

7. *Man de, J. S.* A medium for the cultivation of lactobacilli / J. S. de Man, M. Rogosa, M. Sharpe // *J. Appl. Bacteriol.* – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

8. *Егоров, Н. С.* Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М.: Высш. шк., 1965. – 211 с.

9. *Грудзинская, Э. И.* Выбор методики для определения протеолитической активности молочнокислых бактерий и заквасок / Э. И. Грудзинская, А. К. Максимова // *Тр. ВНИМИ.* – 1974. – Вып. 33. – С. 58–64.

10. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects / P. F. Fox [et al.] // *Adv. Food Nutr. Res.* – 1996. – Vol. 39. – P. 163–305.

11. *Smit, G.* Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese product / G. Smit, B. A. Smit, W. J. M. Engels // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29. – P. 591–610.

M. E. SAFONOVA, I. A. NAIDENKO

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM NATURAL SOURCES

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by*

The data have been presented on physiological and biochemical properties (growth, acidogenic, proteolytic and antagonistic activity, resistance to NaCl) of lactic acid bacterial strains isolated from Belarus natural sources. These strains are promising for use as starter and additional cultures for fermented dairy products, cheese.

Поступила 30.04.2015 г.

УДК 575:579.852

Н. Е. САЦУНКЕВИЧ, М. С. УГЛЯНИЦА, М. А. ТИТОК

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

*Институт микробиологии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, titok@bsu.by*

Создана оригинальная векторная конструкция pALLT, содержащая репортерный ген *lacZ* с терминатором гена *crv1*, пригодная для функционального анализа промоторных последовательностей бактерий рода *Bacillus*. С использованием генно-инженерных методов (ПЦР, клонирование, рестрикционный и секвенирующий анализ) в состав вектора pALLT перед репортерным геном

lacZ встроены промоторы генов *ypuA*, *yorB*, *ypgS* и *yheI* бактерий *B. subtilis*, транскрипция которых осуществляется в присутствии антибиотиков с различным механизмом действия. Установлено, что бактерии *B. subtilis* BD194, содержащие созданные векторные конструкции, приобретают синюю окраску на индикаторной среде с X-gal в присутствии антибиотиков, нарушающих синтез клеточной стенки (вектор с промотором гена *ypuA*), ДНК (вектор с промотором гена *yorB*), РНК (вектор с промотором гена *ypgS*) и белков (вектор с промотором гена *yheI*). Показана возможность использования бактерий *B. subtilis* BD194E, содержащих вектор с промотором гена *ypuA*, для поиска бактерий, продуцирующих нарушающие синтез клеточной стенки антибиотики.

Введение. Антибиотики представляют собой самую многочисленную группу лекарственных средств, использующихся в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Основными природными продуцентами антимикробных веществ являются почвенные микроорганизмы (грибы и бактерии). Они широко применяются в производстве антибиотиков, биопрепаратов для защиты растений от вредителей и болезней, биостимуляторов роста и развития сельскохозяйственных животных. Кроме того, продуценты антибиотиков представляют собой ценный источник практически важных генетических детерминант для генно-инженерных исследований при конструировании штаммов микроорганизмов с заданными свойствами.

Поиск природных продуцентов антибиотиков, а также анализ загрязнения антибиотиками окружающей среды является актуальной проблемой, для решения которой используется целый арсенал биохимических, иммунологических, генетических и молекулярно-генетических методов. Определенный интерес представляют методические подходы, основанные на знании транскриптомов и метаболомов бактерий. В этом плане одним из наиболее изученных объектов является *Bacillus subtilis*. Детальный генетический анализ этих бактерий позволил выявить ряд генетических детерминант, экспрессия которых индуцируется антибиотиками с разным механизмом действия (подавляющих синтез клеточной стенки и мембраны, ДНК, РНК, белков, жирных кислот).

Цель исследования – создание молекулярно-генетической тест-системы для анализа содержания антибиотиков в окружающей среде.

Материалы и методы. В работе использовали 20 штаммов природных бактерий рода *Streptomyces*, любезно предоставленных доцентом кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, канд. биол. наук О. В. Фоминой, а также коллекционные штаммы *B. subtilis* и *E. coli* (табл. 1).

