

4. Сладкова И. А., Ключкова О. А., Чиненова Т. А., Ломовская Н. Д. Мол. биол., 18, 497—503, 1984.
5. Сладкова И. А., Чиненова Т. А., Ломовская Н. Д., Мкртумян Н. М. Генетика, 15, 1953—1962, 1979.
6. Chater K. F. Proc. of 4th Intern. Symp. on Genet. of Industr. Microorganisms, Kyoto, 1983.
7. Chater K. F., Hopwood D. A. The actinomycetes, Acad. Press, London, 1982.
8. Dowling J. E., Hopwood D. A. J. Gen. Microbiol., 78, 349—359, 1973.
9. Lomovskaya N. D., Chater K. F., Mkrumian N. M. Microbiol. Rev., 44, 206—229, 1980.
10. Lomovskaya N. D., Emeljanova L. K., Mkrumian N. M., Atkhanian S. I. J. Gen. Microbiol., 77, 455—463, 1973.
11. Lomovskaya N. D., Stadkova I. A., Klochkova O. A., Orekhov A. O., Chinenova T. A., Mkrumian N. M. Proc. of 4th Intern. Symp. on Genet. of Industr. Microorganisms, Kyoto, 1983.
12. Lomovskaya N. D., Voeykova T. A., Klochkova O. A., Muravnik G. L., Stadkova I. A. Abstracts of 6th Intern. Congress of Virology, Delhi, 1984.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

СИСТЕМА КОНЬЮГАЦИОННОГО ПЕРЕНОСА Hg^+ ПЛАЗМИД У АСИНЕТОВАСТЕР

С. З. МИНДЛИН, Ж. М. ГОРЛЕНКО

В почвенных бактериях из рода *Acinetobacter*, выделенных из Хайдарканского ртутно-сурьмяного месторождения, присутствуют две плазмиды, несущие детерминанты устойчивости к соединениям ртути. Более крупная, рKL2 (60 т. п. н.), способна к конъюгативному переносу и чувствительные клетки *Acinetobacter*. Менее крупная, рKL1 (7,5 т. п. н.), не обладает конъюгативными свойствами, но с помощью рKL2 может проникать в чувствительные к ртути бактерии, в том числе далекие в систематическом отношении. Предполагается, что система конъюгативной передачи Hg^+ детерминант, обнаруженная у *Acinetobacter*, может обеспечить распространение устойчивости к соединениям ртути среди широкого круга бактерий.

Ключевые слова: *Acinetobacter*, Hg^+ детерминанты, конъюгативные плазмиды.

Ранее было показано, что в грунте шахты Хайдарканского ртутно-сурьмяного месторождения обитают бактерии различных систематических групп, устойчивые к соединениям неорганической ртути ($HgCl_2$) [2, 5]. В большинстве случаев Hg^+ детерминанты были локализованы на плазмидах различного размера. Наше внимание привлекла плазмида, обнаруженная в нескольких штаммах *Acinetobacter* (P_s13—P_s18), обозначенная рKL1 [1]. Это небольшая плазмида, величиной в 7,5 т. п. н., характеризующаяся широким кругом хозяев. Сама по себе рKL1 не обладает конъюгативными свойствами, но с частотой 10^{-2} — 10^{-5} может переходить из исходных штаммов *Acinetobacter* в клетки многих нерод-

ственных видов бактерий. В штамме Ps18, наряду с рKL1, присутствует более крупная плазмида величиной ~60 т. п. н. Ей, предположительно, и приписали свойство конъюгативности, а также способность мобилизовывать плазмиду рKL1 [1].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению природных плазмид, детерминирующих устойчивость к солям ртути.

