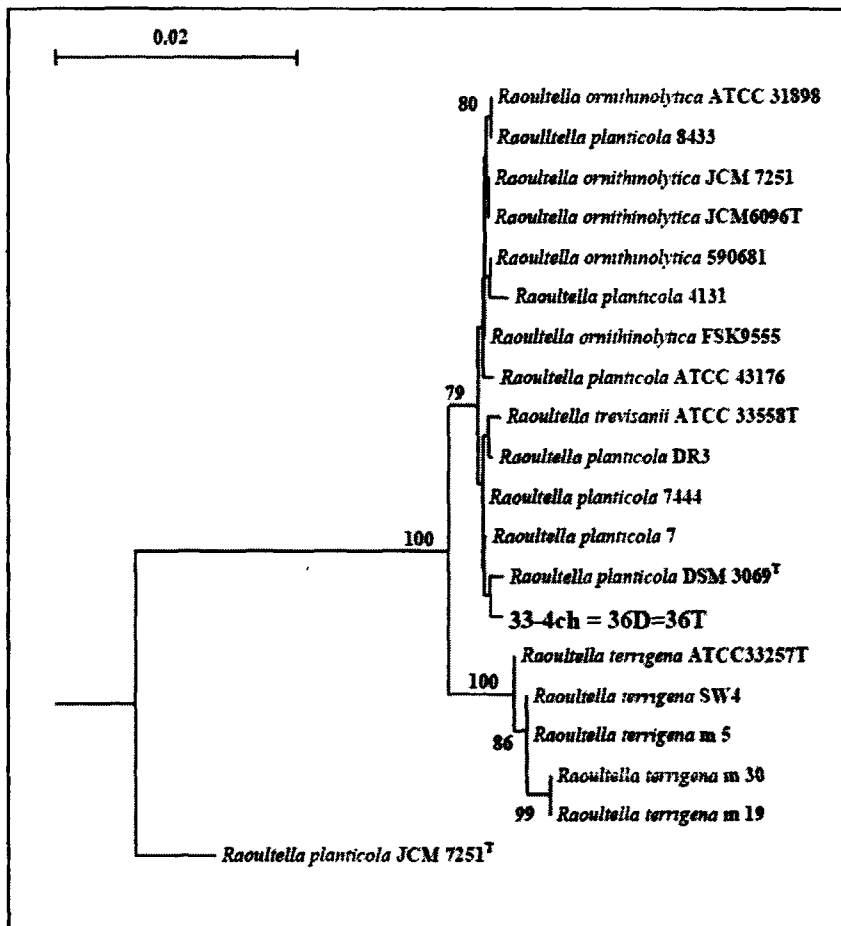


Рис. 2. Филогенетическое положение штаммов по последовательности гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2-м нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap" – анализа (значащими признаются величины показателя "bootstrap" более 50).

Согласно совокупности морфолого-морфометрических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических характеристик исследуемые культуры были дифференцированы как штаммы рода *Raoultella* вида *planticola*.

Динамика конверсии молекул хлорфеноксиуксусных кислот *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т в периодической культуре. На рис. 3 представлены графики, отражающие динамику конверсии хлорфеноксиуксусных кислот и накопления биомассы штаммов в зависимости от времени их инкубации.

