

ПОДСЕКЦИЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Влияние состава среды и условий культивирования на рост углеводородокисляющих микроорганизмов

Александров А.Ю. (Волгоград, alexea@avtlg.ru)

Исследование влияния факторов окружающей среды на рост углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) необходимо для получения максимальной их биомассы и эффективного применения технологий биоремедиации. Целью данного исследования было изучение влияния температуры, состава питательной среды, рН среды и условий аэрации на рост штаммов УОМ в условиях глубинного культивирования. Объектом исследования были два штамма – *Bacillus* sp. ТУ22 и *Pseudomonas* sp. ТУ10 – выделенных из нефтезагрязнённых почв на территории ОАО «Пласткард» (г. Волгоград). Динамика роста обоих штаммов при глубинном аппаратном культивировании в мясопептонном бульоне исследована при температурах 20°C, 30°C и 37°C. Концентрацию биомассы определяли макрокультуральным методом. Установлено, что оптимальной температурой для культивирования штамма *Pseudomonas* sp. ТУ10 является 37°C, а для штамма *Bacillus* sp. ТУ22 – 30°C. Следующим этапом исследований стало изучение влияния состава питательной среды, отдельных её элементов на рост штаммов УОМ. Кроме того, было изучено воздействие на рост бактерий мелассы – отхода свекловичного производства. Для выбора оптимальной среды нами были исследованы три различных варианта сред: 1) 8Е, состав (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5; K_2HPO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; NaCl – 0,5; 2) Гафарова А.Б.: NH_4Cl – 0,5; K_2HPO_4 – 1,5; 3) Рахимовой Э.Р.: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,0; MgSO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,05. Наибольший рост биомассы при глубинном культивировании в минеральных средах с добавлением нефти штамм *Pseudomonas* sp. ТУ10 наблюдали в среде Рахимовой, тогда как штамм *Bacillus* sp. ТУ22 лучше рос в среде Гафарова. В присутствии азота и фосфора, как главных лимитирующих питательных элементов, добавление К в среду стимулировало рост *Bacillus*. Положительный эффект на рост *Pseudomonas* оказало присутствие в питательной среде Mg и S. Для определения оптимальной для роста двух микроорганизмов концентрации мелассы в питательной среде была проведена серия экспериментов. Оба штамма УОМ оказались способны расти в питательной среде на основе мелассы при её содержании в пределах 0,1-1%. Максимальная урожайность культур наблюдалась при выращивании бактерий в среде, содержащей 0,5% мелассы. Была изучена динамика роста обоих штаммов УОМ в минеральных питательных средах с добавлением нефти со слабощелочной реакцией (рН=6,8±0,1) и со слабощелочной реакцией (рН=7,2±0,1). Установлено, что как для представителей псевдомонад, так и бацилл более благоприятной является слабощелочная среда, чем слабощелочная. Проведены исследования динамики роста штаммов *Bacillus* sp. ТУ22 и *Pseudomonas* sp. ТУ10 в минеральных средах с добавлением нефти при различных условиях насыщения кислородом воздуха: без аэрации и с принудительной аэрацией 0,5 л/мин. Известно, что на скорость растворения кислорода в среде и, в свою очередь, на потребление его микроорганизмами положительное воздействие оказывает добавление в среду перфторорганических соединений (ПФОС). С целью установить его воздействие на исследуемые штаммы нами были сделаны эксперименты с введением в питательную среду 5% (об) перфтортрибутиламина. В условиях принудительной аэрации со скоростью 0,5 л/мин оба штамма росли лучше, чем в условиях отсутствия аэрации. Добавление ПФОС в питательную среду оказало благоприятное воздействие на рост *Pseudomonas* sp. ТУ10, тогда как для *Bacillus* sp. ТУ22 такого эффекта не наблюдалось.

Продукция фитогормонов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* в средах с отработанными пивными дрожжами

Асабина Е.А., Четвериков С.П. (Уфа, lenok.okt@mail.ru)

Фитогормоны играют важную роль как регуляторы роста и развития растений. Использование природных фитогормонов микробного происхождения в растениеводстве весьма перспективно ввиду простоты их получения, сравнительной дешевизны, высокой способности их к детоксикации в растительном организме, а также способности легко связываться в клетке и катаболизироваться. Неоценимо важное значение для растениеводства приобретает применение не столько очищенных микробных гормональных препаратов, сколько всего природного комплекса, образующегося в результате метаболизма микробной клетки, содержащего, зачастую в весьма удачных для живого организма сочетаниях, фитогормоны, витамины, аминокислоты, органические кислоты и другие необходимые для растения соединения. Бактерии рода *Pseudomonas* являются потенциальными объектами агробιοтехнологии для разработки на их основе биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений. Псевдомонады, в первую очередь флуоресцирующие, синтезируют целый ряд соединений, стимулирующих рост растений; они представлены фитогормонами, такими как ауксины и цитокинины. Культура *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 из Коллекции микроорганизмов Института биологии УНЦ РАН является объектом биологического контроля почвенных фитопатогенов и обладает совокупностью полезных для растений свойств, таких как синтез антифунгальных антибиотиков и ростстимулирующих веществ. При производстве биопрепаратов на основе бактерий рода *Pseudomonas* для практического использования в агробιοтехнологии основной проблемой является дорогая питательная среда. Известные питательные среды для культивирования псевдомонад содержат в своем составе такие дорогостоящие компоненты, как пептон, дрожжевой экстракт. При разработке питательной среды на основе автолизата отработанных пивных дрожжей с применением метода математического планирования эксперимента образцы в виде низкомолекулярных фракций были проверены на наличие в них веществ цитокининовой природы. Данные иммуноферментного анализа показали, что в условиях проведенного эксперимента штамм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 способен синтезировать цитокинины, максимальный выход которых может составлять 1150 нг/мл культуральной жидкости. Хроматографический профиль низкомолекулярной фракции образца с максимальной фитогормональной активностью представлен тремя компонентами, один из которых обладает антигрибной активностью, два других представляют собой вещества цитокининовой природы. В то же время при культивировании на среде Кинг В вышеуказанный исследуемый штамм продуцировал по данным хроматографии семь компонентов, дальнейший анализ которых показал наличие у одного из них антигрибной активности, у четырех – фитогормональной активности цитокининовой природы, причем выход цитокининов не превышал 680 нг/мл культуральной жидкости.

Изучение роли L,D-карбоксипептидазы в размножении и вирулентности *Listeria monocytogenes*

Варфоломеев А.Ф., Юров Д.С., Ермолаева С.А. (Москва, varfalex@gmail.com)

L,D-карбоксипептидаза участвует в переработке (ре-сайклинге) пептидогликана, гидролизуя связь между остатком мезо-диаминопимелиновой кислоты и D-аланином в тетрапептидах муреина. У грамотрицательных бактерий L,D-карбоксипептидаза играет важную роль в размножении, будучи необходимой на заключительных этапах формирования дочерних клеток. Так, нарушение функции L,D-карбоксипептидазы у *E. coli* препятствует формированию межклеточной перегородки (септы), что проявляется

в удлинении бактериальных клеток. In silico анализ генома грам-положительной бактерии *Listeria monocytogenes*, возбудителя тяжелого заболевания человека, выявил ОРС lmo0028, кодирующую белок, имеющий гомологию с L,D-карбокисептидазой *E. coli*. Было установлено, что ген lmo0028 не экспрессируется и не влияет на рост и морфологию бактерий в питательном бульоне, однако делеция гена lmo0028 приводит к появлению удлинённых бактериальных клеток при выращивании бактерий на плотных питательных средах. При комплементации данной мутации плазмидой, несущей ген lmo0028, происходило восстановление исходного фенотипа. С помощью реал-тайм ПЦР было показано, что удлинённые бактериальные клетки мутантного штамма (GIMd0028) в среднем содержат в 2,5 раза больше генетического материала, чем клетки штамма дикого типа. Тем самым удалось подтвердить, что данный ген вовлечен в процесс размножения *L. monocytogenes* в определенных условиях, и нарушение целостности данного гена влияет на расхождение клеток после деления. На модели экспериментального листериоза было показано, что LD50 штамма GIMd0028 для мышей линии BALB/c была увеличена на порядок, т.е. мутантный штамм является менее вирулентным, чем штамм дикого типа. Таким образом, установлено, что в процессе деления клеток грамположительной бактерии *L. monocytogenes* участвует L,D-карбокисептидаза, которая необходима для расхождения дочерних клеток при размножении на плотных питательных средах, а также, по-видимому, в процессе инфекции макроорганизма.

Новые метило- и метанотрофные бактерии из кислых наземных экосистем бореальной зоны

Воробьев А.В. (Москва, vorobievalexey@mail.ru)

Разнообразие микроорганизмов, ответственных за окисление метана и метанола в кислых и холодных наземных экосистемах, остается плохо изученным. До последнего времени перечень этих бактерий был ограничен умеренно ацидофильными метанотрофами родов *Methylocella* и *Methylocapsa*. Представители рода *Methylocapsa* являются облигатными метилотрофами, растущими только на C1-соединениях, тогда как представители рода *Methylocella* способны использовать также и некоторые полиуглеродные (C_n) органические субстраты. В данной работе были изучены физиологические и метаболические характеристики 4 штаммов бактерий, изолированных из кислой лесной почвы (pH 3,3-3,6) и кислого сфагнового болота (pH 3,8) бореальной зоны. Штаммы, выделенные из кислой почвы, штаммы BW863^T и BW872, являются ацидофильными мезофильными организмами, растущими в диапазоне pH 3,1-6,5 и температуры 9-28°C. Несмотря на их тесное филогенетическое родство с *Methylocapsa acidiphila* B2 (96,5 % сходства генов 16S рРНК), эти организмы не растут на метане, но используют метанол в широком спектре концентраций. Помимо метанола штаммы BW863^T и BW872 растут на ряде органических субстратов: этаноле, малате и пирувате. Сравнительный анализ последовательностей гена *mxaF*, кодирующего большую субъединицу метанолдегидрогеназы (ключевого фермента процесса окисления метанола), показал, что последовательности MxaF новых изолятов существенно отличаются от таковых ранее известных метилотрофов. Их сходство с последовательностями MxaF метилотрофов из *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria составило 69-75%, 61-63% и 64-67%, соответственно. Наибольшее сходство с MxaF последовательностями выделенных штаммов обнаруживали транслированные аминокислотные последовательности *mxaF* клонов, полученных в результате молекулярного анализа кислых почв, обогащенных ¹³CH₃OH. Таким образом, штаммы BW863^T и BW872 являются первыми представителями ранее некультивируемой группы метилотрофных бактерий, осуществляющих окисление метанола в кислых почвах. Штаммы AR2 и AR4^T, выделенные из сфагнового торфа, являются мезофильными,

факультативно метанотрофными бактериями. Филогенетически эти изоляты близки к представителям рода *Methylocella* (96 % сходства генов 16S рРНК), однако отличаются от последних по морфологии и ряду фенотипических характеристик. Подобно представителям *Methylocella*, у исследованных штаммов отсутствует мембранная метанмонооксигеназа (ключевой фермент процесса окисления метана), а имеется только растворимая форма этого фермента. Помимо метана и метанола, штаммы AR2 и AR4^T используют некоторые C_n соединения, в частности, этанол и ацетат. Новые изоляты являются более ацидотолерантными организмами по сравнению с видами рода *Methylocella*. Они являются первыми известными факультативными метанотрофами, способными к росту при значениях рН ниже 4. Полученные в настоящем исследовании данные расширяют знания о разнообразии метано- и метилотрофов, обитающих в экосистемах с низкими значениями рН. На основе анализа физиологических, хемотаксономических и генотипических характеристик штаммы BW863^T и BW872 предлагается отнести к новому роду и виду '*Methylovirgula ligni*' gen. nov., sp. nov., а штаммы AR2 и AR4^T – к новому роду и виду '*Methyloferula sphagni*' gen. nov., sp. nov., в пределах семейства Beijerinckiaceae класса Alphaproteobacteria.