Материал и методика. Штаммы. Acinetobacter Ps18, устойчивый к HgCl₂, описан ранее [1,2,5]. В качестве Hg⁺ реципиентов использовали Pseudomonas aeruginosa ML42str-r, а также представителей рода Acinetobacter: A. calcoaceticus BD 413, любезно предоставленный Э. Джунн, A. calcoaceticus var. Iwoffi, полученный от М.Э. Юрьева, и Acinetobacter sp. W14-180, являющийся Hg⁺ производным штамма W14 W14, как и Ps18, выделен из грунта Хайдарканского месторождения, но из другой пробы. W14-180 отобран нами в потомстве W14-1 (str^r мутант W14) после его облучения УФ-лучами и подраживания выживших клеток при сублетальной температуре (38,5°).

Среды. Культуры бактерий выращивали на стандартных средах IV и XV При выборе трансконъюгантов использовали агаризованную среду XV с добавками HgCl₂ (5 мкг/мл) и стрептомицина (100-200 мкг/мл) или рифамицина (40 мкг/мл), как описано ранее [1].

Конъюгационные скрещивания проводили путем 16-20-часового выкраивания смешанных культур на агаре Хоттингера с последующим высевом проб из различных разведений на селективные среды [1].

Электрофорез образцов ДНК проводили в блоке 1%-ного агарозного геля, 12X11 см, в трис-ацетатном буфере при 100 В в течение 4 часов.

Для выявления плазмид использовали модифицированный метод Эхарла [1], как описано ранее [2].

Результаты и обсуждение. Конъюгативные свойства и плазмидный состав трансконъюгантов Ps18XAcinetobacter Hg⁺. При скрещивании Ps18 с бактериями других систематических групп в клетках трансконъюгантов неизменно обнаруживалась рKL1, тогда как рKL2 во всех случаях отсутствовала [1]. Поэтому предположили, что либо рKL2 не обладает конъюгативными свойствами, либо она нежизнеспособна в клетках неродственных бактерий или не передается в них при конъюгации. Первому предположению противоречат факты конъюгативного переноса рKL1 из Ps18 в другие бактерии, хотя сама рKL1 этой способностью не обладает [1]. Для проверки второго предположения были проведены близкородственные скрещивания Acinetobacter Ps18 Hg⁺ X Acinetobacter Hg⁺ с использованием в качестве реципиентов различных представителей рода Acinetobacter.

Во всех скрещиваниях с частотой 1-3X10⁻³ обнаруживались Hg⁺-колонии (часть данных представлена в табл. 1). Очевидно, что если рKL2 обладает способностью к конъюгации, она должна присутствовать в клетках хотя бы некоторых трансконъюгантов наряду с рKL1.

Чтобы выявить трансконъюганты такого типа, мы провели повторный цикл скрещиваний, в которых использовали в качестве реципиентов как Acinetobacter, так и Pseudomonas, при этом исходя из допущения, что трансконъюганты, приобретшие обе плазмиды (рKL1 и рKL2), будут образовывать Hg⁺ рекомбинанты в скрещиваниях с обоими реципиентными штаммами. В то же время трансконъюганты, содержащие только рKL1, не дадут Hg⁺ трансконъюгантов ни в одном из

Частота переноса Hg^r плазмид и плазмидный состав трансконъюгантов

Трансконъюганты Ps18XW14-180*		Частота конъюгации одного переноса плазмид в скрещиваниях с**		Наличие плазмид в исходных трансконъюгантах (данные электрофореза)
тип	число	Acinetobacter (BSW27-2)	Pseudomonas (ML4262 str ^r)	
I	4	$1.0-2.5 \times 10^{-3}$	$1.5-5.0 \times 10^{-4}$	pKL1, pKL2
II	3	$< 2.5 \times 10^{-9}$	$< 2.5 \times 10^{-9}$	pKL1
III	9	$1.5-2.5 \times 10^{-3}$	$< 2.5 \times 10^{-9}$	pKL2

* Аналогичные результаты получены для трансконъюгантов Ps18XAcinetobacter BSW27-1 и BD413.