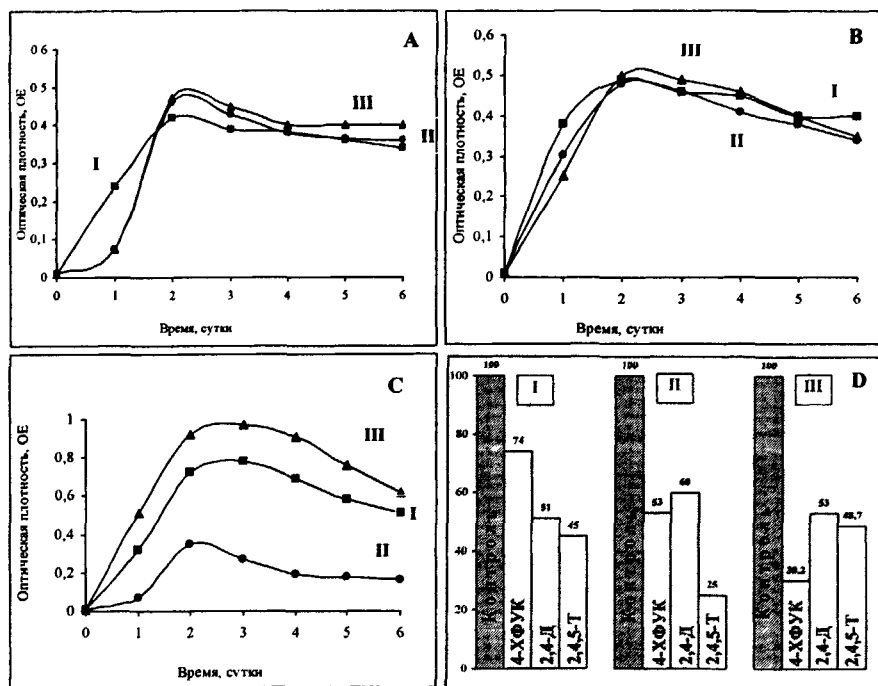


Рис. 3. Динамика роста штаммов *R. planticola* 33-4ch (A), *R. planticola* 36D (B) и *R. planticola* 36Т (C) в условиях использования в качестве источников углерода и энергии 4-ХФУК (I), 2,4-Д (II) и 2,4,5-Т (III). Оценка остаточного количества хлорфеноксиуксусных кислот (%) в среде культивирования (D).

Из приведенных данных следует, что *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T могут быть отнесены к штаммам-деструкторам. Следует отметить, что ранее деструкторы хлорфеноксиуксусных кислот, принадлежащие к роду *Raoultella*, выявлены не были.

Анализ этапов катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот штаммов *Raoultella planticola* 33-4ch, *Raoultella planticola* 36D и *Raoultella planticola* 36T. Исследование характера промежуточных продуктов превращения молекул ксенобиотиков, наблюдаемых в среде культивирования штаммов в периодической культуре, позволило идентифицировать среди ключевых метаболитов хлорфеноксиуксусную, феноксиуксусную и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновую кислоты. Эти данные свидетельствуют о том, что конверсия хлорзамещенных феноксиуксусных кислот штаммами *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T осуществляется сходным образом и проходит через одинаковые промежуточные соединения (рис. 4).

Представляется интересным и то, что штаммы *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T полностью дехлорируют все три субстрата до открытия ароматического кольца. В отличие от 2,4,5-Т и 4-ХФУК, для которых подобный путь метаболизма известен, полное дехлорирование 2,4-Д до расщепления ароматического кольца ранее не описывалось. Кроме этого, образование молекул 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты в ходе конверсии 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т, указывает на то, что у исследованных штаммов расщепление ароматического кольца происходит не по *орто*-пути, который характерен для деградации хлорароматических соединений, а по *мета*-пути, который был установлен для ограниченного числа микроорганизмов-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот. Для бактерий, выполняющих диссимиляцию 2,4,5-Т, *мета*-путь до настоящего времени описан не был.