Изучение флокуляции бактериальных суспензий *Esherichia coli* K12 и *Bacillus subtilis* B917 под действием полиакриламидов. Оценка токсичности исследуемых полиакриламидов

Гарипов А.Р., Кулагина Е.М., Егоров С.Ю. (Казань, azat.garipov@yahoo.com)

Совершенствование стадии выделения биомассы является важной задачей биотехнологии. Несмотря на очевидные преимущества реagentного метода, использование высокомолекулярных флокулянтов в биотехнологии сдерживается в виду слабой изученности основ флокуляции клеток и отсутствием критериев в подборе флокулянтов, а также высокими требованиями, предъявленными к самим флокулянтам. Весьма перспективным представляется применение растворов полиакриламида для интенсификации стадии выделения и концентрирования биомассы, являющейся одной из наиболее отстающих и составляющей до 30% затрат от стоимости конечного продукта. Полиакриламид – самый распространенный из флокулянтов. Это обусловлено его невысокой стоимостью, слабой токсичностью и достаточно высокой эффективностью во многих процессах флокуляции. Целью данной работы являлось проведение количественной оценки влияния добавок полиакриламида на скорость осаждения клеток бактериальных суспензий грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и по данным экспериментов оценить оптимальную концентрацию вводимого полимера, а так же оценить токсичность используемых концентраций полиакриламида. В качестве флокулянтов использовались модифицированный катионный полиакриламид (КПАА) BASF Sedipur CF-803 и модифицированный анионный полиакриламид (АПАА) BASF Sedipur AF-404. Исследования показали, что оптимальной концентрацией КПАА для седиментации грамотрицательных клеток является 0,000125%. Оптимальной концентрацией КПАА для седиментации грамположительных клеток оказалась 0,0002%. Для определения оптимальной концентрации анионного полиакриламида Sedipur AF-404 для седиментации клеток *Bacillus Subtilis* B917 и *Esherichia coli* K12 в культуральной жидкости использовали широкий диапазон концентраций, но не одна из концентраций не оказалась эффективной, в связи с чем, исследование данного препарата было решено прекратить. Предположительно, отсутствие флокулирующей активности является следствием того, что анионные группы флокулянта не взаимодействовали с катионными группами молекул поверхности клеток из-за отрицательного суммарного заряда поверхности клетки. Для определения токсичности КПАА использовали тест на токсичность по отношению к микроорганизмам. Токсичность оценивалась у растворов КПАА

следующих концентраций: $C_1=0,01\%$; $C_2=0,001\%$; $C_3=0,0001\%$. Процент выживания составил: $C_1 - 6\%$; $C_2 - 59,3\%$; $C_3 - 94,8\%$. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что используемая эффективная концентрация вещества не токсична. Основываясь на полученных данных о флокулирующих и седиментационных способностях катионного полиакриламида Sedipur CF-803, можно утверждать, что его использование целесообразно и выгодно.

Изучение точечных мутаций в гене *gyrA*, связанных с устойчивостью к офлоксацину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, обнаруженных в Санкт-Петербурге в 2008 году

Добрынин П.В., Черняева Е.Н. (Санкт-Петербург, pdobrynin@gmail.com)

Развитие устойчивости к лекарственным препаратам у *M. tuberculosis* является угрозой общественному здоровью. Быстрая диагностика, а также правильное лечение помогут предотвратить возникновение и распространение туберкулеза (ТБ) с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ). Перспективным направлением в выявлении лекарственно-устойчивых форм ТБ является внедрение молекулярных методов детекции мутаций, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам. Одним из признаков ШЛУ является устойчивость к офлоксацину, которую связывают с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*. По литературным данным, мутации в *gyrB* встречаются реже чем в *gyrA*. Целью исследования было определение частоты мутаций в гене *gyrA* у изолятов *M. tuberculosis*, устойчивых к офлоксацину, выявленных в Санкт-Петербурге в 2008 году. Исследование проводили с чистыми культурами *M. tuberculosis*, обладающими ШЛУ по данным метода абсолютных концентраций с использованием плотных питательных сред. Для детекции мутаций резистентности к офлоксацину был амплифицирован фрагмент *gyrA*, мутации в котором связывают с наличием устойчивостью к офлоксацину. Далее продукты ПЦР секвенировали. У 24 из 26 проанализированных изолятов (92%) была обнаружена замена в 95 кодоне, приводящая к замене серина на треонин. По литературным данным, данная мутация является естественным полиморфизмом у *M. tuberculosis* и не приводит к развитию устойчивости. Одиннадцать из изученных изолятов обладали мутацией в 94 кодоне (45,8%), а у 3 из 24 изолятов (12,5%) была мутация в 90 кодоне. Один изолят обладал заменой в 91 кодоне. У двух образцов, несмотря на наличие устойчивости, показанной культуральным тестом, мутаций в гене *gyrA* обнаружено не было. В контрольных образцах, не имеющих устойчивости к офлоксацину, не было обнаружено замен, кроме естественного полиморфизма в 95 кодоне. Полученные данные согласуются с данными из литературы. Мутации в кодонах 90, 91, 94 являются характерными для штаммов, устойчивых к фторхинолону. Авторы выражают признательность д.б.н., профессору Козлову А.П. за научное руководство и ценные практические советы, д.м.н. Жемкову В.Ф. за предоставление клинического материала и помощь в организации работы.

Сравнительное изучение антимикробного действия *Cru* и *Cyt* белков из параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* и лизоцима из медицинской пиявки

Курсанова Л.А. (Москва, lily495@yandex.ru)

Cru белки параспоральных кристаллов различных подвигов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* – высокоспецифичные токсины личинок ряда беспозвоночных. Гены таких белков введены в состав многих сельскохозяйственных растений для защиты последних от насекомых-вредителей. Кроме того, *Cru* белки полифункциональны, так как проявляют антимикробную активность. Причём,

множественное проявление активности Cry белков осуществляется с помощью различающихся механизмов. Наряду с Cry белками кристаллы нескольких подвидов *B. thuringiensis* содержат и Cyt белки, оказывающие неспецифический инсектицидный и антимикробный эффект, а также влияющие на проявление активности Cry белков. Полифункциональными являются и лизоцимы, которые не только гидролизуют пептидогликан бактериальных клеток, но и разрушают цитоплазматическую мембрану, используя для этого уникальный, пока не изученный механизм. Причём, цитолитический эффект лизоцимов сохраняется даже после потери их ферментативной активности. Таким образом, сравнительное изучение антимикробного действия вышеуказанных белков важно для углубленного понимания как механизмов их активности, так и экологической роли в биоценозах. В работе использовали рекомбинантный лизоцим и его фрагменты, любезно предоставленные проф. И.П. Басковой. Хроматографически очистили с помощью в.н.с. ВНИИ Генетика И.А. Залунина белки Cry1Ab, Cry3A, Cry9A, Cry11A и Cyt 1A из параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* spp. *alesti*, *tenebrionis*, *galleriae*, *israelensis*, соответственно, а также некоторые фрагменты этих белков, выделенные после их гидролиза трипсином, субтилизином. Проводили работу также с некоторыми мутантами Cry9A. Среди применённых методов исследования использовали флуоресцентные красители и разные виды электронной микроскопии. Сравнивали антимикробное действие исследуемых белков на ряд грамположительных и грамотрицательных бактерий, например, на представителей родов *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, а также на термофильные уникальные бактерии: грамположительные *Carboxydocella thermoautotrophica*, *Thermincola carboxydophila* и грамотрицательную *Thermosinus carboxydovorans*. Особый интерес представляет влияние исследуемых белков на анаэробные археи *Methanosarcina barkeri*, имеющие уникальные клеточные оболочки. Было показано, что один из фрагментов Cry1Ab, полученный с помощью триптического гидролиза, проявляет значительно больший антибактериальный эффект, чем исходный токсин. Величины антимикробных активностей Cry и Cyt белков и ряда их фрагментов обычно ниже, чем лизоцима, хотя спектр антимикробного действия последнего более узкий. Среди трёх фрагментов лизоцима две его альфа-спирали оказывали антимикробный эффект, но более слабый, чем исходная молекула. Полученные данные выявили отличия влияния ряда изучаемых белков и их фрагментов на микроорганизмы с различными клеточными оболочками и дали возможность сделать предположение, что разрушение цитоплазматических мембран прокариот под влиянием белков параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* и лизоцима имеет ряд характерных особенностей.

Использование термофильных карбоксидотрофных микроорганизмов для переработки синтез-газа

Комелев М.С., Новиков А.А. (Москва, kain@inbox.ru, set_chemist@mail.ru)

В современном мире бурное развитие промышленности породило проблемы, связанные с истощением углеводородного сырья, прежде всего, нефти. Это стимулировало развитие технологий получения альтернативных топлив – биодизеля, биоэтанола и водорода. Значительным недостатком биодизеля и биоэтанола является использование сельскохозяйственной продукции в качестве сырья для их производства. В начале XXI века это вызвало глобальное повышение цен на пищевые продукты, усугубив тенденцию тотального обнищания и голодания населения некоторых регионов мира. Наиболее удобным сырьем для производства водорода является синтез-газ. Он может быть получен конверсией природного газа или попутного нефтяного газа, в настоящее время нещадно сжигаемого в факелах нефтедобывающих предприятий, газификацией углеродсодержащих бытовых или промышленных отходов или низкосортных каменных

углей, запасы которых значительно превосходят запасы ископаемых углеводородов. Традиционные термokatалитические методы переработки синтез-газа в водород осуществляются при высоких температурах и давлениях, а также требуют тщательной сероочистки сырья, что приводит к снижению энергоэффективности процесса. Микробиологические методы по своей сути лишены этих недостатков, что особенно актуально в свете последних разработок в области плазмохимической переработки природного газа. Из образцов, отобранных сотрудниками ИНМИ РАН в ходе международной экспедиции в Исландии, нами был выделен штамм не описанных ранее бактерий SET IS-9. Выделенная культура представляет собой грамположительные короткие бактерии слегка изогнутой формы, иногда объединенные в пары или ветвящиеся. По данным сиквенса гена 16S рПНК, выделенный штамм представляет собой новый вид рода *Carboxydotherrmus*. Штамм депонирован в немецкой коллекции культур микроорганизмов DSMZ. Изолят растет хемолитоавтотрофно на пресной среде по Заварзину (состав газовой фазы 100% CO); продуктами являются эквимоллярные количества водорода и диоксида углерода. Рост наблюдается в интервале температур 50–70°C с оптимумом при 65°C, в интервале значений pH 5,0–8,0 с оптимумом при 5,5–6,0. Ведется создание лабораторной установки с рабочим объемом 6 л для исследования кинетических характеристик процесса глубокой переработки CO-содержащих газов в водород с помощью различных термофильных карбоксидотрофов. По результатам проведенных исследований планируется разработка способа микробиологической конверсии синтез-газа в водород высокой чистоты. Работы по выделению микроорганизмов и изучению их метаболизма велись под руководством д.б.н. Т.Г. Соколовой на базе лаборатории гипертермофильных микробных сообществ ИНМИ РАН.

Наружная карбоангидраза бета-класса алкалофильной бентосной цианобактерии *Microcoleus chthonoplastes*

Куприянова Е.В. (Москва, ivlaanov@mail.ru)

Механизмы минерализации цианобактериального сообщества до сих пор недостаточно изучены. Нами было выдвинуто предположение, что ключевую роль в биоминерализации может играть фермент карбоангидраза (КА), локализованная в наружных слоях цианобактерий, где ее функция состоит в регуляции равновесия форм неорганического углерода, в том числе и бикарбоната, участвующего в осаждении кальция. Нами была зарегистрирована активность КА как на интактных клетках, так и во фракции изолированных клеточных оболочек *M. chthonoplastes*. С помощью вестерн-блот анализа и метода иммуноэлектронной микроскопии показано наличие, по крайней мере, двух КА разных классов (альфа- и бета-) в клеточных оболочках цианобактерии. Из сконструированной нами на основе фага лямбда геномной библиотеки *M. chthonoplastes* клонирован ген бета-КА, названный *cahB1*. Поиск проводили с помощью гетерологичного зонда, представляющего собой полноразмерный ген периплазматической бета-КА из *Synechocystis* PCC 6803 (*ecaB*, slr0051). Для *cahB1* определена полная нуклеотидная последовательность, которая депонирована в международной базе данных GeneBank под номером DQ222209. Для гетерологичной экспрессии белка CahB1 в клетках *E. coli* была собрана конструкция на основе вектора pET32b (Novagen), несущая ген *cahB1* и позволяющая получить белок, имеющий полигистидиновые последовательности на N- и C-концах для его последующего выделения с помощью аффинной хроматографии на никель-содержащем носителе. Уровень экспрессии CahB1 в штамме *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) составлял примерно 200 мг искомого белка на 1 л клеточной суспензии. Причем его накопление в клетках *E. coli* происходило в основном в тельцах включения. С помощью электрометрического метода было показано наличие высокой активности фермента КА в

общем клеточном гомогенате *E. coli*, содержащем гетерогенный белок CahB1. Активность фермента полностью ингибировалась специфическим ингибитором КА ацетазоламидом. Очистку белка CahB1 на никелевой колонке (His-Bind columns, Novagen) проводили в денатурирующих условиях. Выделенный белок будет использован в качестве антигена для получения специфичных антител, необходимых для установления точной внутриклеточной локализации CahB1 в клетках *M. chthonoplastes*. На основе экспериментальных данных предложена схема участия внеклеточных КА *M. chthonoplastes* в фотосинтетической ассимиляции углерода и связи этого процесса с отложением CaCO₃ при минерализации цианобактерии. Тезисы доклада основаны на материалах исследования, проведенных в рамках гранта РФФИ № 08-04-00804.