** Частоту переноса определяли как отношение числа Hg^r колоний к общему числу колоний

скрещиваний (см. схему, рис. 1). Результаты подтвердили это предположение (табл. 1 и рис. 2). В дополнение к двум указанным типам Hg^r трансконъюгантов неожиданно был обнаружен еще один. Как показали данные электрофоретического анализа, в клетках этого типа

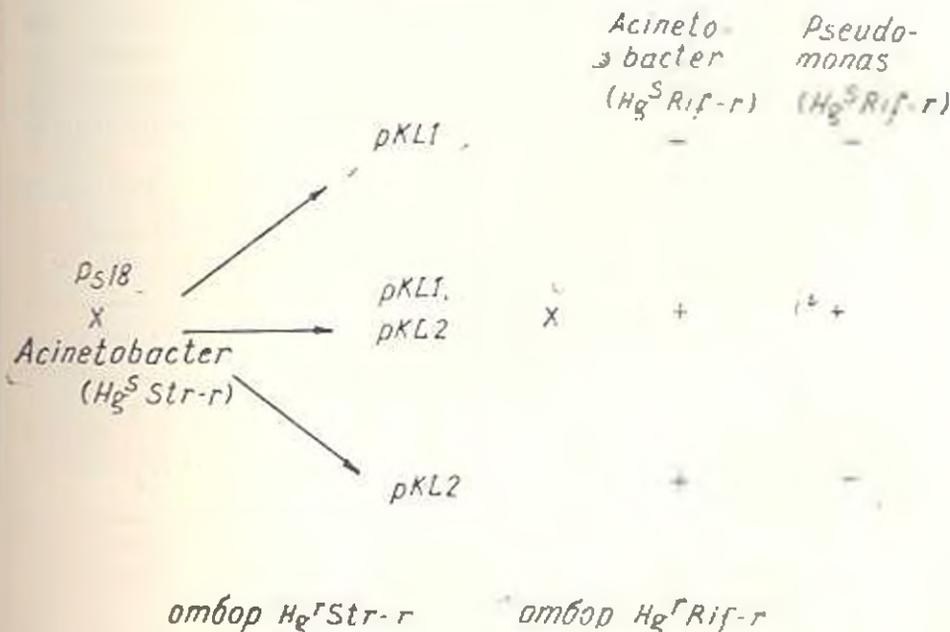


Рис. 1. Определение конъюгативных свойств плазмиды pKL2 (схема). +> присутствие Hg^r Rif^r рекомбинантов в соответствующих скрещиваниях. <-> отсутствие Hg^r Rif^r рекомбинантов в скрещиваниях.

присутствует только плазмиды величиной 60 т. п. н., т. е. pKL2 (см. рис. 2, тип III). Такой тип Hg^r трансконъюгантов передает признак в последующих скрещиваниях только реципиентным штаммам *Acinetobacter* (табл. 1).

Из полученных данных следует несколько заключений: pKL2 несет детерминанты устойчивости к ртути; она является конъюгативной плазмидой с узким кругом хозяев, по-видимому, ограниченными видами

Acinetobacter; присутствие этой плазмиды обеспечивает конъюгативный перенос *pKL1* в неродственные бактерии.

Конъюгативные свойства *pKL2*, и частности ее способность мобилизовывать неконъюгативную плазмиду *pKL1*, могут способствовать распространению последней среди почвенных бактерий, прежде всего представителей *Acinetobacter*. Вопрос особенно интересен при выяснении путей «горизонтальной» эволюции Hg^r факторов в ареале ртутного месторождения [2, 5]. В связи с этим исследовались свойства Hg^r плазмид у независимо выделенных штаммов *Acinetobacter*.

Распространенность pKL1 и pKL2 в штаммах Acinetobacter, выделенных из грунта Хийдарканского рудника. Смешанные культуры бактерий, устойчивых к ртути, были заложены на хранение в виде лиофильно высушенных образцов [2, 5]. Они и были использованы в качестве исходного материала при выделении новых штаммов *Acinetobacter*, идентифицированных в соответствии с описанием этого рода [3]. Мы изолировали свыше 30-ти штаммов этих бактерий, в дополнение к выделенным ранее Р. Б. Хесным [2, 5].

