



УДК 504.064.36:001.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**Е.В. Верхозина¹, В.А. Верхозина²**¹Институт земной коры СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова 128.²Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1а.²Национальный исследовательский Иркутский государственный технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83.

Объединены традиционные методы исследований в лимнологии с методами физико-химической биологии. Исследована структура внутриклеточных ферментов рестриктаз, определено влияние антропогенного фактора на экосистему озера Байкал. Проведены оригинальные исследования с использованием методов физико-химической биологии в экологических задачах, что дает возможность судить о качественном изменении микроорганизмов в прибрежной части Байкала, находящейся под антропогенным влиянием. Возможно, что эта работа поможет решить проблему надежности индикации антропогенного загрязнения на ранней стадии влияния.

Ил. 1. Табл. 1. Библиогр. 7 назв.

Ключевые слова: ферменты; эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы); антропогенное влияние; штаммы-продуценты; экологические исследования; физико-химические методы.

USE OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS IN ENVIRONMENTAL RESEARCHES**E.V. Verkhovina, V.A. Verkhovina**Institute of Earth Crust SB RAS,
128, Lermontov St., Irkutsk, 664033.A.P. Vinogradov's Institute of Geochemistry SB RAS,
1a, Favorsky St., Irkutsk, 664033.National Research Irkutsk State Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074.

Traditional research methods of limnology are combined with the methods of physico-chemical biology. The structure of the intracellular enzymes of restrictase is studied. The effect of the anthropogenic factor on the ecosystem of the Lake Baikal is determined. Original studies with the use of methods of physico-chemical biology for environmental problems are carried out. The last enables to determine the qualitative change in the micro-organisms of the coastal part of the Lake Baikal subjected to anthropogenic influence. It is possible that this work will help to solve the problem of the reliability of anthropogenic pollution indication at the early stage of influence.

1 figure. 1 table. 7 sources.

Key words: enzymes; restriction endonuclease (restrictases); anthropogenic impact; producer strains; environmental studies; physico-chemical methods.

Постановка задачи. Разработка водоохранных мероприятий невозможна без разработки новых методов и подходов к выявлению изменчивости веществ антропогенной природы, поступающих в озеро в процессах превращения. Микроорганизмы являются не только хорошими индикаторами на влияние антропогенного фактора на экосистему озера, но и единственными компонентами в экосистеме, преобразующими вещества антропогенной природы. В настоящее время большое значение имеет выявление природных и антропогенных условий, влияющих на механизм формирования качества пресных вод, и факторов, определяющих эти процессы, а также прогноз развития опасных природных и антропогенных воздействий.

Многие исследователи всего мира давно пытаются решить проблему – найти способ выявления влияния человека на экосистемы, в частности, на водные объекты. Научные исследования, проводимые ранее на Байкале и относящиеся к поиску антропогенных влияний на экосистему озера, касались количественных и качественных характеристик различных гидробионтов, в том числе и микроорганизмов. Рассматривалось, в основном, количественное распределение микроорганизмов в водной толще и грунтах озера. До сих пор не обсуждалось качественное изменение бактерий. Вероятно, использование традиционных методов исследований – микроскопия и изучение физиолого-биохимических признаков – не давало таких воз-

¹Верхозина Елена Владимировна, научный сотрудник, кандидат биологических наук, тел.: 89148805774, e-mail: verhel@crust.irk.ru

Verkhovina Elena, Research worker, Candidate of Biology, tel.: 89148805774, e-mail: verhel@crust.irk.ru

²Верхозина Валентина Александровна, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник, профессор, тел.: 89149047775, e-mail: verhval@igc.irk.ru

Verkhovina Valentina, Doctor of technical sciences, Leading research worker, Professor, tel.: 89149047775, e-mail: verhval@igc.irk.ru



возможностей.

Водоохранные мероприятия невозможны без разработки новых методов и подходов к выявлению изменчивости веществ антропогенной природы, поступающих в водоемы. Сравнение состава микроорганизмов по наличию или отсутствию ферментов эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) позволяет оценить изменение структуры и дает качественную индикацию влияния антропогенного загрязнения на биологическую часть трофической цепи.

Известно, что специфичность фермента рестриктазы определяет характеристики бактерий, из которых он выделен [2]. Ферменты специфические эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) являются важным классом ферментов. Они служат одним из главных орудий генных инженеров и лежат в основе методов физического картирования геномов, анализа последовательности нуклеотидов в ДНК. Изучение способов взаимодействия этих ферментов с ДНК, их каталитической активности стала одной из самостоятельных областей энзимологии.

В настоящее время в мире известно более 1500 типов рестриктаз с различной степенью активности, т.е. способных с той или иной скоростью разрывать определенные специфические последовательности двойной спирали ДНК. Поиск новых штаммов – продуцентов рестриктаз проводится среди микроорганизмов, выделенных из различных природных изолятов. Эти ферменты широко используются в решении прикладных задач и служат объектом фундаментальных исследований, касающихся белково-нуклеиновых взаимодействий [6].