Деструкция ароматических веществ метаногенными микробными сообществами

Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т. (Москва, linkovay@mail.ru)

Ароматические вещества, содержащиеся в отходах предприятий нефтехимической и фармацевтической промышленности, представляют собой токсичные и трудноразлагаемые соединения. Основными преимуществами анаэробной очистки содержащих их сточных вод по сравнению с традиционными аэробными технологиями являются возможность проведения процесса в концентрированных стоках, накопление незначительного количества биомассы микроорганизмов, а также образование полезного продукта – биогаза. Микробные сообщества, разрушающие ароматические соединения, были получены нами из анаэробных мезофильных флокулярных илов очистных сооружений Курьяновской станции аэрации (для культур O4 и P2) и пивоваренного завода “Efes Pilsner” (для культуры EP) путем длительной адаптации к различным изомерам аминокислот. Ранее было показано влияние ряда физико-химических параметров культивирования, экзогенных акцепторов электронов и дополнительных источников углерода на процесс адаптации накопительных культур к субстратам и последующее функционирование анаэробных сообществ. В данной работе изучали потребление адаптированными метаногенными сообществами других ароматических субстратов: бензойной кислоты, бензилового и 2-гидроксибензилового спиртов как предполагаемых интермедиатов анаэробной конверсии аминокислот, а также азокрасителя Acid Orange 6, при бескислородном обесцвечивании которого образуются ароматические амины. Активное, практически без лаг-периода потребление бензилового спирта с образованием CH₄ и CO₂ в качестве конечных продуктов наблюдали во всех трёх вариантах (O4, P2 и EP). Наиболее значительная деградация происходила в сообществах O4 и P2, ранее подвергшихся более длительному воздействию аминокислотного субстрата, чем вариант EP. Интермедиатами процесса являлись этанол и ацетат. Бензойную кислоту с образованием CH₄ и CO₂ потребляли накопительные культуры O4 и EP, причем вариант EP отличался большей активностью. Незначительное потребление 2-гидроксибензилового спирта с образованием CH₄ и CO₂ происходило только в варианте EP. В качестве промежуточных продуктов в обоих случаях регистрировали ацетат и этанол, в качестве конечных – CH₄ и CO₂. Азокраситель Acid Orange 6 разрушали все три культуры, однако сообщества O4 и P2 использовали его активнее и практически без лаг-периода. В качестве интермедиатов были выявлены сульфаниловая кислота, летучие жирные кислоты и спирты (ацетат и этанол), в качестве конечных продуктов – CH₄ и CO₂. Таким образом, выделенные нами накопительные культуры, изначально разрушавшие изомеры аминокислот, оказались способными к эффективной деградации ряда ароматических субстратов с образованием биогаза в качестве конечного полезного продукта. Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. Котовой И.Б. за помощь в подготовке тезисов.

Реологические характеристики биополимера «Азопол»
Логинов Я.О., Четвериков С.П. (Уфа, biolab316@yandex.ru)

Бактерии рода *Azotobacter* в определенных условиях способны выделять в среду экзополисахариды, которые являются энергетическим резервом клеток в условиях дефицита питательных веществ. Экзопалисахариды – экзогенные продукты метаболизма микроорганизмов, обладающие способностью воздействовать на реологические свойства водных систем и образовывать гели различной плотности при малых концентрациях экзополисахарида. Благодаря этому свойству они могут широко применяться в пищевой, медицинской, фармацевтической, сельскохозяйственной областях промышленности, а также успешно использоваться для повышения нефтеотдачи разработанных, в том числе и обедненных пластов. В Институте биологии Уфимского научного центра РАН был выделен и идентифицирован штамм *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 – продуцент экзополисахарида – основа биополимера «Азопол». Ранее была проведена оптимизация условий культивирования штамма – продуцента для получения высоковязкого экзополисахарида, исследована его химическая структура, проведены модельные лабораторные эксперименты по исследованию реологических характеристик биополимера, позволившие говорить о перспективности его использования при проведении опытно-промышленных работ для повышения нефтеотдачи. В дальнейших исследованиях биополимер был протестирован в качестве потокоотклоняющего агента, применяемого на поздней стадии разработки месторождений с целью регулирования заводнения. Были исследованы реологические характеристики растворов биополимера различной концентрации, полученные разбавлением товарной формы водой (минерализация 15 г/л, характерная для пластовых вод Нефтеюганского региона). Исследования реологических свойств проводились на реометре RheoStress-1 (Haake, Германия) с использованием системы воспринимающих элементов «конус-плоскость». Реометр позволяет измерять разнообразные реологические характеристики жидкостей, используя три основных вида испытаний – сдвиговый, осцилляторный тесты и тест «ползучести». Для тестируемых растворов был применен сдвиговый тест при изменении градиента скорости сдвига в диапазоне от 0,01 до 150 с⁻¹, показавший значения эффективной вязкости порядка 17,7 Па·с для неразбавленного биополимера (100%) и 0,03 Па·с для 9%-ного раствора при градиенте скорости сдвига 0,01 с⁻¹. Результаты исследований зависимости напряжения сдвига от градиента скорости сдвига, фильтрационных тестов на нефтенасыщенных кернах Приобского месторождения в термобарических условиях пласта показали, что биополимер обладает необходимыми регулирующими свойствами.

Влияние фосфорных удобрений, полученных альтернативным неаислотным методом, на численность нитрифицирующих и денитрифицирующих микроорганизмов

*Мамасалиева Л.Э., Мячина О.В. (Ташкент, Узбекистан,
lazizochka@mail.ru; myachina_ov@mail.ru)*

В обеспечении способности почвенной биосистемы поддерживать продуктивность и противостоять негативным факторам, в том числе антропогенным, ключевую роль играют микроорганизмы, которые обитают в почве и выполняют многообразные экосистемные функции. Активное участие в трансформации азотсодержащих соединений принимают нитрифицирующие микроорганизмы. Хотя бактерии-нитрификаторы в почвах малочисленны и имеют небольшой удельный вес в микробном сообществе, они могут проявлять высокую активность, особенно при нерациональных мероприятиях по удобрению почвы. Денитрификация – также один из основных процессов в биологическом цикле превращения соединений азота в биосфере, который

может привести к значительным потерям не только азота вносимых удобрений, но и почвенного азота, и возврату его в атмосферу (до 270-330 млн. т. азота в год). Биологическая денитрификация – основная причина потерь азота удобрений в нейтральных или слабощелочных сероземных почвах. В сообщении излагаются результаты изучения влияния новых комплексных фосфор- и азотсодержащих удобрений КФАУ–АН и КФАУ–АС, полученных альтернативным, некислотным способом активации высококарбонатного фосфорита из месторождений Центральных Кызылкумов, на численность денитрификаторов и нитрификаторов. Исследования нитрифицирующих микроорганизмов в исходной почве показали низкое содержание возбудителей как первой, так и второй фазы нитрификации (0,6 и 0,2 тыс. КОЕ в 1 г. почвы). Внесение же удобрений привело к увеличению их в фазе 2-4 листьев в 0,2-20 раз. Исключение составил вариант с внесением КФАУ–АН, где численность нитрификаторов не претерпела значительных изменений. Из исследуемых удобрений наибольшее влияние на число представителей этой группы оказал суперфосфат (увеличивший число нитрозных и нитратных микроорганизмов в 18,3 и 30 раз соответственно). В последующий период развития хлопчатника (во время цветения) наибольшее количество нитрификаторов отмечено в вариантах с НК и НК + аммофос. В фазе созревания во всех вариантах (в том числе с КФАУ) численность нитрифицирующих микроорганизмов значительно увеличилась (в 6-100 раз). Анализ средних данных за вегетацию показал, что наибольшее количество нитрификаторов и, соответственно, большие потери азотистых соединений были при внесении суперфосфата на фоне НК. Исследование динамики денитрифицирующих микроорганизмов в зависимости от внесения КФАУ показало, что в исследуемом типичном сероземе до внесения удобрений число их было достаточно высоким – 700 тыс. Внесение азотных удобрений в фазе 2-4 листьев снизило численность денитрификаторов во всех вариантах (до 25-250 тыс. КОЕ), кроме НК. Очень высокая численность денитрифицирующих микроорганизмов отмечена в вариантах с аммофосом и суперфосфатом в фазе цветения (в 357-227 раз выше, чем с КФАУ–АН и КФАУ–АС), что с большой долей вероятности может привести к значительным потерям азота. В конце вегетации растений в вариантах с аммофосом и суперфосфатом наблюдается существенное – в 22,7 и 10 раз – снижение числа денитрификаторов, тогда как с НК, КФАУ–АН и КФАУ–АС, напротив, происходит увеличение их числа (в 3,5; 2,3 и 15,7 раз). Тем не менее, в среднем за вегетацию в вариантах с аммофосом и суперфосфатом зафиксировано количество денитрификаторов, в 21,2-72,3 раза превышающее варианты с КФАУ, что указывает на значительное снижение потерь азота почвы и удобрений при внесении удобрений, полученных альтернативным способом активации высококарбонатного фосфорита Центральных Кызылкумов.

Гены биодegradации углеводов у термофильных бактерий рода *Geobacillus*: строение и функции

Машукова А.В., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Назина Т.Н., Полтараус А.Б.
(Москва, mira2070@rambler.ru)

Известно, что спорообразующие бактерии рода *Geobacillus* являются обычным компонентом микробного сообщества высокотемпературных нефтяных пластов. Однако сведения о ферментных системах термофильных микроорганизмов, участвующих в окислении нефти в условиях высокотемпературных нефтяных пластов практически отсутствуют. К моменту начала исследования была опубликована единственная работа с описанием участков гена *alkB* у термофильных бактерий *Geobacillus thermoleovorans* штамм 70 и *G. thermoglucosidasius* штамм TR2.

Целью настоящей работы было изучение процесса биодegradации углеводов и сырой нефти геобациллами и поиск и характеристика ключевого гена дegradации н-

алканов алкан-гидроксилазы у 11 штаммов термофильных аэробных нефтеокисляющих бактерий рода *Geobacillus*.

В результате исследования показано, что изучаемые 11 штаммов геобацилл способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии *n*-алканы с длиной цепи C10-C23. Показана способность геобацилл эффективно деградировать *n*-алканы как в составе нефти, так и в виде индивидуальных субстратов. Положительный результат амплификации с праймерами к гену *alkB* всех исследуемых штаммов свидетельствует о том, что именно алкан-гидроксилазная ферментная система обеспечивает окисление *n*-алканов у изучаемых бактерий. Выявлены и определены последовательности генов *alkB* (около 500 п.н.). В результате секвенирования у геобацилл обнаружено 8 вариантов последовательности гена алкан-гидроксилазы (*alkB-geo1*, *alkB-geo2*, *alkB-geo3*, *alkB-geo4*, *alkB-geo5*, *alkB-geo6*, *alkB-geo7*, *alkB-geo8*). Все обнаруженные гомологи гена *alkB* геобацилл близки по своей нуклеотидной и аминокислотной последовательности алкан-гидроксилазам бактерий рода *Rhodococcus*. Впервые показано, что один штамм бактерий может содержать до семи гомологов гена алкан-гидроксилазы. Обнаруженные у геобацилл гомологи генов *alkB* не обладают видовой специфичностью и могут встречаться в геноме как разных штаммов, так и разных видов бактерий этого рода. Последовательности *alkB-geo1* и *alkB-geo4* были обнаружены у всех геобацилл, включенных в исследование, в то время как набор остальных гомологов менялся в зависимости от штамма. Анализ экспрессии генов *alkB* при росте геобацилл на различных субстратах и в различные фазы роста показал, что ключевую роль в деградации *n*-алканов играют гомологи *alkB-geo4*, *alkB-geo5* и *alkB-geo6*. Установлено, что гомологи имеют широкую субстратную специфичность, а их экспрессия зависит от фаз роста культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты и № 06-04-49128 и № 05-04-39029), Миннауки РФ (Ведущие научные школы, грант № 02.515.11.5070) а также Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) (гранты RBO-1364-МО и RBO-1364-МО-02).

Сериновые протеиназы *Bacillus intermedius*

Митрофанова О.В., Мовчан О.А., Белоногова Н.В., Михайлова Е.О.

(Казань, orbit339@list.ru)

Субтилизиноподобные протеиназы широко распространены среди живых организмов, они были обнаружены у архей, бактерий, грибов, дрожжей и высших эукариот. Экстрацеллюлярные протеолитические ферменты, относящиеся к субтилизинам, выделены из многих представителей рода *Bacillus*. В то же время, внутриклеточные ферменты этого типа исследованы только у нескольких бацилл: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и *B. subtilis*. Объектом нашего исследования были внутриклеточные сериновые протеиназы. *B. intermedius* 3-19. Грубый клеточный экстракт получали путем ультразвуковой обработки клеток, выращенных на жидкой питательной среде в течение 16 часов. Специфическую активность субтилизиноподобных сериновых протеиназ определяли с помощью синтетического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Наличие данной активности в экстракте определяли качественно, через 16 часов после начала реакции. Низкая активность внутриклеточных протеиназ связана, возможно, с наличием специфических ингибиторов. Были проведены начальные этапы очистки ферментов методом ионообменной жидкостной хроматографии. В эксперименте использовали анионо- и катионообменники – ДЭАЭ-целлюлозу и КМ-целлюлозу, соответственно. Очистка ферментов с использованием КМ-целлюлозы не дала положительных результатов, поскольку белки не адсорбировались на носителе. В эксперименте использовали буферный раствор ацетата натрия (0,015М, pH 6,2). По-видимому, для очистки внутриклеточных протеиназ с помощью данного

носителя необходимо использование буферных растворов с более высоким значением рН. При хроматографической очистке белков с помощью ДЭАЭ-целлюлозы был использован буферный раствор Tris-HCl (0,01M, pH8,0). Элюцию проводили ступенчато, методом повышения ионной силы раствора при увеличении концентрации хлорида натрия: 0,1M, 0,3M, 0,5M. Были получены три пика элюции, в каждом из которых наблюдалась общая протеолитическая, а также специфическая активность. Общую протеолитическую активность определяли относительно казеина. Величина удельной специфической активности была максимальна во фракции, полученной при элюции буферным раствором, содержащим 0,3M NaCl. На электрофореграмме данной фракции, видно, что препарат фермента не гомогенен. В качестве второго этапа очистки внутриклеточных сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* была проведена высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием колонки Mono Q – сильного анионообменника. Это позволило получить ферментный препарат с более высокой специфической протеолитической активностью. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ № 09-04-99044-г_ofi. Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. А.М. Мардановой за помощь в подготовке тезисов.