В работе использовали плазмиды, характеристика которых приведена в табл. 2.

Т а б л и ц а 1. Характеристика бактерий, использованных в работе

Штамм	Характеристика	Источник
<i>B. subtilis</i> BD194	<i>recA1 trpC2</i>	[1]
<i>E. coli</i> XLI-Blue	F ⁺ : Tn10(TcR) <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacIq</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1</i> , <i>gyrA96</i> (NalR) <i>thi hsdR17</i> (rk-mk ⁺) <i>glnV44 relA1 lac</i>	[2]
<i>B. subtilis</i> 194D	<i>recA1 trpC2</i> , содержит плазмиду pASPD, сенсор для выявления антибиотиков, нарушающих синтез ДНК	Получены в данной работе
<i>B. subtilis</i> 194R	<i>recA1 trpC2</i> , сенсор для выявления антибиотиков, нарушающих синтез РНК	
<i>B. subtilis</i> 194P	<i>recA1 trpC2</i> , сенсор для выявления антибиотиков, нарушающих синтез белка	
<i>B. subtilis</i> 194E	<i>recA1 trpC2</i> , сенсор для выявления антибиотиков, нарушающих синтез клеточной стенки	

Т а б л и ц а 2. Характеристика плазмид, использованных в работе

Плазмида	Характеристика	Источник
pUC19	Ap ^R , ColE1-репликон, 2 686 п. н.	[2]
pAL1	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , 5 469 п. н.	[3]
pSLM3	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , содержит промотор гена <i>r43</i> и терминатор гена <i>cryI</i> , между которыми встроен репортерный ген <i>lacZ</i> , 8 887 п. н.	Коллекция лаборатории «ЦАГИИ»
pALLT	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , содержит репортерный ген <i>lacZ</i> и терминатор гена <i>cryI</i> , 8 844 п. н.	Получены в данной работе
pUC19:: <i>upuA</i>	Ap ^R , ColE1-репликон, промотор гена <i>upuA</i> , 3 198 п. н.	
pUC19:: <i>yvgS</i>	Ap ^R , ColE1-репликон, промотор гена <i>yvgS</i> , 2 950 п. н.	

Плазмида	Характеристика	Источник
pUC19:: <i>yvgS</i>	Ap ^R , ColE1-репликон, промотор гена <i>yvgS</i> , 2 950 п. н.	Получены в данной работе
pUC19:: <i>yheI</i>	Ap ^R , ColE1-репликон, промотор гена <i>yheI</i> , 3 192 п. н.	
pUC19:: <i>yorB</i>	Ap ^R , ColE1-репликон, промотор гена <i>yorB</i> , 3 181 п. н.	
pASPE	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , промотор гена <i>yruA</i>	
pASPR	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , промотор гена <i>yvgS</i>	
pASPP	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , промотор гена <i>yheI</i>	
pASPD	Ap ^R , Cm ^R , ColE1-репликон, репликон плазмиды pBS72 бактерий <i>B. subtilis</i> , промотор гена <i>yorB</i>	

Среды. Бактерии выращивали в полноценной среде Luria–Bertany (LB) [4]. Агаризованные среды содержали 1,5% агара.

Реактивы. В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков: рифампицина, хлорамфеникола, ампициллина, ванкомицина, доксициклина и налидиксовой кислоты. Изопропил-β-D-1-тиогалактозид (IPTG) и 5-бром-4-хлор-3 индол-β-D-галактозида (X-gal) («Thermo Scientific», ЕС) использовали в концентрации 0,5 ммоль и 25 мкг/мл соответственно. Для выделения ДНК, постановки ПЦР и рестрикционного анализа использовали реактивы производства «Thermo Scientific» (ЕС) и ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозилового метода [5].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов производства «Thermo Scientific» (ЕС) и ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь). В 50 мкл реакционной смеси входили: ДНК-матрица – 100–500 нг; праймеры – 0,2 мкмоль; смесь нуклеотидов – 0,2 ммоль; *Pfu*-полимераза – 2,5 ед.; буфер для полимеразы с 2 мМ MgSO₄.

Последовательности праймеров, использованных в работе, и режимы амплификации приведены в табл. 3 и 4.

