

ПОДСЕКЦИЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ»

Устные доклады

Микроорганизмы, выделенные из загрязненных радионуклидами подземных вод

Абдуллин Руслан Ринатович, Бабич Т.Л.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Россия, Москва,

rusfbm@gmail.com

Современная система обращения с радиоактивными отходами на ФГУП «ПО «Маяк» сложилась в 1950–1960-х гг. и предполагает сброс и хранение жидких среднеактивных и низкоактивных отходов в локализованных от открытой гидрографической сети промышленных водоемах В-9 (озеро-болото Карачай) и В-17 (Старое Болото). В результате многолетней эксплуатации водоемов В-9 и В-17 произошло крупномасштабное загрязнение подземных вод района путем инфильтрации радиоактивных растворов через проницаемые ложа водоемов. Микробиологические процессы в загрязненных радионуклидами подземных водах мало изучены, и их исследование представляется актуальной задачей. Возможными субстратами для микроорганизмов в подземных водах могут служить ацетат, оксалат, ЭДТА, нитраты, окисленные формы радионуклидов и других металлов (Fe^{3+}). В работе использовали современные микробиологические, молекулярно-биологические и радиохимические методы.

В исследованных пробах подземных вод обнаружено малочисленное, но метаболически разнообразное микробное сообщество, включающее культивируемые аэробные органотрофные ($10\text{--}10^5$ кл/мл) и анаэробные бродильные ($10\text{--}10^5$ кл/мл), железоредуцирующие ($0\text{--}10^3$ кл/мл), денитрифицирующие ($0\text{--}10^3$ кл/мл), сульфатредуцирующие (<10 кл/мл) и метанобразующие ($0\text{--}100$ кл/мл) прокариоты. Из подземных вод выделено 10 штаммов аэробных органотрофных бактерий, принадлежащих к родам *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Microbacterium* и *Salinibacterium*. Спектр радионуклидов, сорбируемых этими штаммами, существенно различался. Наибольшей сорбционной активностью обладала биомасса бактерий *Pantoea agglomerans* и *Citrobacter freundii*, которые в лабораторных условиях эффективно сорбировали $^{241}\text{Am(III)}$ (91.9–93.1%), $^{233}\text{U(VI)}$ (74.3–75.6%) и $^{238}\text{Pu(IV)}$ (67.0%) из разбавленных растворов. Отмечен низкий уровень сорбции $^{237}\text{Np(V)}$ исследуемыми бактериями (7.4–17.6%). Ряд ультрамелких фильтрующихся бактерий выделен в чистую культуру и определена их принадлежность к видам *Chryseobacterium haifense*, *Microbacterium oxydans* и *Salinibacterium amurskyense*. Исследуются физиологические характеристики этих бактерий, способствующие распространению в загрязненных радионуклидами подземных водах. Выделены штаммы, растущие на ацетате и комплексных соединениях (оксалате и ЭДТА), присутствующих в подземных водах. Результаты изучения микроорганизмов подземных вод, загрязненных радионуклидами, способствуют более глубокому пониманию роли микроорганизмов в миграции радионуклидов в этой новой техногенной экосистеме.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-92105).

Технология переработки органических отходов в электроэнергию

Быконя Евгения Николаевна

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии

Россия, Москва, evgeniya_bikonya@mail.ru

Создание новых технологий переработки органических отходов необходимо для устойчивого развития промышленности и сохранения окружающей среды. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является разработка технологии переработки отходов в микробном топливном элементе (МТЭ). МТЭ – это электрохимическое устройство, в

котором происходит преобразование химической энергии в электрическую, за счет метаболической активности микроорганизмов, осуществляющих восстановление нерастворимых минеральных соединений. Примерами таких соединений могут быть окисленные формы железа или марганца.

В нашей работе был проведен скрининг сообществ электрохимически активных микроорганизмов, способных восстанавливать соединения железа (Fe_2O_3 и $\text{Fe}(\text{OH})_3$). Было показано, что микробные сообщества формируют биопленки, в состав которых входят минеральные частицы. При этом центрами формирования таких биопленок были дефекты поверхности частиц. Менее эффективно происходило обрастание ровных поверхностей крупных кристаллических частиц оксидов железа, лишённых структурных дефектов.