Подбор оптимального метода разрушения клеток *Bacillus intermedius*

Мовчан О.А., Митрофанова О.В., Замалютдинова Н.М., Михайлова Е.О.

(Казань, orbit339@list.ru)

Количество выделенных и изученных внутриклеточных протеолитических ферментов, по отношению к экстрацеллюлярным протеиназам, несравнимо мало. В первую очередь, это связано со сложностью разрушения клеточной стенки бацилл, а также с меньшей стабильностью внутриклеточных белков. Был подобран оптимальный метод разрушения клеток *Bacillus intermedius* 3-19 с целью получения максимального количества внутриклеточных белков. Было проведено сравнение трёх методов разрушения клеток бацилл: механическое растирание с абразивом, ферментативное разрушение (обработка лизоцимом), воздействие ультразвука. Культуру *B. intermedius* выращивали на жидкой среде в течение 16 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием и отмывали от культуральной жидкости 0,8% раствором NaCl. Для ферментативного разрушения клеточную массу смешивали в соотношении 1:3 с буферным раствором Tris-HCl (0,015 M, pH 7,5), содержащим 0,3% KCl и лизоцим (2 мг/мл). Полученную смесь инкубировали в течении 30 мин. при 37°C, после чего центрифугировали 15 мин. при 10 тыс. об/мин. Количество внутриклеточных белков в супернатанте составило 2,62 мг/мл. Микроскопирование осадка показало наличие неразрушенных протопластов. По-видимому, лизоцим не оказывает влияния на цитоплазматическую мембрану клеток, что не позволяет внутриклеточным белкам перейти в раствор. Данный метод необходимо сочетать с механической или ультразвуковой обработкой. Растирание клеток проводили, смешивая клеточную массу в соотношении 1:1 с буферным раствором Tris-HCl (0,015 M, pH 7,5), содержащим 0,3% KCl, и добавляя абразив. После обработки смесь центрифугировали. Содержание белка в супернатанте – 5 мг/мл. Недостатками метода являются высокая трудоемкость и длительность обработки. Воздействию ультразвука подвергали суспензию клеток (10%) в буферном растворе Tris-HCl (0,01M). Буфер варьировал по значениям рН (8,0 и 9,0), а также содержанию лизоцима (0 и 1 мг/мл). Обработку проводили в течение 1 мин. Наиболее полное разрушение клеток (количество экстрагированного белка – 19,1 мг/мл) наблюдалось в условиях pH8,0 и в присутствии лизоцима. Увеличение времени ультразвукового воздействия приводило к снижению количества белка в клеточном экстракте. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в

рамках гранта РФФИ № 09-04-99044-г_ofi. Авторы выражают признательность доценту, к.б.н. А.М. Мардановой за помощь в подготовке тезисов.

Особенности формирования микрофлоры в результате компостирования

Муравьева Ю.В., Гальперина А.Р. (Астрахань, alina_r_s@rambler.ru)

Метод компостирования различных органических отходов, в т.ч. таких субстратов, как отходы растениеводства, используется для получения органических удобрений. Получение компостов невозможно без участия в этом процессе самых разнообразных микроорганизмов, как бактерий, так и грибов, растущих в мезофильных или термофильных условиях. Активность такого сообщества микроорганизмов зависит от состава и соотношения компонентов, подвергающихся биоразложению. В ходе проведенной работы были изучены особенности формирования микрофлоры в результате процессов, происходящих при компостировании растительных остатков. Объектами исследования служили несколько субстратов, использовавшихся для закладки компостной кучи – растительные остатки кустов томатов (цветки, листья и стебли, корни перед закладкой), контрольная почва с участка, на котором была заложена куча, а также проба почвы с компостной кучи (через 1,5 мес. после закладки). Компостная куча закладывалась слоями. Основу каждого слоя составляли кусты томатов, собранные на полях после сбора урожая, каждый из слоев засыпан почвой и свежей состриженной газонной травой. Размер $\approx 1 \times 1$ м, высота около 50 см. В первые двое суток после закладки кучи наблюдалось повышение температуры до 45°C , что говорило о резкой интенсификации микробиологических процессов превращения веществ и энергии. В последующие дни произошло остывание компостной кучи, и на момент взятия образца (через 1,5 месяца после закладки) ее температура была равна температуре воздуха (11°C). Возможно, это связано со сменой сезона года. Согласно проведенным исследованиям, интенсивность микробиологических процессов в компостной куче понижается по сравнению с процессами, происходящими в филлосфере и ризосфере и ризоплане растений-субстратов. Наиболее существенно снижаются процессы круговорота азота, особенно азотфиксация. В то же время в компостной куче наблюдается усиление процесса аэробного разложения целлюлозы. Таким образом, в первые месяцы компостирования отходов растениеводства наиболее интенсивно идут процессы разложения целлюлозы. Процессы круговорота азота несколько замедляются. Но поскольку компостирование занимает довольно продолжительное время, то возможна последующая интенсификация процессов круговорота азота, особенно азотфиксации. В настоящее время эксперимент по изучению особенностей формирования микрофлоры в результате компостирования продолжается.

Применение бактерий рода *Bacillus* в биотехнологии

Мынбаева М.Ж. (Астана, Казахстан, lcm@biocenter.kz)

Культуры микроорганизмов и продукты их метаболизма применяются во всех сферах жизнедеятельности человека благодаря их биологической активности, связанной со способностью продуцировать различные биологические вещества. К ним относятся и бациллы. Они являются продуцентами различных биологически активных веществ: ферментов, антибиотиков, витаминов и т.д. Поскольку они выделяют ферменты в культуральную жидкость, получение их препаратов не представляет особых трудностей. Многие виды обладают антагонистическими свойствами и вырабатывают большинство антибиотиков, известных на сегодняшний день. Целью работы было получение культур бацилл, перспективных в качестве продуцентов ферментов. Было выделено 50 штаммов бактерий рода *Bacillus subtilis* из почвы, зерна, муки, хлебобулочных изделий. Дана

характеристика их культурально-морфологических и биохимических свойств. Проведена работа по изучению протеолитической, амилалитической, липолитической активности. Получены следующие результаты: 50 изолятов обладают протеолитической активностью, 39 изолятов – амилалитической, 29 изолятов – липолитической активностью. Была исследована вирулентность и токсичность штаммов, а также их токсигенность *in vivo*. Результаты показали, что изученные объекты не являются патогенными для человека и животных, что делает их безопасными при использовании в научных и производственных целях. Таким образом, исследуемые объекты высоко активны, не патогенны и могут применяться как продуценты ферментов в животноводстве, растениеводстве, пищевой промышленности и др. В данный момент проводятся работы по исследованию их генетических характеристик для подтверждения видовой принадлежности и исследованию на наличие «островков патогенности», оценке их биобезопасности, так как более активные культуры планируется внедрить в производство. Автор выражает признательность к.б.н. С.С.Ануарбековой, д.б.н., профессору К.Х. Алмагамбетову за помощь в подготовке тезисов.

Филогенетический состав микробного сообщества термофильных анаэробных микроорганизмов, диссимиляционно восстанавливающих нерастворимые формы трехвалентного железа

Непомнящая Я.Н. (Москва, yanann@rambler.ru)

Микроорганизмы, способные диссимиляционно восстанавливать минералы трехвалентного железа Fe (III), не образуют отдельной филогенетической группы и найдены в различных таксонах прокариот. Из литературных источников известно несколько физиологических стратегий восстановления нерастворимых минералов Fe (III) микроорганизмами. Целью данной работы было исследование филогенетического состава микробного сообщества, восстанавливающего нерастворимые минералы Fe (III) в качестве акцептора электронов в условиях прямого и ограниченного контакта клеток микроорганизмов с поверхностью минерала. Из осадка и воды пресного термального источника Долины Гейзеров Камчатки были получены накопительные культуры термофильных анаэробных железовосстанавливающих микроорганизмов (ТЖВМ). Накопительные культуры инкубировали при температуре 65°C и pH 6,8. Донорами электронов служили ацетат и лактат. В качестве акцепторов электронов выступали ферригидрит, доступный для клеток микроорганизмов, и ферригидрит, изолированный от прямого контакта с клетками путем заключения его в гранулы альгината (1,5%). Для исследования возможного использования прокариотами экзогенных медиаторов железоредукции в среду добавлялся антахинон-дисульфат (0,1 мМ). Из 6 устойчивых накопительных культур ТЖВМ (3 последовательных 5% (об.) пересева) была выделена тотальная ДНК. Фрагменты генов 16S рРНК были амплифицированы с использованием таксон-специфичных праймеров к домену Bacteria и разделены с помощью метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза с последующим определением нуклеотидной последовательности индивидуальных микроорганизмов. Сравнительный анализ генов 16S рРНК двух накопительных культур, восстанавливающих Fe (III) путем прямого контакта клеток с поверхностью минерала, показал наличие двух ТЖВМ *Sphingomonas* sp. и *Carboxydocella* sp. со степенью сходства нуклеотидных последовательностей с ближайшими культивируемыми организмами *Sphingomonas echinoids* – 90% и *Carboxydocella ferrireducens* – 97%, соответственно. Четыре накопительные культуры восстанавливали ферригидрит в отсутствие прямого контакта клеток с поверхностью минерала. Две накопительные культуры ТЖВМ были способны восстанавливать железо с помощью эндогенных медиаторов и содержали представителей типа *Firmicutes*, класс *Clostridia* – *Carboxydotherrmus* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Thermobrachium* sp., *Caldicellulosiruptor* sp., *Carboxydotherrmus* sp.,

Carboxydocella sp. Для большинства родов охарактеризованных бактерий была показана способность к железоредукции. Две накопительные культуры восстанавливали ферригидрит с помощью экзогенного медиатора железоредукции. Филогенетический анализ этих накопительных культур выявил представителей двух типов: Firmicutes, класс Clostridia – *Carboxydotherrmus* sp., *Thermincola* sp., *Gelria* sp., класс Thermolithobacteria – *Thermolithobacter* sp. и *Thermotogae*, класс Thermotogae – *Fervidobacterium* sp., *Thermotoga* sp. Проведённый филогенетический анализ выявил представителей термофильных анаэробных бактерий, способных восстанавливать нерастворимые минералы Fe (III) в условиях прямого и ограниченного контакта клеток микроорганизмов с поверхностью минерала, относящихся к различным филогенетическим и физиологическим группам.

Влияние *Yersinia pseudotuberculosis* на экспрессию генов глюконазы и фенилаланин аммиак-лиазы в каллусах женьшеня

Персиянова Е.В., Киселёв К.В. (Владивосток, helen-pers@yandex.ru)

К настоящему времени многие исследователи приходят к выводу, что некоторые факторы патогенности бактерий, вызывающие заболевания у животных и растений, имеют общее происхождение и функционально сходны. С другой стороны, и механизмы защиты от патогенов у растений и животных имеют общие черты. Некоторые не фитопатогенные бактерии (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) в условиях эксперимента способны инфицировать растительные ткани. Многолетние исследования *Y. pseudotuberculosis* показали, что для поддержания жизнеспособности и численности популяции во внешней среде эти микроорганизмы используют растительные субстраты, которые являются основными факторами передачи возбудителя псевдотуберкулёза человеку. Ранее нами установлено, что бактерии псевдотуберкулёза и некоторые их токсины разрушают клетки каллусной культуры женьшеня. Микроорганизмы проникали в цитоплазму растительных клеток и лизировали последние, причем бактерии в ассоциации с клетками погибали. Подобная динамика взаимодействия бактерий с растениями привела к идее исследовать иммунный ответ растений на действие патогена. В связи с этим была поставлена задача выявить индукцию экспрессии защитных генов женьшеня – фенилаланин аммиак-лиазы (*PAL*) и β -1,3-глюконазы (*GLU*), ответственных за синтез вторичных метаболитов и PR-2 (pathogenesis-related) белков, соответственно. В эксперименте использовали вирулентный штамм *Y. pseudotuberculosis* I серовара, термостабильный (ТСТ) и термолабильный (ТЛТ) токсины данного микроорганизма, а также каллусную культуру женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мей., трансформированную "пустым" бинарным вектором рPCV002. Было установлено, что при действии *Y. pseudotuberculosis* и их токсинов экспрессия генов *PAL* женьшеня в 2-4 раза превосходит таковую в неинфицированных клетках (контроль). Большим стимулирующим действием обладали бактерии и ТЛТ. Также под действием иерсиний и их токсинов уже в первые сутки культивирования в 2-3 раза возрастала экспрессия гена *GLU* по сравнению с контролем. Повышенная экспрессия генов *PAL* и *GLU* сохранялась и на 3 сутки воздействия иерсиний. По-видимому, ослабление иммунного ответа к третьим суткам культивирования связано с массовой гибелью клеток женьшеня. Таким образом, клетки женьшеня активизируют экспрессию генов фенилаланин аммиак-лиазы и β -1,3-глюконазы под действием иерсиний и их токсинов, что свидетельствует о развитии иммунного ответа в растительных клетках.