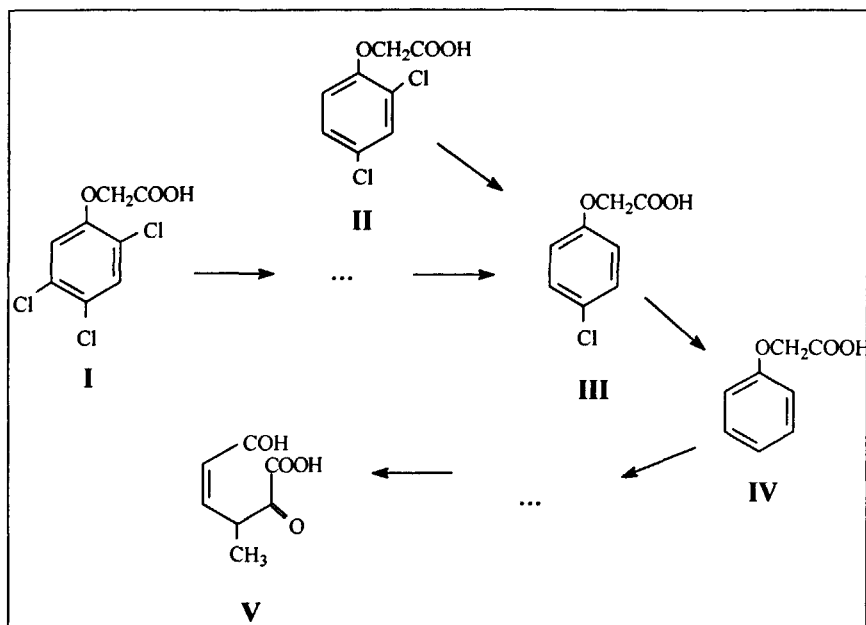
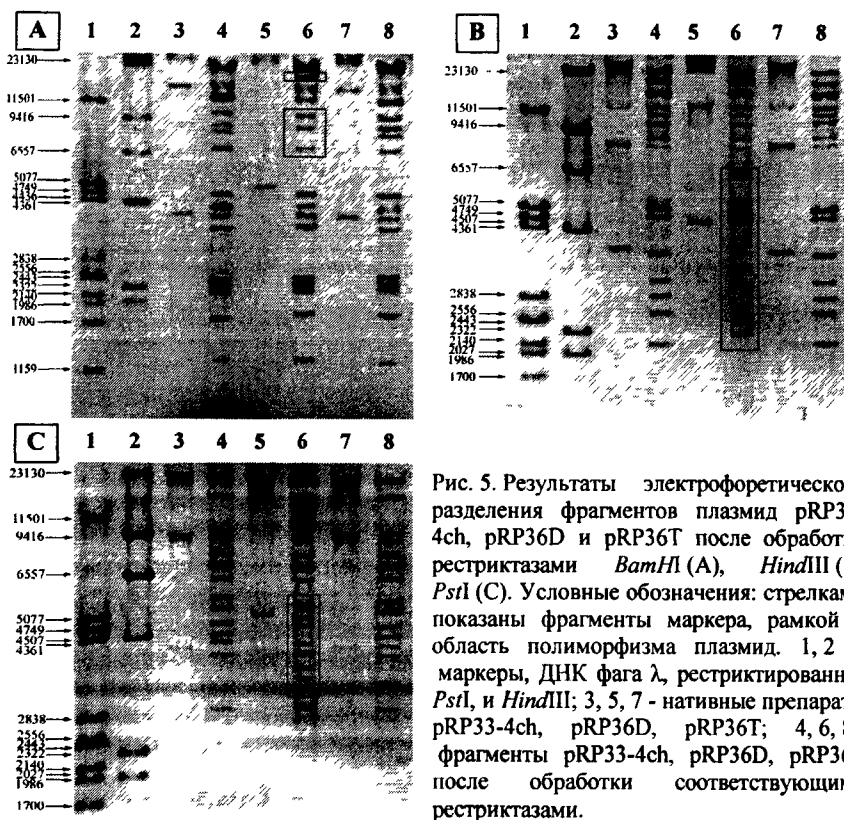


Рис. 4. Схема метаболизма 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T. I - 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота; II - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; III - 4-хлорфеноксиуксусная кислота; IV - феноксиуксусная кислота; V - 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновая кислота.

Анализ плазмидного статуса клеток *Raoultella planticola* 33-4ch, *Raoultella planticola* 36D и *Raoultella planticola* 36T. С использованием метода щелочного лизиса из клеток штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T были выделены плазмиды, обозначенные pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T, соответственно. RFLP-анализ показал, что все три плазмиды имеют *Bam*H I -, *Hind* III - и *Pst* I - сайты рестрикции, при этом у плазмид pRP33-4ch и pRP36T обнаруживаются идентичные профили фрагментов ДНК, в то время как для pRP36D характерны существенные отличия (рис. 5).

На основании полученных данных были определены размеры плазмид, которые составили для pRP33-4ch и pRP36T – 110 тпн, а для pRP36D – 127 тпн.



Участие плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T в генетическом контроле деградации хлорфеноксиуксусных кислот. Для локализации генетических детерминант деградации хлорфеноксиуксусных кислот *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T использовали метод дискриминации признака. Элиминацию плазмид из клеток бактерий индуцировали обработкой микроорганизмов ДНК – тропным агентом – акридиновым оранжевым.

Было установлено, что с потерей плазмид все исследованные штаммы утрачивали способность использовать 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что детерминанты катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот расположены на плаزمидах pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T. Поэтому данные плазмиды могут быть классифицированы как плазмиды деградации или D-плазмиды.