Электрохимические характеристики отобранных сообществ тестировали в разработанных нами электрохимических ячейках. В качестве субстрата использовали 20% раствор послеспиртовой барды, отход спиртопроизводственного предприятия. Результаты эксперимента показали, что отобранные нами микроорганизмы были способны генерировать отрицательный окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) в анодной камере МТЭ в процессе гидролиза барды.

Состав одного из активных сообществ, выделенного из донного ила озера Тамбукан, был изучен методом денатурирующего градиентного геля электрофореза. Результаты анализа показали, что в состав сообщества входят виды, принадлежащие роду *Bacillus*. Также были идентифицированы виды близкие по нуклеотидному составу гена 16S рРНК к видам *Patulibacter americanus* и *Desulfovibrio africanus*. Присутствие представителя рода *Desulfovibrio* позволило предположить, что образование отрицательного потенциала на анодном электроде МТЭ частично обусловлено процессом сульфатредукции. Сероводород, продуцируемый сульфатредукторами, может быть окислен на анодном электроде МТЭ.

Отобранное сообщество культивировали в разработанном нами лабораторном прототипе МТЭ, максимальная мощность которого составила 400 мВт. Подключенные последовательно в электрическую цепь восемь МТЭ работали более шести месяцев. Максимальная мощность составила 4 мВт.

Для повышения эффективности работы МТЭ, необходимо более глубокое понимание процессов взаимодействия электрохимически активных микроорганизмов с анодным электродом. Так, для представителей рода *Geobacter* известно, что в природе перенос электрона от клетки к нерастворимому минеральному соединению осуществляется на 3-4 порядка эффективнее, чем к графитовому электроду в МТЭ. Поэтому необходимо дальнейшее исследование процессов восстановления минеральных соединений в природных биотопах.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, к.б.н. Абрамову С.М. Работа была выполнена в рамках ГК № 14.12413.1840 НК.

Стимуляция и ингибирование роста биопленок *Pseudomonas chlororaphis* 449 и штаммов *Chromobacterium violaceum* антибиотиками, роль в этих процессах полисахаридов внеклеточного матрикса

Ганнесен Андрей Владиславович, Мартьянов Сергей Владиславович

МГУ им. М.В. Ломоносова, ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Российская федерация, г. Москва, zxattogua@gmail.com, aegopodium102011@gmail.com

Описанная ранее стимуляция роста бактериальных биопленок антибиотиками-ингибиторами синтеза белка остается мало изученным процессом, однако представляет большой медицинский интерес в связи с возможными осложнениями при химиотерапии

хронических заболеваний, вызванных биопленками патогенных микроорганизмов. Это явление чрезвычайно важно также с точки зрения расшифровки механизмов регуляции процесса перехода микроорганизмов от планктонного к биопленочному способу существования. Данные литературы противоречивы: разные авторы сообщают как о стимуляции, так и об ингибировании роста биопленок антибиотиками в зависимости от использованных концентраций.

В представленной работе изучали действие широкого диапазона концентраций макролидного антибиотика азитромицина, на рост биопленок *Pseudomonas chlororaphis* 449, а также штамма дикого типа *Chromobacterium violaceum* и его мутанта CV026 (с нарушением синтеза матрикса) на поверхности тефлоновых блочков в жидкой среде LB. Результаты оценивали путем окрашивания и дальнейшего колориметрического определения количества биопленок с помощью бактериологического красителя кристаллического фиолетового, а также более специфичного красителя 1,9-диметилметиленового синего (образующего комплекс с кислыми полисахаридами матрикса). Установлено, что формирование биопленок *Ps. chlororaphis* 449 подавляется низкими (не влияющими на рост планктонной культуры) концентрациями антибиотика (0,005-0,03 мкг/мл), но стимулируется при использовании более высоких его концентраций (4-15 мкг/мл). У штамма дикого типа *C. violaceum* концентрация, вызывающая подавление роста планктонной культуры, но стимулирующая рост биопленки, находится в диапазоне 0,5-2 мкг/мл. Чувствительность роста биопленки мутанта *C. violaceum* к азитромицину и температурам, превышающим оптимальную (30⁰С), заметно выше, чем у штамма дикого типа.