Молекулярно-эпидемиологическое исследование штаммов микобактерий туберкулезного комплекса в группах риска в Санкт-Петербурге в 2007-2008 гг.
Пестова Н.Е., Черняева Е.Н. (Санкт-Петербургеchernya@gmail.com)

Исследование было посвящено изучению штаммов микобактерий туберкулезного комплекса (МТК) среди представителей социально-дезадаптивных слоев населения, состоящих на учете в ГПТД Санкт-Петербурга: бездомных, ВИЧ-инфицированных и заключенных.

Цель исследования заключалась в определении генетического разнообразия штаммов МТК, циркулирующих в Санкт-Петербурге в 2007-2008 годах в группах риска методом сполиготипирования.

В результате генотипирования 31 изолята МТК, полученных от бездомных, было обнаружено, что 18 изолятов (59%) относились к семейству *M. tuberculosis* Beijing, 5 изолятов (17%) – к семейству *M. tuberculosis* LAM 9, 2 изолята – к семейству 33 (6%), единичные случаи (по 3% каждый) относились к семействам Haarlem 1, Haarlem 3, *M. tuberculosis* T1, *M. tuberculosis* T2, *M. tuberculosis* T3 и *M. tuberculosis* T4.

Генотипирование штаммов МТК, обнаруженных у 28 заключенных, дало следующие результаты: 24 изолята (85%) относились к семейству *M. tuberculosis* Beijing, 2 изолята (7%) – к семейству 36, единичные случаи (по 4% каждый) – к семейству 33 и к семейству Haarlem 3.

Результаты сполиготипирования изолятов МТК, обнаруженных у 59 ВИЧ-инфицированных индивидов, показали следующее распределение по семействам: 43 изолята (72%) были отнесены к семейству *M. tuberculosis* Beijing, 5 изолятов (8%) – к семейству *M. tuberculosis* LAM 9, 2 изолята (3%) – к семейству *M. tuberculosis* T1, 3 изолята (5%) – к семейству Haarlem 1, единичные изоляты (по 2% каждый) относились к семейству 34, семейству 35, семейству *M. tuberculosis* T2, семейству *M. tuberculosis* T4 и семейству *M. tuberculosis* LAM8.

В качестве контрольной группы для оценки распределения различных семейств штаммов МТК среди населения города Санкт-Петербурга было проанализировано 13 изолятов, полученных от пациентов с впервые выявленным туберкулезом, не относящихся ни к одной из исследуемых групп риска. При этом 6 изолятов (46%) относились к семейству *M. tuberculosis* Beijing, 3 изолята (23%) – к семейству *M. tuberculosis* T1, 2 изолята (15%) – к семейству *M. tuberculosis* LAM 9, единичные изоляты (по 8% каждый) относились к семействам Haarlem 1 и *M. tuberculosis* T3.

При анализе полученных результатов было установлено, что семейство *M. tuberculosis* Beijing является доминирующим среди населения города Санкт-Петербурга, и является наиболее часто встречающимся среди всех исследуемых групп риска. Однако процентное соотношение частоты встречаемости семейства *M. tuberculosis* Beijing распределено неравномерно среди различных групп риска. Так, среди заключенных и ВИЧ-инфицированных индивидов, как наиболее обособленных и замкнутых групп, данное семейство значительно преобладает (85% и 72%, соответственно).

Авторы выражают признательность д.б.н., профессору А.П. Козлову за научное руководство и ценные практические советы, д.м.н. В.Ф. Жемкову за предоставление клинического материала и помощь в организации работы.

Биоконверсия верхового торфа с получением углеводно-белковой кормовой добавки

Погорелова Ю.Н. (Минск, Беларусь, yuliapaharelava@open.by)

Одним из перспективных направлений решения проблемы дефицита кормового белка является его производство микробиологическим способом, в частности,

био конверсией растительного сырья. Микробный белок имеет сбалансированный состав по аминокислотам и другим питательным веществам, может многотоннажно выпускаться в промышленности вне зависимости от климатических условий на сравнительно небольших производственных площадях. Кроме того, микроорганизмы имеют значительно большую удельную скорость роста по сравнению с растениями и животными. Применяемый в промышленности способ получения кормовых дрожжей переработкой гидролизатов растительного сырья отличается высокой энергоемкостью и образованием значительного количества отходов. Альтернативой этому является био конверсия твердых субстратов на основе растительной биомассы под действием микроорганизмов. Важным фактором при получении микробного белка является наличие дешевых, доступных и эффективно используемых микроорганизмами сырьевых ресурсов. Наряду с традиционно используемыми древесиной, соломой и другими растительными субстратами интерес представляет верховой сфагновый торф с низкой степенью разложения. Он является продуктом частичной биодеструкции растительного сырья в естественных условиях и по своему химическому составу практически не отличается от растений, из которых он образовался. В нем содержатся полисахариды, азотистые вещества, макро- и микроэлементы, витамины, антисептики и др., обуславливающие возможность его использования в качестве кормовой добавки или сырья для ее производства. Имеется опыт получения из верхового торфа углеводсодержащих кормовых продуктов и добавок обработкой различными способами, обеспечивающими повышение его перевариваемости или обогащение моносахаридами, а также способы повышения кормовой ценности торфа путем обогащения его протеином, например добавлением синтетических азотистых веществ. При этом получаемый продукт не обеспечивает требуемой сбалансированности кормов по аминокислотам, в т.ч. незаменимым, микро- и макроэлементам, витаминам. В качестве продуцентов белка использовали культуры мицелиальных грибов *Aspergillus* sp. ТБ 03 и *Trichoderma* sp. ТБ 01, выделенные путём селекции из верхового торфа. Результаты проведенных исследований показали, что после ферментации в получаемом продукте содержится 9,5-12,9% сырого протеина, в т.ч. 8,8-10,4% истинного белка. Для био конверсии предпочтительно использовать ассоциацию микромицетов. Полученные данные позволяют судить о целесообразности процесса био конверсии верхового торфа и возможности применения получаемых продуктов в животноводстве. На основании экспериментальных данных разработана технология получения углеводно-белковой кормовой добавки на основе верхового торфа, защищенная патентом Республики Беларусь.

Физиолого-биохимические особенности диких штаммов дрожжей

Полякова М.М. (Астрахань, Mashunchic-girl@rambler.ru)

Из всех известных микроорганизмов дрожжи могут быть отнесены к одним из наиболее ценных в практическом отношении. Дрожжи являются хемоорганогетеротрофами и используют органические соединения, как для получения энергии, так и в качестве источника углерода. При практическом применении дрожжей важное значение имеют продукты их вторичного метаболизма, выделяемые в среду в малых количествах: сивушные масла, ацетон, диацетил, масляный альдегид, изоамиловый спирт, диметилсульфид и другие. Целью работы было выявление амилотической, протеолитической, уреазной активности и рост на безвитаминовой среде. Выделено 16 штаммов дрожжей с листьев и коры плодовых деревьев. Пробы отбирались в соответствии с правилами асептики, время отбора проб сентябрь 2008 года, место отбора проб – садовый участок в районе села Три протока Астраханской области. Дрожжи выделяли с помощью среды Сабуро с добавлением антибиотиков, для предотвращения роста бактерий. Выделены 16 штаммов дрожжей с различными

морфологическими признаками с листьев, плодов и коры различных плодовых деревьев: *Prunus avium*, *Prunus pumila*, *Prunus armeniaca*, *Prunus cerasus*, *Prunus cerasifera*, *Pyrus domestica*, *Elaeagnus angustifolia*. Способность дрожжей синтезировать все необходимые для роста витамины или потребность в наличии каких-нибудь из них является одной из характеристик дрожжей. Культивирование осуществляли на специальной безвитаминной среде. Наблюдали рост всех дрожжей. С помощью качественных реакций были обнаружены витамины В₁ (тиамин) и А (ретинол). Витамин В₁ выделяли все штаммы, кроме штамма 9. Витамин А синтезировали штаммы 1, 4, 5, 6, 7, 10. Витамин В₂ (рибофлавин) дрожжи не синтезировали. Многие дрожжи способны разлагать мочевины при относительно высоком ее содержании в среде. Для выявления этой способности используют среду Христенсена. В большинстве случаев уреазной активностью обладают базидиомицетные дрожжи. В проведенном эксперименте уреазной активностью обладали дрожжи всех выделенных штаммов, кроме штамма 8 и 10. Следовательно, можно предположить, что штаммы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 относятся к базидиомицетным дрожжам, а штаммы 8 и 10 – к аскомицетным дрожжам. Амилолитическую активность проверяют с помощью агаризованной среды, содержащей водорастворимый крахмал, проводя тест на амилазу с йодом (реактив Люголя). В положительном случае не происходит окрашивания среды в синий цвет, среда остается бесцветной, либо четко видны зоны гидролиза по краю колонии. Высокая амилолитическая активность отмечена у штаммов 1, 2, 3, 6, 9, 12, 13, 14, 15 (зона гидролиза с диаметром 10-20 мм). Активность отсутствовала у штаммов 8 и 16. Протеолитическую активность дрожжей исследуют с помощью молочного агара, отмечая просветление среды при гидролизе казеина молока. Высокая протеолитическая активность отмечена у штаммов дрожжей 1, 3, 4, 5, 13, 14, 15 (зона гидролиза с диаметром 10-20 мм). Штаммы 2, 6, 7, 8 не обладали протеолитической активностью.

Изучение липолитических свойств бактерий рода *Bacillus* для биологической очистки сточных вод от жировых отложений

Сармурзина З.С. (Астана, Казахстан, lcm@biocenter.kz)

Развитие пищевых предприятий и расширение сети быстрого питания за последние годы сделало особенно актуальным решение проблемы очистки сточных вод предприятий пищевой промышленности от жиров, масел, белков и других органических соединений. Способность разлагать растительные и животные жиры обнаружена у бактерий (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia*, *Micrococcus* и др.) и плесневых грибов (*Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*). Механизм биодеструкции заключается в усвоении жира микроорганизмами в качестве источника энергии, синтезирующими липолитические ферменты, под воздействием которых жиры разлагаются на воду, углекислоту, нитриты, сульфаты и легкий осадок. Осадок представляет собой экологически безвредные нетоксичные продукты микробного метаболизма, соответствующие 4-5 классу опасности. Сокращение массы твердых жиров составляет от 60% до 90%. На основе липолитических ферментов создают бактериальные препараты, применяемые для очистки сточных вод, в том числе, продуцируемых бациллами. Целью работы было получение культур бацилл, обладающих высокой липолитической активностью, перспективных для очистки сточных вод от жировых отложений. В ходе исследовательской работы было получено 143 изолята бацилл, выделенные из различных экологических ниш (сточных вод мясокомбината, речной воды, почвы, зерна). У 80 изолятов определены морфолого-культуральные и биохимические свойства. Проведена работа по изучению качественного определения липолитической активности на средах содержащих твин-20, стеариновой и олеиновой кислот, а также по отношению к органическим жирам (бараний, говяжий, свиной, масло растительное), биодegradация животного и растительного жиров. В

результате проведенных исследований получены следующие результаты: 76 изолятов обладают липолитической активностью на средах содержащих твины лауриловой, стеариновой и олеиновой кислот, 28 изолятов обладают липолитической активностью по отношению к органическим жирам и маслу растительному. Биодegradация животного и растительного жиров составляет от 45% до 97%. В дальнейшей работе планируется определение липазной активности, подбор оптимальных сред для наибольшего выхода фермента липазы, проведение модельных экспериментов по окислению жиров в различных системах. Проведенное исследование показало, что 28 изолятов культур бацилл обладают высокой липолитической активностью и могут быть использованы как продуценты фермента липазы для очистки сточных вод от жировых отложений. Автор выражает признательность к.м.н. С.С. Ануарбековой и д.м.н., профессору К.Х. Алмагамбетову за помощь в подготовке тезиса.