**Т а б л и ц а 3. Последовательности праймеров,
использованных в работе**

Промотор гена	Праймер	Сайт рестрикции	Нуклеотидная последовательность*	Размер ПЦР продукта, п. н.
yorB	FyorB	SphI	5'-acatt <u>gcatg</u> cgataaagattcagaagtcttctaac-3'	495
	RyorB	PstI	5'-aaaactg <u>cgag</u> gttttgaatttttggtactactaaattatatac-3'	
yheI	FyheI	XbaI	5'-ctagt <u>tctagatt</u> tcttactatcttctcactccgcaaac-3'	506
	RyheI	BamHI	5'-cgc <u>ggatcc</u> cctcatcagccgcttctatcttttc-3'	
yvgS	Fyvg	XbaI	5'-ctagt <u>tctagat</u> gaacggcacctccagaaaaatag-3'	264
	Ryvg	BamHI	5'-cgc <u>ggatcc</u> tgtttaattggaagctgccaaac-3'	
yruA	FyruA	PstI	5'-tgt <u>tctgacag</u> gttgcttctgtttcac-3'	512
	RyruA	BamHI	5'-gtt <u>ggatcc</u> tcaatttcacaagcagc-3'	

* Последовательности сайтов рестрикции подчеркнуты и выделены жирным шрифтом.

Т а б л и ц а 4. Режимы ПЦР

Промотор гена	Праймер	Режим амплификации
yorB	FyorB RyorB	94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (3 цикла); 94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (22 цикла); 72 °C – 10 мин (1 цикл)
yheI	FyheI RyheI	94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 46 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 10 мин (1 цикл)
yvgS	Fyvg Ryvg	94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 30 с (25 циклов); 72 °C – 10 мин (1 цикл)
yruA	FyruA RyruA	94 °C – 5 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 10 мин (1 цикл)

Трансформацию бактерий E. coli, предварительно переведенных в состояние компетентности, проводили согласно [6], *трансформацию бактерий B. subtilis* – согласно [7].

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [8], а также с использованием набора для выделения плазмидной ДНК GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit («Thermo Scientific», ЕС).

Манипуляции с плазидами. Рестриктию плазмидной ДНК и лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-

изготовителем («Thermo Scientific», ЕС). Фрагменты ДНК после рестрикции и продукты амплификации элюировали из агарозного геля с использованием набора GeneJET™ Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», ЕС). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве [9]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA Ladder Mix производства «Thermo Scientific» (ЕС).

Осаждение ДНК осуществляли согласно методике, описанной в работе [10], с использованием изопропилового спирта и ацетата натрия.

Секвенирующий анализ осуществляли с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer («Li-COR Biosciences», США).

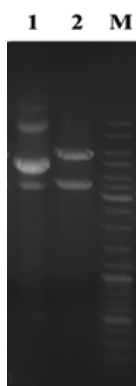
Для секвенирующей реакции использовали набор Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, «Affymetrix», США) и меченные флуоресцентной меткой стандартные праймеры M13 (ОДО «Праймтех», Беларусь). Результаты секвенирования анализировали с использованием компьютерных программ BLASTN2.2.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), программного пакета eSeq V.3.1. (Li-COR Biosciences).

Результаты и обсуждение. Анализ регуляторных последовательностей, обеспечивающих транскрипцию генетических детерминант, является важным этапом при изучении регуляции работы генов, создании систем эффективной экспрессии чужеродного генетического материала, а также при конструировании биосенсорных систем для диагностики химических соединений в окружающей среде.

Для анализа промоторных последовательностей используют репортерные гены, продукты которых легко детектируются и позволяют качественно и количественно оценить эффективность процесса транскрипции [11]. При выполнении настоящей работы в качестве репортерного маркера использовали детерминанту *lacZ*, определяющую синтез β-галактозидазы. Данный фермент обеспечивает в клетке разложение хромогенного субстрата

X-gal, в результате чего на плотной питательной среде формируются колонии, окрашенные в синий цвет.