Наличие конъюгативных Hg^r плазмид в клетках всех штаммов и размеры плазмид устанавливали по способности передавать признак Hg^r реципиентам *Acinetobacter* и *Pseudomonas* и результатам электрофоретического анализа плазмидной ДНК соответственно. Полученные данные сведены в табл. 2. Они свидетельствуют о частой встречаемости

Таблица 2

Распространенность *pKL1* и *pKL2* в Hg^r штаммах *Acinetobacter*

Место отбора проб	№ пробы	Всего изучено штаммов	Из них, содержащих плазмиды	
			<i>pKL2</i>	<i>pKL1</i> , <i>pKL2</i>
Штольня, ~300 м от входа	7'	16	6	7
	7"	9	9	—
	7'''	5	3	1
Штольня, ~100 м от входа	8'	2	2	—
	8"	2	1	1
	8'''	2	2	—

конъюгативной плазмиды величиной 60 т. п. н. среди штаммов, выделенных из различных проб грунта. Можно предположить, что этой плазмидой является *pKL2*. Плазмиду с молекулярной массой, характерной для *pKL1*, удалось выявить только в половине проб, причем во всех случаях в клетках одновременно присутствовала плаزمида с молекулярной массой 60 т. п. н.

Таким образом, мы обнаружили систему конъюгационного переноса Hg^r детерминант, находящихся на плазмидах *Acinetobacter*. По-видимому, она не только обеспечивает распространение детерминант

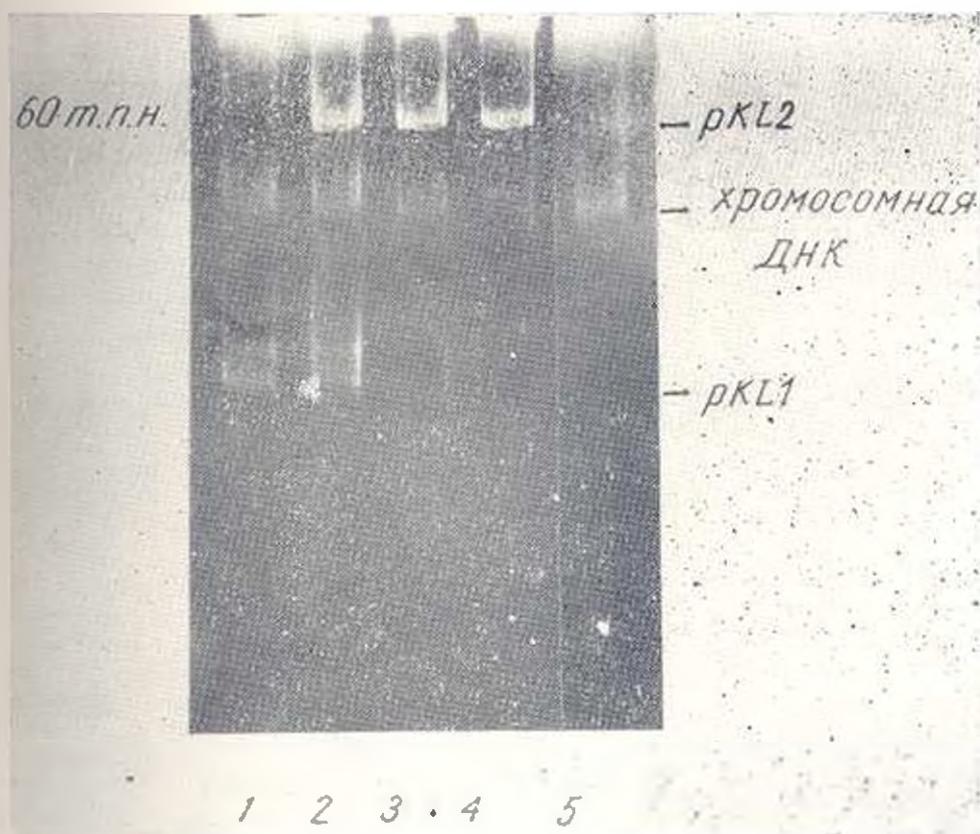


Рис. 2. Плазмиды различных типов трансконъюгантов от скрещивания $P_{s18} \times W11-180$: 1—тип II (pKL1); 2—тип I (pKL1, pKL2); 3, 4—тип III (pKL2); 5—референт $W11-180$. Положение свидетеля—плазмиды RP1 (60 т. п. н.) и Hg^r плазмид указано стрелками.