Характеристика микробных сообществ эпителия прямой кишки при колоректальной карциноме

*Сафиуллина Д.Р., Мамедзаде К.Рк., Ильинская О.Н., Гатауллин И.Г.
(Казань, daria.safiullina@gmail.com)*

Для ряда заболеваний человека немикробной этиологии показана сложная взаимосвязь с определенными инфекциями. Известным примером является связь между инфекцией *Helicobacter pylori* и развитием рака желудка и MALT лимфомы. Зависимость между бактериальной инфекцией и канцерогенезом показана также для *Salmonella typhi* (развитие рака желчного пузыря), *Chlamydomphila pneumoniae* (развитие некоторых форм рака легких). Рядом исследователей показано также, что некоторые другие микроорганизмы вызывают хроническую инфекцию или выделяют токсины, что ведет к нарушениям клеточного цикла и неконтролируемому делению клеток. Мы предположили, что возникновение колоректальной карциномы также может быть связано с развитием инфекции в клетках эпителия кишечника. Для пораженных клеток эпителия толстой и прямой кишки характерна определенная инфицированность штаммами микроорганизмов, отличающимися от таковых у непораженного эпителия. Целью данного исследования было выявление различий в составе микробных сообществ эпителия прямой кишки, пораженного и не пораженного опухолью. Биоптаты прямой кишки со слизистой были взяты от 53 пациентов, подвергшихся оперативному рассечению кишки. Из них у 20 был подтвержден диагноз – рак прямой кишки (ректальная карцинома), оперативное вмешательство заключалось в удалении опухоли. От 8 пациентов с ректальной карциномой были взяты также образцы слизистой из незатронутых опухолью участков кишки (контроль А). У 33 пациентов злокачественных новообразований в кишечнике гистологически выявлено не было, биоптаты, взятые у данной группы пациентов, приняты за контроль В. Образцы брались стерильно, помещались в 0,9% раствор NaCl, далее в лабораторных условиях проводилось суспендирование секционного материала и посев на мясо-пептонный агар и плотные селективные среды (кровяной агар, среда Эндо). Через 24 часа проводили учет колоний, колонии каждого типа описывали, микроскопировали с окраской по Граму. Результаты данного этапа исследований позволили выявить некоторые различия в составе штаммов микроорганизмов, ассоциированных с поврежденным и неповрежденным эпителием прямой кишки. В целом для слизистой прямой кишки, пораженной карциномой, характерна большая, чем для неповрежденной слизистой, общая обсемененность и общее микробное число. Особенность пораженной карциномой слизистой в том, что для нее отмечается большая встречаемость грамотрицательных кокков, обладающих гемолитической активностью. Данные микроорганизмы встречались почти в половине образцов пораженной слизистой (45%), в то время как в контроле А не отмечались, в контроле В были отмечены лишь в 6% образцов. В 57% образцов пораженной слизистой

отмечены палочки семейства *Enterobacteriaceae*, также обладающие гемолитической активностью. В контролях А и В эти бактерии отмечались в 20% и 9% образцов, соответственно. Таким образом, установлены различия в микробиологическом составе сообществ микроорганизмов, заселяющих колоректальные слизи. Результаты работы позволяют предположить наличие связи между обнаружением на поверхности слизистой прямой кишки определенных групп бактерий и развитием у пациентов колоректальной карциномы.

Стимулирующее влияние дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на развитие растений томатов

Терпиловский М.А., Каменек Д.В. (Ульяновск, maxim@terpilovsky.ru)

Подвиды почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis* Berliner продуцируют кристаллические включения – дельта-эндотоксины, обладающие энтомоцидной, антибактериальной и антифунгальной активностью. Антимикробная активность дельта-эндотоксина может лежать в основе его иммунизирующего действия на растения. Последнее может оказывать стимулирующее влияние на развитие растений на естественном инфекционном фоне. В работе использовали в качестве продуцента дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* шт. 202. Объектами исследования служили семена томатов сортов Чудо рынка, Москвич, Фитофтороустойчивый и Ракета. Для оценки влияния дельта-эндотоксина на всхожесть семян томатов их обрабатывали двумя концентрациями (0,001% и 0,005%). Полученные данные свидетельствуют о наличии стимулирующего влияния дельта-эндотоксина на всхожесть семян сортов Москвич и Фитофтороустойчивый. Повышение всхожести под влиянием дельта-эндотоксина по сравнению с контролем составило от 23,5 до 39,7% и от 3,9 до 19,7%, соответственно. Для выявления стимулирующего влияния дельта-эндотоксина на развитие растений последние выращивали на естественном инфекционном фоне в течение 30 суток. Обработку растворами дельта-эндотоксина начали осуществлять на 9 сутки со дня посева с периодичностью один раз в неделю. Растения, обработанные дельта-эндотоксином в концентрациях 0,001% и 0,005%, достоверно опережали по длине стебля контрольные растения на 43,5% и 35,9%, соответственно (30 сутки). Обработка растений растворами дельта-эндотоксина способствовала увеличению среднего количества листьев: различия между контрольными и опытными растениями, обработанными дельта-эндотоксином в концентрациях 0,001% и 0,005%, на 18 сутки после начала обработок составили 44,5% и 48,3%, соответственно. Толщина стебля у растений, обработанных дельта-эндотоксином в концентрации 0,005%, превышала контрольную на 9,5%. Вероятно, выраженный стимулирующий эффект дельта-эндотоксина на развитие растений связан с его способностью подавлять патогенную микрофлору, оказывая иммунизирующее действие.

Новый антибиотический комплекс, синтезируемый природным штаммом

***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194**

Устюгова Е. А. (Москва, ustyugova.katya@mail.ru)

Молочнокислые бактерии используются в течение столетий при ферментации пищевых продуктов не только для создания аромата и улучшения текстуры продуктов, но и благодаря их способности предотвращать рост патогенных микроорганизмов за счет синтеза антимикробных веществ, как-то: органических кислот, перекисей, ферментов и бактериоцинов. Известно, что лактококки *L. lactis* subsp. *lactis* являются продуцентом бактериоцина низина, широко используемого в пищевой промышленности в качестве биоконсерванта пищевого сырья. Однако широкое использование низина привело к появлению к нему устойчивых форм микробов. Кроме того, низин эффективен, в

основном, против грамположительных бактерий и активность его резко снижается при нейтральных значениях рН продуктов и сырья. Поиск новых биоконсервантов является актуальной задачей. Из свежего коровьего молока Бурятии выделен *L. lactis* subsp. *lactis* штамм 194, который проявлял антибиотическую активность как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии, а также грибы *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, которые являются основной причиной микробной порчи сырья. При фракционировании этого антибиотического комплекса были выделены два активных компонента. Один из них являлся пептидом, стабильным при кислых значениях рН и ингибирующим рост только грамположительных бактерий, как и низин, а второй, на долю которого приходилось до 92% от суммарной антибиотической активности штамма, был отнесен к новому классу химических соединений и отличался широким спектром антимикробного и фунгицидного действия. Внесение его в среду культивирования *L. lactis* subsp. *lactis* в концентрации 0,5 % повысило антибиотическую активность штамма на 60%. Установлено, что важную роль в процессе биосинтеза этого нового антибиотика штаммом 194 играет рН среды. Добавление мела в среду в количестве 1,5 % как буферного агента увеличивало антибиотическую активность культуральной жидкости более чем на 30%.

Влияние фосфорсодержащих бактериальных удобрений на активность карбогидраз в средnezасоленном сероземе

Халимов Б.Г., Мячина О.В. (Ташкент, Узбекистан, uzfa.bek@mail.ru;
myachina_ov@mail.ru)

Определение уровня активности ферментов, катализирующих биохимические процессы, которые связаны с синтезом и распадом в почвах различных углеводов, является чрезвычайно важной задачей. В частности, представляет большой интерес изучение активности карбогидраз в средnezасоленном сероземе Сырдарьинской области Узбекистана, имеющем низкое содержание гумуса (0,6-0,8%). Эти почвы при достаточно высоком содержании токсичных для растений и микроорганизмов ионов Cl^- , SO_4^{2-} и HCO_3^- (0,024%, 0,380% и 0,027%, соответственно) имеют высокую биологическую активность, что и является причиной их малогумусности. В связи с этим целью исследования было определить влияние фосфорсодержащих бактериальных удобрений – ФБУ (разработанных специально для засоленных почв) на активность почвенных ферментов, отвечающих за синтез и разложение углеводовсодержащих веществ. Новое удобрение ФБУ было получено в лаборатории агрохимии Института общей и неорганической химии путем микробиологической активации Кызылкумских бедных фосфоритов гало- и термотолерантным штаммом бактерий рода *Bradyrhizobium*. В своем составе ФБУ имеет около 9% усвояемого P_2O_5 , живые микроорганизмы, а также продукты их жизнедеятельности – биологически активные вещества (органические кислоты, спирты и их производные, аминокислоты и др.). Эти соединения химически активны и легко вступают в реакции с растворимыми солями, в избытке имеющимися в почве. Внесение ФБУ позволяет снизить щелочность, улучшить питательный режим, увеличить доступность для растений соединений азота, фосфора и калия. Исследовали две формы ФБУ – жидкую и сухую. Варианты сравнения: $\text{N}_{200}\text{K}_{60}$ – фон; $\text{N}_{200}\text{P}_{140}\text{K}_{60}$. ФБУ-С и ФБУ-Ж вносили на фоне $\text{N}_{200}\text{K}_{60}$. Азот был внесен в виде аммиачной селитры из расчета 200 кг/га, фосфор – в виде суперфосфата и ФБУ из расчета 140 кг/га, калий – в виде KCl из расчета 60 кг/га. Исследование активности β -1,4-глюкозидазы, хитиназы (N-ацетил- β -D-глюкозаминазы), целлюбиогидролазы и ксиланазы проводили флуоресцентным методом мультисубстратного тестирования. Указанные ферменты катализируют гидролитическое расщепление гликозидных связей различных ди- и полисахаридов и играют чрезвычайно важную роль в разложении как почвенного органического вещества, так и свежих растительных остатков. Установлено, что

активность глюкозидазы и хитиназы во всех исследованных вариантах была высокой (691-743 и 497-519 $\mu\text{Моль метилумбеллиферона} \cdot \text{час}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ почвы соответственно), и хотя в вариантах с ФБУ-С и ФБУ-Ж превышала контроль на 7-8%, однако в целом (при $P < 0,05$) не имела достоверных отличий. Активность ксиланазы и целлюбиогидролазы была намного ниже (61-74 и 13-19 $\mu\text{Моль метилумбеллиферона} \cdot \text{час}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ почвы, соответственно). Однако применение ФБУ-С и ФБУ-Ж достоверно увеличило ксиланазную (на 22-24%) и целлюбиогидролазную (на 12-15%) активность. Таким образом, установлено, что применение ФБУ (как в жидкой, так и в сухой формах) на среднесоленной почве не оказывает негативного влияния на биологическую активность, однако и не способствует значительной интенсификации деструкции углеводсодержащих соединений.

Трансформация 2,4,6-тринитротолуола низшими эукариотами в условиях непрерывного культивирования

Хиляс И.В., Сафиуллина Л.Ф., Зиганшин А.М. (Казань, iriska-kiska87@mail.ru)

Интенсивное развитие химической и военной промышленности приводит к накоплению в биоценозах токсичных и устойчивых загрязнителей, большая доля которых принадлежит ароматическим нитросоединениям. Одним из представителей данного класса токсикантов является 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ).

Большое количество ТНТ было произведено в период Второй мировой войны, и значительная его часть до сих пор обнаруживается в почве в неизменном виде, что, в свою очередь, ведет к необходимости использования биотехнологических процессов для очистки окружающей среды от данного поллютанта.

Выделенный из антропогенно загрязненной территории штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* AN-L15 оказался способным к трансформации ТНТ по пути восстановления его ароматического кольца с образованием менее токсичных моно- и дигидридных комплексов. Данный путь биотрансформации ведет к детоксикации, химической модификации, а в дальнейшем и к минерализации исходного ксенобиотика.

Трансформация ТНТ штаммом *Y. lipolytica* AN-L15 протекала в биореакторах при непрерывной подаче свежей питательной среды, содержащей ТНТ в количестве 0.44 мМ, и постоянном оттоке образовавшихся продуктов метаболизма и части биомассы. Были разобраны пути образования моно- и дигидридных комплексов, подобраны оптимальные значения рН среды для возможно более глубокой деструкции ТНТ. В первом биореакторе рН среды поддерживался на уровне 5.5-6.0, необходимом для превращения максимального количества ТНТ в его моногидридный комплекс (3-Н-ТНТ). В связи с повышенной продукцией органических кислот дрожжами во втором биореакторе рН среды снижался в нем до 3.5-4.0, что вело к ускоренному превращению 3-Н-ТНТ в дигидридные производные (3,5-2Н-ТНТ⁺) и их последующей деструкции с аккумуляцией нитрит и нитрат ионов.

На клетках *Paramecium caudatum* была исследована токсичность ТНТ и продуктов восстановления его ароматического кольца. Данный тест показал снижение уровня токсичности в процессе деструкции ТНТ-гидридных комплексов.

В настоящее время рассматривается возможность применения разработанной биотехнологии для очистки ТНТ-загрязненных объектов в промышленных масштабах.

Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. Р.П. Наумовой за помощь в подготовке тезисов.