Локализация детерминант резистентности к антибиотикам и солям тяжелых металлов на плазмидах pRP33-4ch pRP36D и pRP36T. Сравнительное тестирование клеток *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T и их бесплазмидных вариантов на селективных средах показало, что плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T несут общие детерминанты устойчивости к антибиотикам: тетрациклину, хлорамфениколу и канамицину (табл. 1).

Таблица 1

Результаты тестирования признаков устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D, *R. planticola* 36T

№	Признак	<i>R. planticola</i> 33-4ch		<i>R. planticola</i> 36D		<i>R. planticola</i> 36T	
		pRP33-4ch ⁺	pRP33-4ch ⁻	pRP36D ⁺	pRP36D ⁻	pRP36T ⁺	pRP36T ⁻
1	tet	+	-	+	-	+	-
2	cat	+	-	+	-	+	-
3	kan	+	-	+	-	+	-
4	bio	-	-	+	-	-	-
5	str	-	-	+	-	-	-
6	Cu ²⁺	+	-	+	-	+	-
7	Fe ³⁺	+	-	+	-	+	-
8	Cd ²⁺	+	-	+	-	+	-
9	Co ²⁺	+	-	-	-	-	-
10	Ag ⁺	-	-	-	-	+	-
11	Cr ²⁺	-	-	+	-	-	-

Условные обозначения: + - устойчив; - чувствителен; tet - тетрацилин; cat - хлорамфеникол; kan - канамицин; bio - биомитин; str - стрептомицин.

Плазмида pRP36D содержит также дополнительные гены резистентности к биомицину и стрептомицину. Гены устойчивости к меди, железу и кадмию присутствуют на всех трех плазмидах. В то же время, устойчивость к кобальту характерна только для pRP33-4ch, резистентность к серебру свойственна для pRP36T, а устойчивость к хромю – для pRP36D.

Таким образом, плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T имеют значительные структурно-функциональные различия относительно признаков устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов.

Горизонтальный перенос плазмид RP33-4ch, pRP36D и pRP36T и экспрессия функций катаболизма и резистентности к антибиотикам и тяжелым металлам в других бактериальных хозяевах. Результаты исследования способности плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T к трансферу и экспрессии катаболических функций и функций устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов в различных хозяевах приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Результаты скрининга трансформированных штаммов E. coli HB101

Штамм-реципиент	Плазмида	Генотип трансформированных клеток
E.coli HB101	pRP33-4ch	tet ⁺ , kan ⁺ , cat ⁺ cop ⁺ , iron ⁺ , cad ⁺ , cob ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
	pRP36D	tet ⁺ , kan ⁺ , bio ⁺ , cat ⁺ , str ⁺ cop ⁺ , iron ⁺ , cad ⁺ , chr ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
	pRP36T	tet ⁺ , kan ⁺ , cat ⁺ cop ⁺ , iron ⁺ , cad ⁺ , arg ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺

Условные обозначения: tet⁺ – детерминанты устойчивости к тетрациклину; cat⁺ – хлорамфениколу; kan⁺ – канамицину; bio⁺ – биомицину; str⁺ – стрептомицину; cop⁺ – гены устойчивости к катиону Cu²⁺; iron⁺ – Fe³⁺; cad⁺ – Cd²⁺; cob⁺ – Co²⁺; chr⁺ – Cr²⁺; arg⁺ – Ag⁺, tfd – гены катаболизма 2,4-Д, tft – гены катаболизма 2,4,5-Т, tcp – гены катаболизма 4-ХФУК.

Как видно из данных таблицы 2, в трансформированных клетках *E. coli* HB101 наблюдалась экспрессия функций деградации хлорфеноксиуксусных кислот, а также устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов, контролируемых плазмидами pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T.