В качестве базовой конструкции для клонирования репортерного гена использовали плазмиду pAL1 размером 5469 п. н. [3]. Данный вектор содержит ColE1-репликон, позволяющий стабильно наследоваться в клетках *E. coli*, и *rep*-область плазмиды тетра-типа pBS72, обеспечивающую поддержание в бактериях *B. subtilis*. Наличие двух маркеров антибиотикорезистентности, один из которых (ампициллин) выражается в граммотрицательных, а другой (хлорамфеникол) – в грамположительных бактериях, позволяет селективировать данный внехромосомный генетический элемент при его введении в клетки *E. coli* и *B. subtilis* соответственно. Кроме того, в состав данного вектора входит полилинкер (содержит 16 уникальных сайтов рестрикции), позволяющий встраивать чужеродные генетические детерминанты в определенной ориентации. В качестве источника репортерного гена использовали детерминанту *lacZ* из конструкции pSLM3. Следует отметить, что данная детерминанта отличалась от аналогичного гена *E. coli* присутствием RBS-сайта гена *spoVG* бактерий *B. subtilis* и нуклеотидными заменами, приводящими к изменению N-концевой последовательности β-галактозидазы [12]. За геном *lacZ* был встроены терминатор гена *cryI*. Все вышеуказанные модификации обеспечивали эффективную экспрессию данной детерминанты в клетках грамположительных бактерий.



Репортерный ген *lacZ* с терминатором гена *cryI* размером 3 396 п. н. вырезали из плазмиды pSLM3 рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI и встраивали между соответствующими сайтами полилинкера плазмиды pAL1. Наличие искомой гибридной конструкции pALLT подтверждали рестрикционным анализом (рис. 1).

Рис. 1. Электрофореграмма плазмиды pALLT и продуктов ее рестрикции: 1 – исходная плаزمида pALLT; 2 – плазмиды pALLT, обработанные рестриктазами *Bam*HI-*Eco*RI; M – репер DNA Ladder Mix

Для создания системы, позволяющей устанавливать присутствие в среде антибиотиков, нарушающих синтез ДНК, РНК, белков и клеточной стенки, использовали промоторы генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *ypuA* соответственно, поскольку их активация была обнаружена при действии антибиотиков различной химической природы, с различным механизмом действия [13, 14].

С использованием базы данных «ГенБанк» были сконструированы специфические праймеры, обеспечивающие амплификацию промоторных участков генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *ypuA*. На 5'-концах праймеров содержались определенные сайты рестрикции (табл. 3), облегчающие их последующее встраивание в состав векторных молекул. В результате ПЦР были получены продукты амплификации искомого размера (табл. 3), которые встраивали в *HincII*-сайт вектора pUC19. **Рестрикционный и секвенирующий анализ** отобранных гибридных плазмид показал, что клонированные промоторные последовательности соответствуют искомым и не содержат мутационных изменений, способных повлиять на функциональную активность.

Промоторы генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *ypuA* из промежуточного вектора pUC19 встраивали в состав вектора pALLT. Для этого их вырезали из вектора pUC19 с помощью рестриктаз, сайты узнавания для которых содержали исходные праймеры для их амплификации (табл. 3), и встраивали в состав вектора pALLT между соответствующими сайтами рестрикции. Соответствие полученных конструкций искомым подтверждали рестрикционным анализом. Как и ожидалось, при обработке исходного вектора pALLT ферментами *PaeI* и *EcoRV* регистрировали образование двух фрагментов размером 1218 п. н. (включал полилинкер и часть гена *lacZ*) и 7626 п. н. (включал всю оставшуюся плазмиду). При обработке этими же рестриктазами полученных конструкций регистрировали увеличение меньшего фрагмента за счет встраивания промоторных последовательностей (рис. 2, табл. 3). Созданные векторы были введены в клетки бактерий *B. subtilis* BD194 с эффективностью от $1,2 \times 10^3$ до $6,2 \times 10^3$ КОЕ (в пересчете на 1 мкг ДНК). Отобранные бактерии *B. subtilis* 194E, *B. subtilis* 194P, *B. subtilis* 194D и *B. subtilis* 194R, соответственно содержащие

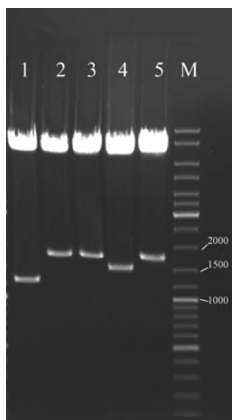


Рис. 2. Электрофореграмма рестриктов векторных конструкций, обработанных рестриктазами *PaeI* и *EcoRV*: 1 – плазмида pALLT; 2 – плазмида pASPD; 3 – плазмида pASPE; 4 – плазмида pASPR; 5 – плазмида pASPP; M – репер GeneRuler™ DNA Ladder Mix

векторные конструкции pASPE, pASPP, pASPD и pASPR, использовали для функционального анализа, результаты которого представлены на рис. 3.