Кроме поиска технологичных рестриктаз, актуальным является изучение условий биосинтеза этих ферментов в природных условиях. Водные микроорганизмы как возможные продуценты рестриктаз относительно плохо изучены, хотя среди них выявлены ферменты с новой специфичностью [4,5]. Среди микроорганизмов оз. Байкал впервые обнаружены и идентифицированы новые штаммы – продуценты рестриктаз, выделенные в районах антропогенного влияния [3,7].

Материалы и методы. Пробы воды из экосистемы оз. Байкал отбирали с разных глубинных горизонтов водной толщи (до 1200 м) и в различных районах – испытывающих антропогенное влияние и в чистых фоновых. Пробы засевали методом глубинного посева. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный агар. Культивирование бактерий проводили при температуре 22°C в течение 48 ч. Выросшие колонии расчищали и отсеивали в пробирки на поверхность питательного агара, инкубировали в течение 20 ч при 25°C. Культуры идентифицировали по определителю Берги [1].

Для скрининга рестриктаз бактерии пересевали в другую чашку Петри с питательным агаром и выращивали в течение одних суток при 22°C. Колонии, в которых обнаруживали рестриктазную активность, рассевали штрихом для получения клонов и их последующего исследования. Медленно растущие культуры выращивали двое суток при 30°C.

Свежую культуру, выращенную на агаре, собирали при помощи петли и засевали в количестве 100 мл в колбу на 500 мл в питательный бульон. Выращивали при 30°C со встряхиванием 130 об/мин в течение 12 ч. Затем 10 мл культуры вносили в другую колбу с бульоном и продолжали выращивание. Для исследования культуры отбирали пробы по 4 мл с интервалом 2 ч. Оптическую плотность определяли на фотоэлектроколориметре (КФК-ХЛ 4.2) в кювете толщиной 1 см. Клетки из 1 мл среды осаждали за 3 мин в микроцентрифуге Type-20, супернатант отбирали, а осадок замораживали при 20°C для последующего определения в нем удельной активности рестриктазы. Культивировали в течение 24 ч. Нарработку биомассы проводили в ферментере Ultroform 1601 (LKB, Швеция) при 30°C, аэрация 4 л/мин, перемешивание 200 об/мин. Рост контролировали по оптической плотности. При замедлении роста клетки осаждали при 8000 об./мин в роторе JA-10 при 4 50 0 за 20 мин на центрифуге J-21 C (Beckman, США). Биомассу хранили при -20°C. Наличие рестриктаз определяли, как описано ранее [4].

Результаты и их обсуждение. Из различных экологических ниш и регионов оз. Байкал были выделены более 1000 штаммов микроорганизмов. Все штаммы были проанализированы на наличие в них эндонуклеаз рестрикции.

Продуценты рестриктаз, известные ранее лишь теоретически, были обнаружены в районах антропогенного влияния. В штаммах бактерий, выделенных из чистых участков озера, все обнаруженные нами рестриктазы являются хорошо известными. Так, например, штамм бактерий *F. aquatil* – продуцент рестриктазы Fan I – был выделен из воды оз. Байкал в районе пос. Листвянка. Штамм бактерии *A. calcoaceticus* – продуцент рестриктазы Aca I – был выявлен в районе г. Байкальска. Продуцент *Bacillus sphaericus* эндонуклеазы рестрикции Bsi I, Штамм *Bacillus sphaericus* – продуцент рестриктазы Bsi I, которая является новым ферментом среди рестриктаз, был выделен из воды этого же района. В истоке р. Ангары выделен штамм бактерии *Curtobacterium citrium*, продуцент Cci NI, который является изошизомером Not I.

Определение остальных микроорганизмов, лизаты которых расщепляют ДНК, позволило отнести их к видам *Flavobacterium aquatil* (дорожка 2), *Hafnia alvei* (дорожка 4), *Acinetobacter calcoaceticus* (дорожка 6), *Pseudomonas gladioli* (дорожка 8). Ферменты названы соответственно Fan 1, Hal1, Aca 1 и (Pga I) (рисунок). Среди микроорганизмов р. *Pseudomonas* ранее не обнаруживали продуценты ферментов, способные узнавать и расщеплять последовательность ATC - GAT, хотя это один из наиболее "богатых" рестриктазами видов. Вид *A. calcoaceticus* менее изучен, но продуцентов ферментов, способных расщеплять ДНК по последовательности CCA(N)₅ TGG, до проведения наших исследований в нем не обнаруживали. Из байкальской воды нами был также выделен штамм *Curtobacterium citreum*. Определенная в нем рестриктаза Cci NI (сайт узнавания 5'-GCGGCCGC-3') является изошизомером Not I.