Таблица 3

Результаты анализа конъюгативного переноса плазмид
pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T в условиях чистой культуры

Штамм-реципиент	Штамм-донор	Наличие трансконъюгантов	Генотип трансформированных клеток
<i>R. planticola</i> 36T	<i>R. planticola</i> 33-4ch	+	kan ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
	<i>R. planticola</i> 36D	+	bio ⁺ cad ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
<i>Citrobacter hydrophila</i> IBRB-36 4CPA	<i>R. planticola</i> 33-4ch	–	–
	<i>R. planticola</i> 36D	–	–
	<i>R. planticola</i> 36T	–	–
<i>Serratia marcescens</i> IBRB-22S	<i>R. planticola</i> 33-4ch	–	–
	<i>R. planticola</i> 36D	–	–
	<i>R. planticola</i> 36T	–	–
<i>Gluconobacter oxydans</i> IBRB-2T	<i>R. planticola</i> 33-4ch	+	tet ⁺ cob ⁺ , cad ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
	<i>R. planticola</i> 36D	+	cat ⁺ cad ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺
	<i>R. planticola</i> 36T	+	tet ⁺ arg ⁺ tfd ⁺ , tft ⁺ , tcp ⁺

Условные обозначения: tet⁺ – детерминанты устойчивости к тетрациклину; cat⁺ – хлорамфениколу; kan⁺ – канамицину; bio⁺ – биомицину; cob⁺ – гены устойчивости к катиону Co²⁺; cad⁺ – Cd²⁺; arg⁺ – Ag⁺.

Конъюгативный перенос плазмид pRP33-4ch и pRP36D в клетки родственного штамма *R. planticola* 36T в модельной системе показал, что все трансконъюганты экспрессировали генотипы, соответствующие донорским плазмидам. Сходный результат был получен и для штамма *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, в то время как переход плазмид pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T

в клетки штаммов *Citrobacter hydrophila* IBRB-36 4CPA и *Serratia marcescens* IBRB-22S не наблюдался.

Таким образом, результаты исследования показали возможность трансфера кatabолических плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T в клетки других штаммов, при этом экспрессия кatabолических генов деградации хлорфеноксиуксусных кислот и функций устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов в новом хозяине осуществлялась в полном объеме.

Дот-блот гибридизация препаратов плазмид pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T и pJP4.

Принимая во внимание то, что к настоящему времени генетическая организация бактериальной деградации хлорфеноксиуксусных кислот достаточно подробно исследована только для кatabолической плазмиды деградации 2,4-Д - pJP4 штамма *Ralstonia eutropha* JMP134, была проведена оценка уровня гомологии между плазмидами pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T и модельной плазмидой pJP4. Результаты представлены на рисунке 6.

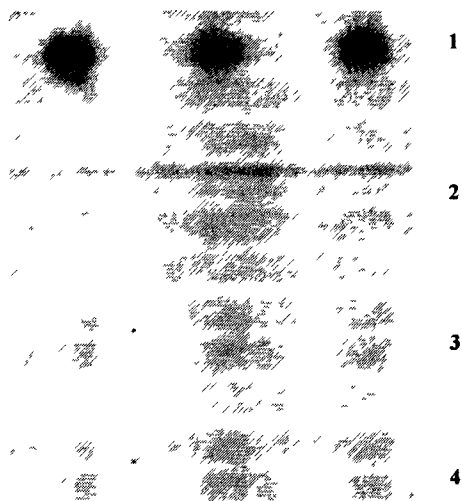


Рис. 6. Результаты дот-блот-гибридизации препаратов плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T с зондом ^{32}P -pJP4.

1 - контроль (pJP4), 2 - pRP33-4ch, 3 - pRP36D, 4 - pRP36T.

Плазмида рJP4 была любезно предоставлена для работы профессором Sabine Kleinsteuber (Centre for Department of Environmental Microbiology, Germany). Поиск гомологии нуклеиновых последовательностей выполнялся методом дот-блот гибридизации. В качестве зонда использовали плазмиду рJP4, меченную ³²P. Для достоверности опыт проводили в трех повторах, контролем в эксперименте служил препарат плазмиды рJP4.

На основании приведенных результатов, можно сделать вывод о том, что гомология исследуемых плазмид рRP33-4ch, рRP36D и рRP36T с модельной плазмидой рJP4 является незначительной. Эти данные можно рассматривать как аргумент в пользу того, что плазмиды рRP33-4ch, рRP36D и рRP36T имеют существенные отличия от плазмиды рJP4.