Высоковязкий экзополисахарид бактерий *Pseudomonas putida*

Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П. (Уфа, gaisar-1986@mail.ru)

Микробные экзополисахариды (ЭПС) – стратегически важный продукт. Уникальные свойства микробных ЭПС позволяют использовать их в самых различных отраслях: от медицины и сельского хозяйства до тяжелой промышленности. Изучаемый нами штамм бактерий *Pseudomonas putida* ИБ-17 из Коллекции микроорганизмов Института Биологии УНЦ РАН продемонстрировал способность при определенных условиях культивирования продуцировать ЭПС в существенных количествах. Культивирование велось в качалочных колбах в течение 5 суток на среде Федорова с содержанием мелассы 60 г/л. Наибольшие показатели вязкости (30 000 сСт) были получены при следующих условиях: температура – 35°C, аэрация – 160 об/мин. Выбор мелассы как источника углерода объясняется тем, что при культивировании на ней вязкость продукта значительно выше. Вероятно, причиной является то, что в мелассе содержатся так называемые факторы роста. Кроме того, она является отходом сахарного производства и обладает невысокой стоимостью. По завершении процесса культивирования полисахарид был осажден изопропиловым спиртом, количество изопропилового спирта для осаждения ЭПС составляло 70% от объема культуральной жидкости. После осаждения ЭПС сохранял свои реологические свойства. Также был проведен анализ содержания общих углеводов в исследуемом полисахариде штамма бактерий *Pseudomonas putida* ИБ-17. Доля общих углеводов в ЭПС составила 61,8% от массы сухого препарата. Таким образом, штамм бактерий *Pseudomonas putida* ИБ-17 может рассматриваться как потенциальный продуцент экзополисахарида с точки зрения промышленного применения.

Исследование микробных сообществ с помощью ГОА «МИР»

Черницына С.М., Шубенкова О.В. (Иркутск, sveta@lin.irk.ru)

Бесцветные серные бактерии рода *Thioploca* формируют в морских экосистемах высокую биомассу в районах с высокой продуктивностью, создавая своеобразный биологический фильтр, который препятствует поступлению сероводорода из донных осадков в водную толщу. Нити *Thioploca* имеют белую окраску и легко определяются визуально, благодаря своим крупным размерам (длина достигает 2 см). Эти бактерии также найдены в следующих пресноводных озерах: Констанц (Германия), Бива (Япония), Онтарио (Канада). Пресноводные бактерии по сравнению с морскими формами имеют более мелкие размеры индивидуальных нитей и общего чехла, для некоторых из них установлена способность накапливать внутри клеток нитраты. В Байкале этот род бактерий впервые обнаружен в 1991 году в районе бухта Фролиха (Северный Байкал) с помощью автоматических и обитаемых подводных аппаратов. При изучении низкотемпературного подводного источника на глубине 420-430 м исследователи увидели поля бактериальных матов. Позже было выяснено, что доминирующим организмом в этом сообществе является бесцветная серобактерия рода *Thioploca*. Начиная с 2003 г. и по настоящее время при отборе проб дночерпателем с борта корабля были обнаружены новые местообитания бесцветных серных бактерий: районы впадения рек Селенга и Баргузин, районы нефтепроявления мыс Горевой Утес и мыс Толстый. Попытки обнаружить бактериальные маты, подобные найденным в бухте Фролиха, были произведены с помощью ГОА «МИР-1» и «МИР-2». Погружения в районе мыса Горевой Утес были проведены в точке выхода нефти на поверхность озера. При осмотре дна бактериальные маты не были выявлены. Однако при разборе на борту судна проб придонной воды и бентосных организмов, отобранных с помощью засасывающего устройства slurp-gun, были обнаружены единичные нити *Thioploca*. Таким образом, было подтверждено наличие бесцветной серной бактерии рода *Thioploca*

в районе нефтепроявлений мыса Горевой Утес. Кроме того, единичные нити *Thioploca* были обнаружены в пробах, отобранных вблизи холодного сипа в ходе погружений у п. Большое Голоустное. Поровые воды осадков этого района характеризуются низкой минерализацией и отсутствием сульфат-иона, таким образом присутствие здесь бесцветных серных бактерий пока не находит объяснения. Требуются новые исследования для определения метаболизма *Thioploca* из различных районов озера. Работа поддержана программой 17 (проект 17.9) Президиума РАН, грантом РФФИ № 08-05-00709-а, Интеграционный проектом № 27. Авторы выражают глубокую признательность за организацию проведения глубоководных исследований с помощью ГОА «МИР» группе компаний «Метрополь», а также руководителю научной работы д.б.н. Т.И. Земской.

Поиск и тестирование реагентов микробного происхождения для нефтеотдачи

Чжан Данянь (Москва, zdn_bc@mail.ru)

В настоящее время нефть – это наиболее важный энергетический ресурс. Биотехнологии в области повышения нефтеизвлечения включают: (1) использование метаболитов микроорганизмов и (2) активизацию жизнедеятельности пластовой микробиоты. Перспективно применение в качестве биореагентов поверхностно-активных веществ (био-ПАВ) и экзополисахаридов (ЭПС). Актуален поиск продуцентов этих соединений с целью создания спектра реагентов и технологий для оптимизации процесса нефтедобычи на всех технологических стадиях и для разных месторождений нефти. Коммерческая ценность полисахаридов основана на их способности влиять на реологические свойства водных растворов вследствие изменения характера их текучести или гелеобразования, ПАВ – снижать поверхностное и межфазное натяжение растворов. Были выделены накопительные и чистые культуры бактерий из проб воды, отходов нефтепереработки, пластовой воды нефтяного месторождения и нефти. Для целенаправленного отбора ЭПС- и ПАВ-образующих штаммов учитывали процесс сукцессии в бактериальном сообществе, сопровождающийся выявлением специфических функций доминирующих на каждой стадии штаммов. ЭПС-синтезирующие штаммы отбирали по формированию слизистых колоний и высоковязких жидких культур. ПАВ-образующие штаммы тестировали после получения жидкой культуры. Выделение ЭПС проверяли по способности к образованию осадков после обработки культуры спиртом (ацетоном) и комплексов с цетавлоном. Исследование реологических свойств (вязкость и течение) ЭПС-культур проводили на ротационном вискозиметре Brookfield (Германия). Эмульгирующую активность анализировали следующим способом. К 4 мл гексадекана добавляли 4 мл исследуемой клеточной суспензии, затем смесь взбалтывали на миксере Vortex в течение 3-х мин. и через 24 ч измеряли объём образовавшейся эмульсии в процентах.

Поиск новых продуцентов β -циклодекстринглиуканотрансферазы

Шагина С.Е. (Москва, sshagina@yandex.ru)

В промышленно развитых странах наиболее интенсивные исследования в области изучения циклодекстринов (ЦД), ведущиеся в течение последних десятилетий, связаны с важным химическим свойством ЦД к образованию комплексов включения с различными веществами. В России в настоящее время рентабельное производство препаратов ЦД практически отсутствует из-за незавершенности и несовершенства разработанных технологий их производства. ЦД получают ферментативным путем из крахмала под действием циклодекстринглиуканотрансфераз (ЦГТ-аз) – специфических ферментов микробного происхождения. Поэтому поиск стабильных ЦГТ-продуктивных штаммов с заданной специфичностью является одной из первостепенных задач при разработке

новых технологий получения ЦД. В своём большинстве ЦГТ-активные микроорганизмы обитают в почве и выделяются довольно редко, при этом нормальный уровень внеклеточной β -ЦГТ-азной активности для таких изолятов составляет 2-2,5 ед./см³ культуральной жидкости (КЖ). В нашей работе объектами исследований служили образцы почв (из Московской, Владимирской, Волгоградской, Воронежской, Тамбовской, Тульской, Рязанской областей) и растительные объекты (трава, солома, зерна кукурузы и овса), из которых отбирали изоляты культур, способных к биосинтезу ЦГТ-азы. Скрининг микроорганизмов-продуцентов ЦГТ-аз проводился согласно схеме, разработанной сотрудниками Института биологии Уфимского научного центра РАН с введением некоторых модификаций. В схему скрининга ввели стадию предварительной термической обработки почвенных суспензий (80°C, 10 мин.) с целью освобождения от вегетативных форм и направленного отбора спорообразующих культур. В процессе работы из 30 почвенных и 20 растительных образцов было выделено 60 изолятов культур микроорганизмов, осуществляющих деструкцию крахмала. После глубинного культивирования для дальнейших исследований было отобрано 27 ЦГТ-активных штаммов, среди которых 8 культур обладали высокой внеклеточной ферментативной активностью β -ЦГТ-азы (4,6-6,7 ед./см³ КЖ). ВЭЖХ-анализ КЖ данных 8 штаммов подтвердил каталитическую активность преимущественно β -ЦГТ-аз. При этом штамм с наиболее высокой β -ЦГТ-азной активностью (6,7 ед./см³ КЖ) оказался максимально специфичен к синтезу β -ЦД: процентное содержание β -ЦД в реакционной смеси составило 79,13%, γ -ЦД – 20,83%, α -ЦД обнаружены не были. На основании изучения совокупности морфологических, культуральных, физиолого-биохимических и филогенетических характеристик исследуемой культуры новый штамм, продуцирующий β -ЦГТ-азу, идентифицировали как *Bacillus circulans*. Таким образом, используя направленный скрининг микроорганизмов-продуцентов ЦГТ-аз, провели отбор культур микроорганизмов с внеклеточной β -ЦГТ-азной активностью, превышающей средний уровень активности для диких изолятов в 2-3 раза. Среди них была отобрана бактериальная спорообразующая культура, обладающая высокой специфичностью как по β -, так и по γ -ЦГТ-азе, составляющей 79,13 и 20,83% соответственно.

Некоторые закономерности развития пробиотических микроорганизмов на молочной сыворотке

Шамсутдинова В.Р. (Москва, shamsutdinovav@mail.ru)

Для разработки технологии новых функциональных продуктов из молочной сыворотки с растительными компонентами, в частности, с овсяной мукой, исследовали характер развития пробиотических микроорганизмов в соответствующих сырьевых основах в процессе ферментации. Объектами исследования служили культуры бактерий-пробиотиков *Lactobacillus acidophilus* и дрожжей *Kluyveromyces marxianus* subsp. *marxianus* (в виде лиофильно-высушенных заквасок прямого внесения), используемые при производстве традиционных кисломолочных продуктов. Выбор дрожжей в качестве одного из объектов исследования был обусловлен тем, что их клетки, по свидетельствам разных авторов, обладают лакто- и бифидогенным эффектом, детоксицирующей активностью, а также радиопротекторными свойствами в отношении высших организмов, и, кроме того, в процессе ферментации пищевых субстратов обогащают их различными физиологически активными веществами. Численность данных микроорганизмов в ферментируемых ими сырьевых основах разного состава определяли методом чашечного посева. Для определения оптимального состава овсяно-сывороточной основы ферментированного продукта с ягодами, обогащенного биомассой дрожжей, опробовали несколько вариантов рецептур с разным содержанием овсяной муки и сухой кислой молочной сывороткой. Скваживание данных основ закваской кльйверомицетов в начальной дозировке, соответствующей 10⁵ КОЕ/г, проводили при

температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение суток. Обнаружили, что содержание дрожжей в овсяно-сывороточных основах в конце суточного сквашивания при 30° определяется составом ферментируемой основы – суммарным содержанием в ней сухих веществ и долей овсяной муки. Так, численность дрожжей в сыворотке с 6% сухих веществ без добавок достигала уровня 10^7 КОЕ/г, и введение в ее состав 6% овсяной муки не влияло на данный показатель. Однако дальнейшее повышение содержания овсяной муки до 8% (при суммарном содержании сухих веществ в основе, равном 14%) привело к повышению выхода дрожжевой биомассы на порядок – до уровня 10^8 КОЕ/г. В процессе ферментации активная кислотность основ изменялась незначительно. Титруемая кислотность до сквашивания определялась составом основы, а к концу достигала $80\text{--}90^\circ\text{T}$ во всех образцах независимо от их состава и своего исходного значения. При этом *in vitro* в условиях, соответствующих физиологическому оптимуму для лактобацилл (при температуре 38°C в питательной среде МРС), наблюдали стимулирующее влияние присутствия клейверомицетов на развитие культуры ацидофильной палочки-пробиотика при введении дрожжей как в жизнеспособной, так и в термически инактивированной форме. Живые дрожжи в большей степени стимулировали накопление биомассы лактобацилл, чем инактивированные; и на уровне тенденции прослеживалась пропорциональность между интенсивностью развития культуры лактобацилл и содержанием дрожжевых клеток. При этом дрожжи, внесенные в жизнеспособном состоянии, практически не изменяли своей численности. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингредиенты, используемые в производстве продуктов питания – мука и дрожжевая закваска, обладают выраженными свойствами пребиотиков, что может быть, в частности, обусловлено содержанием в них полисахаридов, являющихся обычными компонентами растительных и дрожжевых клеток.