Частота встречаемости ферментов рестриктаз, выявленных в штаммах бактерий, выделенных из проб воды оз. Байкал в районах, испытывающих антропогенное влияние (2005-2009 гг.)

Прототип	Сайт узнавания	%
HaeIII-	5'-GGCC-3'	14
Clal	5'-ATCGAT-3'	9
PstI	5'-CTGCAG-3'	4
Bpu10I-	5'-CCTNAGC-3'	5
Sau96I	5'-GGNCC-3'	7
MboI	5'-GATC-3'	7
EcoRII	5'-CCWGG-3'	5
XhoII	5'-RGATCY-3'	4
BalI	5'-TGGCCA-3'	4
XhoI	5'-CTCGAG-3'	9
EcoRV	5'-GATATC-3'	4
BamHI	5'-GGATCC-3'	4

Позже при изучении микроорганизмов водного происхождения нами обнаружен штамм *Sporosarcina* sp. 9D, являющийся продуцентом рестриктазы, названной Sse 91 согласно общепринятой номенклатуре [3]. Новая эндонуклеаза рестрикции Sse 9D из штамма *Sporosarcina* sp. 9D является еще одним уникальным ферментом из байкальской коллекции. Обнаруженную эндонуклеазу рестрикции можно использовать во многих экспериментах в области молекулярной биологии и генетической инженерии.

Более поздние исследования (2005-2009 гг.) подтвердили, что ферменты эндонуклеазы рестрикции обнаруживаются в микроорганизмах, выделенных из проб воды в прибрежных районах п. Листвянка и г. Байкальска. Полученные результаты встречаемости ферментов эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), выявленных в штаммах бактерий, выделенных из проб воды оз. Байкал в районах, испытывающих антропогенное влияние за период 2005-2009 гг. представлены в таблице. Чаще всего выделяются рестриктазы HaeIII и XhoI, Clal. Частота встречаемости остальных найденных рестриктаз составляет от 4 до 7%. В результате исследований спектра ферментов рестрикции, определенных из штаммов микроорганизмов, выделенных из глубоководной части экосистемы Байкала, где антропогенного влияния не выявлено, рестриктазы были обнаружены лишь в 0,2% случаев. Кроме того, обнаруженные рестриктазы являются хо-

рошо известными, т.е. продуценты- бактерии их существовали давно и не только на Байкале.

Заключение. Таким образом, проведенные оригинальные исследования с использованием методов физико-химической биологии в экологических задачах дают возможность судить о качественном изменении микроорганизмов в прибрежной части оз.Байкал, находящейся под антропогенным влиянием. Штаммы-продуценты абсолютно нового и ряда уникальных ферментов рестрикции выделены в прибрежных районах, испытывающих антропогенное влияние. Также в районах антропогенного влияния выявлено качественное изменение бактериопланктона по наличию или отсутствию рестриктаз. В штаммах бактерий, выделенных из чистых участков озера, рестриктазы обнаруживаются редко и являются хорошо известными. Сравнение состава бактериопланктона по наличию или отсутствию ферментов эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) позволяет оценить изменение структуры бактериопланктона и дает качественную индикацию влияния антропогенного загрязнения. Возможно, что эта работа поможет решить проблему надежности индикации антропогенного загрязнения на ранней стадии влияния, что позволит прогнозировать развитие опасных антропогенных воздействий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ № 10-05-10040-К, проект №09-0501092-а.

Библиографический список

- Берги Д.Х. Краткий определитель бактерий Берги / под ред. Д.Г.Хоулта. М.: Мир, 1980. 444 С.
- Бурьянов Я. И. Системы модификации и рестрикции ДНК как биологические факторы эволюции у микроорганизмов //Вопросы эволюции бактерий. Пушино, 1984. С. 117-124.
- Верхозина В.А., Верхозина Е.В., Гончар Д.А. и др. Микроорганизмы озер Байкал и Ньяса как индикаторы антропогенного влияния и перспектива их использования в биотехнологии //Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 4. С.455-459.
- Гончар Д.А., Дедков В.С., Верхозина В.А. и др. Эндонуклеаза рестрикции Sse91 из штамма *Sporosarcina* sp. 9D узнает последовательность 5'-AATT-3' // Молекулярная генетика. 1998. №1.С. 32-34.
- Дегтярев С.Х., Речкунова С.И., Нетесова Н.А. и др. Установление специфичности эндонуклеазы рестрикции Vne I //Биорган. химия 1987. Т.13, №3. С. 422-423.
- Дегтярев С.Х., Репин В.Е., Речкунова Н.И. и др. Установление субстратной специфичности реакционной эндонуклеазы Vsp I //Биорган. химия. 1987. Т.13, № 3. С. 420-421.
- Дедков В.С., Репин В.Е., Речкунова Н.И. и др. Выявление штаммов- продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал // Изв. Сиб. Отд. АН СССР. Сер. "Биологич. науки". 1990. №1. С. 35-37.