устойчивости к ртути внутри рода *Acinetobacter*, но и обладает потенциальными способностями к их миграции в перодетивные бактерии. Дальнейшие исследования покажут, происходит ли это на самом деле.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Поступило 13.VIII 1985 г.

Hg^r — ՊԼԱՋՄԻԴՆԵՐԻ ԿՈՆՅՈՒԿԱՑԻՈՆ ՓՈՆԱՆՅՄԱՆ ՍԻՍՏԵՄԸ

ACINETOBACTER-Ի ՄՈՏ

Ս. Չ. ՄԻՆԴԼԻՆ, Գ. Մ. ԳՈՐԼԵՆԿՈ

Խանդարկանի սնդիկա-ծարրային հանքավայրից անջատված *Acinetobacter* լծի հողային բակտերիաներում առկա են 2 պլազմիդներ, որոնք կրում են սնդիկի միացությունների նկատմամբ կայունության ղեւտերմինանտները pKL2(60 կ. ճ. դ.) պլազմիդը ընդունակ է կոնյուգատիվ փոխանցման *Acinetobacter*-ի բջիջներում, pKL1 (7,5 կ. ճ. դ.) պլազմիդը չունի կոնյուգատիվ առանձնահատկություններ, բայց pKL2-ի օգնությամբ կարող է ներթափանցել սնդիկի նկատմամբ ղգայուն բակտերիաների մեջ, այդ թվում սիստեմատիկ տեսանկյունից հեռավորների մեջ, ինքնազրկում է, որ *Acinetobacter*-ի մոտ հայտնաբերված Hg^r-ղեւտերմինանտների կոնյուգատիվ փոխանցման սիստեմը կարող է ապահովել սնդիկի միացությունների նկատմամբ կայունությունը բակտերիաների լայն շրջանում:

SYSTEM OF CONJUGATION TRANSFER OF THE Hg^r PLASMIDS IN ACINETOBACTER SP.

S. Z. MINDLIN, G. M. GORLENKO

In soil bacteria of the *Acinetobacter* sp. isolated in the Khaidarkan mercury and antimony mine there are two mercury-resistant plasmids. The larger plasmid, pKL2 (60 kb) is capable of conjugational transfer to *Acinetobacter* sensitive cells. The smaller one, pKL1 (7.5 kb) displays no such transfer but with the aid of pKL2 can penetrate into mercury sensitive bacteria including those systematically remote. It is suggested that the Hg^r determinant conjugational transfer system revealed in *Acinetobacter* might be responsible for the distribution of HgCl₂ resistance in diverse bacteria.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ломовская О. Л., Миндлин С. З., Горленко Ж. М., Хесин Р. Б. Генетика, 21, 1985.
2. Хесин Р. Б. Мол. биол., 19, 505—515, 1985.
3. Baumann P., Doudoroff M., Stanier R. Y. J. Bacteriol., 97, 1520—1541, 1968.
4. Eckhardt T. Plasmid, 1, 594—588, 1978.
5. Khessin R., Karasyova E. Mol. Gen. Genet., 197, 280—285, 1984.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.24:576.851

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ pAS8-121 У RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES

С. В. КАМЕНЕВА, А. Н. ДУБЕЯКОВСКИЙ, Т. П. ПОЛИВЦЕВА

Предложена система конъюгации на основе плазмиды pAS 8-121, дающая возможность вводить транспозоны (Tn) и плазмиду в хромосому пурпурной несерной фототрофной азотфиксирующей бактерии *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Осуществлены транспозиция Tn7 и введение плазмид pAS 8-121 и pAS 8-121::Tn5 в хромосому этой

979