ВЫВОДЫ

1. Выделены новые штаммы-деструкторы, отнесенные согласно молекулярным критериям систематики к роду *Raoultella* виду *planticola*.
2. Впервые установлены этапы метаболизма 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т для штаммов *R. planticola*. Показано, что катаболизм 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т этих штаммов происходит с образованием хлорфеноксиуксусной, феноксиуксусной и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислот.
3. Впервые идентифицированы и определены размеры плазмид штаммов-деструкторов *Raoultella planticola* 33-4ch, *Raoultella planticola* 36D и *Raoultella planticola* 36T, получивших следующие обозначения: pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T, соответственно.
4. Показано, что на плазмидах pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T расположены генетические детерминанты конверсии молекул хлорфеноксиуксусных кислот, устойчивости к антибиотикам и солям тяжелых металлов, что позволило классифицировать данные плазмиды как новые D-плазмиды бактерий.
5. Выявлено, что плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T способны к горизонтальному переносу и экспрессии функций катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот, резистентности к антибиотикам и солям тяжелых металлов в других бактериальных хозяевах.
6. Установлено, что плазмиды pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T имеют существенные структурно - функциональные отличия от плазмиды pJP4 *Ralstonia eutropha* JMP134.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Markusheva T.V., Zhurenko E. Yu., Galkin E.G., Korobov V.V., Zharikova N.V. Ecosystems exposed to anthropogenic pollutants action: biodiversity of soil bacteria – destructors // VIII Congress of Ecology. - Korea, 2002. - P. 19.
2. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Маджар В.В., Жарикова Н.В., Калимуллина Э.Р., Гафиятова Л.Р., Маркушева Т.В. Микроорганизмы для очистки окружающей среды // 1-й Международный конгресс «Биотехнология – состояние и перспективы развития». - Москва, 2002. - С. 276.
3. Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2Т - деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // Биотехнология. - 2003. - № 6. - С. 67-71.
4. Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р., Коробов В.В., Галкин Е.Г., Маджар В.В., Михалев А.А., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В. Плазмиды штаммов-деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот бактерий рода *Klebsiella* // Тезисы докладов 7-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Пушкино, 2003. - С. 273.
5. Zharikova N.V., Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Gafiyatova L.R., Michalev A.A., Madjar V.V., Galkin E.G., Markusheva T.V. Bacteria-degrading phenol and its chlorinated derivatives // First FEMS Congress of European Microbiologists. - Slovenia, 2003. - P. 430.
6. Zharikova N.V., Gafiyatova L.R., Korobov V.V., Galkin E.G., Madjar V.V., Zhurenko E.Yu., Markusheva T.V. Plasmids of *Klebsiella* strains-degrading chlorophenoxyacetic acids // ELSO Meeting. - Germany, 2003, P. 264.
7. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Идентификация и характеристика плазмиды штамма *Aeromonas hydrophila* IBRB-36-4CPA, несущей гены катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот // Генетика. – 2004. - Т. 40. - № 11. – С. 1469-1474.
8. Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В. Масс-спектрометрия в исследованиях процессов

- биологической конверсии пестицидов // Материалы 2-го международного Семинара-школы «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии». - Москва, 2004, - С. 265.
9. Гафиятова Л.Р., Жарикова Н.В., Лубянов Е.А., Логинова А.Н., Ягудин Р.А., Дремова А.Ю., Фатхиева Г.Р., Маджар В.В., Маркушева Т.В. Микроорганизмы промышленных экосистем: деструкторы хлорзамещенных ароматических кислот // Тезисы докладов 9-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». - Пушкино, 2005. - С. 196.
10. Маркушева Т.В., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Ситдикова Л.Р., Журенко Е.Ю. Идентификация и сравнительный анализ D-плазмид бактерий-деструкторов рода *Raoultella* // Материалы международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды». - Саратов, 2005 - С. 86.

Жарикова Наталья Владимировна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
D-ПЛАЗМИД ШТАММОВ РОДА *RAOULTELLA***

03 00.03 – молекулярная биология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Лиц. на издат. деят. Б848421 от 03.11.2000г. Подписано в печать 27.10.2005

Формат 60x84/16 Компьютерный набор. Гарнитура Times New Roman

Отпечатано на ризографе. Усл.печ.л – 1,5 Уч.-изд.л – 1,7

Тираж 100 экз Заказ № 133

Издательство БГПУ 450000, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а

№ 2 0 9 3 4

РНБ Русский фонд

2006-4

18861