Рост и биосинтез эндонуклеазы *Serratia marcescens* в условиях ингибирования биосинтеза пуринов

Шах Махмуд Р. (Казань, raihan.shah@gmail.com)

Внеклеточная эндонуклеаза (К.Ф.3.1.30.2) грамотрицательных бактерий *S. marcescens* (Sma nuc) является наиболее изученным ферментом в ряду бактериальных нуклеаз с широкой специфичностью. Несмотря на значительный прогресс в исследовании эндонуклеазы, сведений о механизмах регуляции биосинтеза данного фермента недостаточно. Известно, что секреция нуклеазы в окружающую среду обычно происходит в стационарной фазе роста бактерий. Биосинтез эндонуклеазы увеличивается при SOS – ответе клеток на повреждение ДНК и блокирование ее репликации. При ингибировании биосинтеза пуринов происходит угнетение роста бактерий и смещение пика активности внеклеточной эндонуклеазы из стационарной фазы в экспоненциальную. Кроме этого секреция эндонуклеазы в окружающую среду происходит сразу же в ответ на блокирование. Вместе с тем данных о биосинтезе эндонуклеазы в ответ на блокирование биосинтеза пуринов нет. Для исследования биосинтеза эндонуклеазы в ответ на блокирование биосинтеза пуринов мы анализировали динамику роста микробной популяции и секреции внутриклеточной (в периплазму) и внеклеточной (в культуральную жидкость) эндонуклеазы *S.marcescens* W1050 в присутствии и в отсутствие 0,1% 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола (2ПАБСТ). Показано, что в присутствии 0,1% 2ПАБСТ происходило подавление роста микробной популяции в целом. Продолжительность адаптационной и экспоненциальной фаз увеличивалась в 2-3 раза. Максимальное накопление внеклеточной эндонуклеазы наблюдали в конце экспоненциальной, а внутриклеточной – в конце стационарной фазы, что отличалось от динамики накопления фермента в отсутствие 2ПАБСТ, когда максимальное накопление внутри- и внеклеточной эндонуклеазы наблюдали в середине

стационарной фазы роста и развития микробной популяции. Отличительной особенностью биосинтеза эндонуклеазы в условиях блокирования пуринов служило повышение уровня внеклеточного фермента в адаптационной фазе, то есть вслед за добавлением 2ПАБСТ. Сравнительный анализ показал, что блокирование биосинтеза пуринов сочеталось с увеличением биосинтеза эндонуклеазы. За 36 часов роста и развития микробной популяции в присутствии 2ПАБСТ было синтезировано примерно в 1,6 раза больше эндонуклеазы, чем в отсутствие 2ПАБСТ. Соответственно возрастала и продуктивность культуры по эндонуклеазе, примерно 2,7 раза. Таким образом, показано, что в результате подавления биосинтеза пуринов с помощью 2-ПАБСТ происходит качественное и количественное изменение динамики роста и развития *S. marcescens* W1050, сопряженное с увеличением биосинтеза и продукции фермента, а также с перераспределением эндонуклеазы между периплазмой и культуральной средой. Автор выражает признательность научному руководителю, ведущему научному сотруднику, д.б.н. Филимоновой М.Н.

Новый штамм-продуцент γ -циклодекстринглюканотрансферазы

Шунарёва Д.Г. (Москва, DariaLaguna@rambler.ru)

Циклодекстрины (ЦД) нашли широкое применение в косметической, фармакологической и пищевой отраслях промышленности, а также в сельском хозяйстве. В пищевой промышленности благодаря использованию комплексов включений биологически активных веществ (БАВ) с ЦД удается улучшить потребительское качество продуктов: пищевую и биологическую ценность, органолептические показатели, а также стабилизировать пищевые эмульсии и пены. Гомологический ряд ЦД включает в себя α , β , и γ -ЦД, состоящие соответственно из 6, 7 и 8 остатков глюкозы в цикле. На кафедре «Биотехнология» МГУПП ранее были разработаны биотехнологии α и β -ЦД и комплексов включения с витаминами и ароматическими веществами на их основе. γ -ЦД отличается от α - и β -ЦД размерами внутримолекулярной полости. В связи с этим, они способны образовывать комплексы включения с более крупными молекулами. Объектами исследования для скрининга микроорганизмов-продуцентов γ -специфичных циклодекстринглюканотрансфераз (γ -ЦГТаз – фермента, катализирующего биосинтез γ -ЦД) являлись коллекционные культуры МГУПП и природные источники. В качестве коллекционных культур использовали: *Bacillus macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. insectus*. В качестве природных источников изолятов бактерий использовали образцы почв: Московской, Волгоградской, Воронежской, Тамбовской, Тульской областей, а также образцы почв, привезенные из республики Саха (Якутия), образцы соломы, травы и семена злаковых культур: кукурузы, овса и ячменя. В результате исследований был выделен штамм-продуцент γ -ЦГТ-азы *Bacillus* sp. 35н. Для культивирования в лабораторных условиях первоначально была выбрана питательная среда следующего состава (в %): растворимый крахмал – 1, пептон – 0,3, дрожжевой экстракт – 0,3, кукурузный экстракт – 0,3, CaCO₃ – 0,5. При исследовании динамики биосинтеза γ -ЦГТ-азы штаммом *Bacillus* sp. 35н на выбранной питательной среде было установлено, что максимум ферментативной активности культуры при температуре 30°C приходится на вторые сутки и составляет 17,3 ед/см³. В дальнейшем на основании выявленной зависимости биосинтеза γ -ЦГТ-азы штаммом *Bacillus* sp. 35н от природы источников углерода, азота и фосфора была проведена оптимизация состава питательной среды. Состав оптимизированной питательной среды (в %): нерастворимый крахмал – 1,0, KН₂РO₄ – 0,2, пептон – 0,3, дрожжевой экстракт – 0,5, декстрины – 1,0, СаСО₃ – 0,5, MgSO₄ – 0,01. Использование этой среды способствовало увеличению активности γ -ЦГТазы на 40%. Были подобраны оптимальные условия осаждения γ -ЦГТ-азы: соотношение объемов 96% этанола и

культуральной жидкости 3,5:1, рН 6,0 и температура 3°C. Высушенный при 40°C ферментный препарат имел активность γ -ЦГТ-азы 2020 ед/г.

Функции штаммов – компонентов углеводород-окисляющих ассоциаций бактерий
Шпакова М.А., Гордиенко О.О., Сребняк Е.А. (Москва, mshpakova@bk.ru)

Современные технологии, применяемые при ликвидации разливов нефти, несовершенны, т.к. не исключают опасности проникновения и накопления углеводородов нефти в пищевых цепях. Известно, что углеводороды являются одними из наиболее опасных, быстро распространяющихся и медленно разрушающихся соединений. Исследование процесса биодеструкции нефти актуально как в научном, так и в технологическом плане. Из микробиоты Балтийского моря были выделены ассоциации углеводородокисляющих бактерий. Входящие в их состав аэробные бактерии были идентифицированы как относящиеся к родам *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Cytophaga Micrococcus*, *Mycococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Spirillum*. Стояла задача определения последовательности и порядка биоразложения компонентов нефти и выделения доминирующих на каждой стадии аэробных бактерий. Выделение штаммов бактерий проводили, используя плотную минеральную среду Чапека с нефтью (малопарафинистая маловязкая лёгкая Западносибирская), фракциями нефти (керосин, дизель) или индивидуальными углеводородами (пента-, до- и гексадекан). Остаточные углеводороды выделяли экстракцией из культуры бактерий на разных стадиях окисления углеводородов и анализировали методами газовой и жидкостной хроматографии. Было установлено, что за 7 суток эффективность очистки морской воды от нефти в лабораторных условиях составила более 70 %. В процессе биодеструкции состав нефти претерпел существенные изменения. При этом все определяемые группы углеводородов нефти, а именно парафино-нафтеновые, моно-, би- и полициклические ароматические углеводороды, смолы и асфальтены, подвергались биодеструкции. Наибольшая степень биодеградации отмечена для полициклических ароматических углеводородов, смол и асфальтенов, в то время как в работах других исследователей сообщается, что степень биоразрушения обычно наиболее высока для алканов. В процессе исследования была обнаружена способность сменяющих друг друга в процессе сукцессии штаммов – компонентов природной ассоциации – к синтезу внеклеточных полисахаридов и/или ПАВ. Экзополисахариды, образуемые первичным консументом сообщества, характеризующимся гидрофобной клеточной стенкой, выполняют в ассоциации функции межклеточного матрикса, способствующего иммобилизации бактерий и обеспечивающего накопление и обмен метаболитами между различными штаммами. Био-ПАВ, выделяемые вторичным и третичным консументом, обладающим гидрофильной клеточной стенкой, осуществляют эмульгирование первично-окисленных углеводородов и дальнейшее их расщепление. Помимо экологических функций, синтезируемые исследованными бактериями нефтеокислителями экзополисахариды и ПАВ могут найти применение в технологиях нефтедобычи.

Isolation of yeasts from natural fermentation of olives from the south of Portugal
Akhmetova A.Zh.; Quintas C. (Astana, Kazakhstan, ainur_akhmetova_@mail.ru; Faro, Portugal; cquintas@ualg.pt)

One of the most popular ways of table olives preparing in the south of Portugal (Algarve) is the crushing them before the fermentation step. After harvesting and sorting olives are broken, washed, brined in salt solutions, and fermented at room temperature during traditional process which remains craft and empirical. The aims of this work were the characterization of traditional fermentation process of Manzanilla variety of *Olea europaea* fruits concerning the

microbiological and physicochemical evolution. The microbiological parameters studied were yeasts, lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae. The physicochemical parameters measured were pH, total acidity and reducing sugars. Another task of this work was isolation of yeasts and identification them by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method. Olives were fermented at room temperature with wild microbiota during 29 days in the laboratory of Microbiology of University of Algarve, Faro, Portugal. Yeasts were the main microorganisms responsible for the fermentation of the olives. The lactic acid bacteria were absent. The level of Enterobacteriaceae increased during the first two days with the following decrease probably due to the combined inhibitory effect of pH and brine concentration. From the 12th day of the fermentation until the end Enterobacteriaceae group of bacteria was not found. At the first day of fermentation pH values were 5.01 (fermentation A) and 5.02 (fermentation B). The pH values decreased slightly until reaching values of 4.43 for fermentation A and 4.25 for fermentation B on the day 29. Concentration of sugars increased in the first 2 days, probably due to the diffusing of sugars from the olives to the brine, and then decreased till the end of fermentation due to their consumption by the microorganisms during the fermentation process. 60 strains of yeasts were isolated throughout the fermentation, and were joined by morphological similarities into 14 strains. These 14 strains belong to 3 species which were identified by RFLP using PCR products. One group of isolates was not found in the database and additional experiments for characterization of them are ongoing. The rest of the isolates belong to the species *Rhodotorula glutinis* and *Candida vinaria*. This work was supported by Erasmus Mundus External Window Cooperation Lote-8 grant.

Isolation of lactic acid bacteria producing non-protein enteropathogen-lethal compounds

Kulmambetova G.N., Gollop N., Alikulov Z.A. (Astana, Kazakhstan, Gulmira_k@list; Bet-Dagan, Israel)

Bacteriocins (low molecular weight peptides) which manifest active and wide spectrum of anti-pathogen activities have been identified. Most of these substances have failed as food preservatives in practical applications. We propose to identify low molecular weight non-protein compounds produced by isolated bacterial strains which produce a wide spectrum of activity against pathogenic bacteria and especially associated with poultry. Recently it was found specific low molecular weight compound produced by lactic acid bacteria. These organisms are classified as Generally Recognized as Safe (GRAS) and therefore, could be quickly accepted by regulatory concerns to enable widespread application in processing plants. Multiple strains producing various compounds would be required to assure the undesired consequent development of resistant target bacteria. Centers of disease control indicate that approximately 76 million cases of food-borne illness occur in the United States annually. Consequence of these diseases are the resulting 5,000 deaths annually and the estimated \$9.2 billion in losses (Mead et al., 1999). This is being a big problem in Kazakhstan. Poultry and poultry products contribute an important part of this human health problem. The most frequently noted association is with *Salmonella* spp. and *Campylobacter jejuni* but there is also concern over transmission of enterohemorrhagic *E. coli*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*. These concerns over food safety have increasingly become a matter of public anxiety and concomitantly, have become a financial burden for poultry industry. These public pressures have brought to bear upon the FSIS, who responsibility to regulate matters of public food safety. In turn, FSIS has created the “Mega-Reg” which attempts to regulate allowable levels of *Salmonella* spp. on processed foods of animal origin. As benchmark, the regulation indicates that the poultry industry should have fewer than 20% of processed carcasses per lot contaminated with *Salmonella*. In response, the industry improved process control in the USA by increasing the amount of water applied per carcass, employing inside-outside carcass washers and, using counter flow chillers having make-up waters with <50 ppm chlorine or other antimicrobial substances. Even when a plant is within HACCP compliance, processors

are not consistently able to meet the specifications of the Mega-Reg. In part, this is due to the persistent and enormous contributions to contamination made during poultry production. Poultry are produced in farms throughout the United States with limited ability to control biosecurity. It is clear that pathogens may be transmitted from the surrounding environment into poultry flocks (Stern et al., 2001; Bailey et al., 2001). One of the more practical interventions was pioneered by Dr. Esko Nurmi of Finland. His contribution entailed the administration of fecal suspensions to newly hatched chicks to reduce the likelihood of *Salmonella* spp. colonization (competitive exclusion). Variations to this approach have been published and patented but, regulatory resistance to enable marketing of such products has prevented widespread distribution. Consequently, the research for practicable inventions continue, but have as of yet not been forthcoming. Between 10,000 and 20,000 isolates were tested in the laboratory using an analogue a disk diffusion assay with the spot of *Salmonella* or other pathogen placed on a lawn of the LAB. Once antagonistic bacteria are identified, peptidase enzyme was added to the zone of inhibition to demonstrate inhibition which was not bacteriocin induced in nature. This screening/testing provided the LAB the desired properties. Application of the compounds to known contaminated chicken carcasses in processing plants would be administered and microbial safety of the product would be assessed.