Наблюдаемое изменение окраски клеток бактерий в синий цвет свидетельствовало о функциональной активности промоторов в составе плазмид pASPE, pASPP, pASPD и pASPR, обеспечивающих экспрессию гена *lacZ* в присутствии антибиотиков, нарушающих синтез клеточной стенки (ванкомицин), ДНК (налидиксовая кислота), РНК (рифампицин) и белков (доксциклин) (рис. 3).

С использованием одного из сенсорных штаммов (*B. subtilis* 194E) была проанализирована способность природных бактерий рода *Streptomyces* продуцировать антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки. Как видно из данных, представленных на рис. 3, культуральная жидкость трех штаммов природных бактерий рода *Streptomyces* (штаммы 5, 12, 15) обеспечивала окрашивание клеток сенсорных бактерий *B. subtilis* 194E в синий цвет, что свидетельствовало о присутствии в диагностируемой среде антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки.

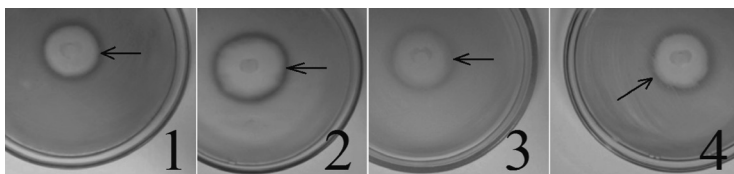


Рис. 3. Результаты функционального анализа бактерий *B. subtilis*, содержащих плазмиды: 1 – pASPE; 2 – pASPD; 3 – pASPR; 4 – pASPP в присутствии ванкомицина, налидиксовой кислоты, рифампицина и доксциклина, соответственно. Стрелкой указано изменение окраски тест-культуры

Заключение. В результате проведенной работы на основе плазмиды, способной эффективно передаваться и наследоваться в бактериях *B. subtilis*, созданы оригинальные генно-инженерные конструкции. Данные конструкции содержат функционально активные сигналы транскрипции, которые обеспечивают экспрессию репортерного гена *lacZ* в присутствии антибиотиков, нарушающих определенные системы клеточного метаболизма вне зависимости от механизма действия (в частности, синтез клеточной стенки, ДНК, РНК и белков). Полученные векторные молекулы пригодны для создания тест-системы для обнаружения антибиотиков в окружающей среде. В отличие от известных, использованная в данной работе диагностическая кассета находится во внехромосомном состоянии в количестве шести копий в клетке [10], что обеспечивает ее повышенную чувствительность к поступающим извне сигналам и создает предпосылки для последующих генно-инженерных манипуляций. В частности, для оптимизации тест-системы, реагирующей на присутствие антибиотиков во внешней среде в концентрациях, не превышающих предельно допустимые, можно увеличить число плазмидных копий или использовать определенные бактерии-хозяева, характеризующиеся повышенной чувствительностью к антимикробным соединениям.

Литература

1. Fate of transforming deoxyribonucleic acid after uptake by competent *Bacillus subtilis*: phenotypic characterization of radiation-sensitive recombination-deficient mutants / D. Dubnau [et al.] // J. Bacteriol. – 1973. – Vol. 114. – P. 273–286.
2. Yanisch-Perron, C. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors / C. Yanisch-Perron, J. Vierira, J. Messing // Gene. – 1985. – Vol. 33, № 1. – P. 103–119.
3. Челночный вектор для молекулярного клонирования в бактериях *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (варианты) и способ его конструирования: пат. 7537 Респ. Беларусь: МПК 7 С 12N 15/63 / А. В. Лагодич, М. А. Титок; дата опубл.: 30.03.2004.
4. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
5. Te Riele, H. Are single-stranded circles intermediates in plasmid DNA replication? / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // EMBO J. – 1986. – Vol. 5, № 3. – P. 631–637.

6. *Maniatis, T.* Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ.; под ред.: А. А. Баева, К. Г. Скрыбина. – М.: Мир, 1984. – 479 с.

7. *Spizizen, J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate / J. Spizizen // Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. – 1958. – Vol. 44. – P. 1072–1078.

8. *Birnboim, H. L.* A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA / H. L. Birnboim, J. Doly // Nucl. Acids. Res. – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513–1523.

9. *Sambrook, J.* Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis. – 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, 1989. – 468 p.

10. The replicative polymerases PolC and DnaE are required for theta replication of the *Bacillus subtilis* plasmid pBS72 / M. Titok [et al.] // Microbiol. – 2006. – Vol. 52. – P. 1471–1478.

11. *Van der Meer, J. R.* Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria / J. R. van der Meer, S. Belkin // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 511–522.

12. *Vagner, V.* A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis* / V. Vagner, E. Dervyn, S. D. Ehrlich // Microbiol. – 1998. – Vol. 144. – P. 3097–3104.

13. Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery / A. Urban [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, № 20. – P. 6436–6443.

14. *Staron, A.* Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis* / A. Staron, D. E. Finkeisen, T. Mascher // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55, № 2. – P. 515–525.

N. E. SATSUNKEVICH, M. S. UGLIANITSA, M. A. TITOK

DEVELOPMENT OF THE TEST SYSTEM TO DETECT ANTIBIOTICS IN THE ENVIRONMENTAL MEDIA

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus, titok@bsu.by*

Original vector construction pALLT, containing reporter gene *lacZ* and terminator of gene *cryI*, suitable for functional analysis of the promoters of bacteria of the genus *Bacillus* was created. Promoters *ypuA*, *yorB*, *yvgS* and *yheI* bacteria *B. subtilis*, transcribed in the presence of antibiotics with different modes of action, were integrated into vector pALLT before *lacZ* reporter gene. It was established that bacteria *B. subtilis* BD194, containing vector constructions become blue on the indicator medium with X-gal in presence of antibiotics, breaking cell wall synthesis (vector containing the promoter of the gene *ypuA*), DNA (vector containing the promoter of the gene *yorB*), RNA (vector containing the promoter of the gene

yvgS) and protein (vector containing the promoter of the gene *yheI*). The possibility of application of bacteria *B. subtilis* BD194E, containing vector with promoter of the gene *ypuA* to search for bacteria that produce antibiotics, breaking the cell wall synthesis, was demonstrated.

Поступила 30.04.2015 г.

УДК 579.8.06

А. В. СИДОРЕНКО¹, М. И. ЧЕРНЯВСКАЯ¹,
Е. М. ГЛУШЕНЬ¹, А. С. САМСОНОВА¹, М. А. ТИТОК¹,
Г. И. НОВИК¹, С. П. СИНЕОКИЙ²

БИОДЕГРАДАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ВИДОВОЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ ИЗ ФОНДА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
a_sidarenka@mbio.bas-net.by, collection@mbio.bas-net.by

²Государственный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

Исследованы биодеградативный потенциал и таксономическое разнообразие бактерий из фонда специализированной коллекции микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков. Показано, что исследуемые микроорганизмы осуществляют деградацию широкого спектра соединений различной химической структуры (углеводороды, в том числе нефть и нефтепродукты, амины, аммонийный азот, эфиры фталевой кислоты, карбоновые кислоты, жирные вещества), являющихся основными загрязнителями природных и техногенных сред, и имеют значительный потенциал для разработки эффективных технологий биоремедиации. Установлено, что коллекционные штаммы микроорганизмов-деструкторов являются представителями 13 родов, относящихся к 4 классам – *Actinobacteria* (pp. *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Nocardioideis*), *Bacilli* (pp. *Bacillus*, *Planococcus*), *Proteobacteria* (pp. *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*), *Deinococci* (род *Deinococcus*). На основании данных анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК подтверждена видовая принадлежность 38 коллекционных штаммов микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков, ранее идентифицированных на основании фенотипических признаков, 7 штаммов – отнесены к другим родам.