Полученные данные говорят о том, что матрикс биопленок – это перспективная мишень для будущих антибактериальных препаратов. Для объяснения наблюдаемой парадоксальной зависимости роста биопленок *Ps. chlororaphis* 449 от концентрации азитромицина предложена модель, предполагающая, что при формировании полисахаридного каркаса матрикса имеет место сочетание двух процессов синтеза полисахаридов, один из которых высоко чувствителен к ингибиторному действию азитромицина, а для второго азитромицин выполняет функцию стрессового сигнала, вызывающего переход планктонной культуры в форму биопленок и стимулирующего синтез этого(их) полисахарида(ов). Полученные результаты необходимо учитывать при разработке рациональных методов химиотерапии бактериальных инфекций, а также способов биотехнологического использования микробных биопленок.

Исследование распределения и разнообразия архей в верхней части водной толщи Черного моря (до 210 м)

Косогова Наталья Михайловна, Меркель А.Ю., Канапацкий Т.А.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический
факультет, Москва, Россия, natalja-ksgva@bk.ru*

Черное море – крупнейший меромиктический водоем нашей планеты, обладающий уникальными гидрохимическими условиями для развития различных микробных сообществ, участвующих в процессах синтеза и трансформации органического и неорганического вещества. К настоящему времени многое известно об особенностях функционирования архейных сообществ в осадках, редокс- и глубоководной зонах водной толщи Черного моря. Целью же данного исследования стало изучение разнообразия и распределения архей в малоизученной аэробной части водной толщи черноморской экосистемы.

Пробы из характерных слоев водной толщи Черного моря (фотическая зона 10, 14, 50 м; холодный промежуточный слой (ХПС) - 90, 110 м; верхняя граница редокс-зоны 130 м; 150, 160

м - зона минимальной концентрации кислорода (<3 мкМ) и появления следов сероводорода; 190, 210 м - верхняя граница анаэробной зоны) были отобраны в августе 2013 года с борта НИС "Рифт". Измерение общей численности микроорганизмов проводили методом флуоресцентной микроскопии с универсальным ДНК-красителем 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ). Изучен профиль распределения микроорганизмов на глубинах от 0 м до 210 м, соответствующий ранее полученным данным. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) со специфическими зондами на бактерии и археи (*EUB338* и *ARCH915* соответственно) показала практически равное соотношение активных клеток архей и бактерий на всех исследуемых глубинах. Присутствие различных филогенетических и функциональных маркеров (на гены 16S рРНК и гены фермента метил-коэнзим М редуктазы) в образцах тотальной ДНК, выделенной из клеток микроорганизмов, детектировали с помощью ПЦР. В результате было показано наличие архей (праймеры *ARCH338* и *ARCH915*) на всех исследуемых глубинах. Интересно, что на глубине 14 м сильный архейный сигнал был получен только во фракции взвеси. Кроме того, в аэробной зоне на глубинах 14 и 90 м обнаружен сильный сигнал ПЦР продукта с праймерами *mls* и *mcrA-rev* на функциональный ген *mcrA*, кодирующий α -субъединицу ключевого фермента метаногенеза и анаэробного окисления метана – метил-коэнзим М редуктазы. Так как с праймерами *ANME-1-25(F)* и *ANME-1-1406(R)* на группу I метанотрофных архей ANME ПЦР сигнала получено не было, можно предполагать, что в аэробной зоне внутри частиц крупной взвеси формируются анаэробные условия и происходит процесс метаногенеза. Также удалось показать присутствие кренархей на всех исследуемых глубинах (праймеры *Cren 7F* и *Cren 518R*), где данные микроорганизмы в аэробных условиях, по-видимому, способствуют поддержанию низкой концентрации аммония, осуществляя первую стадию нитрификации до нитрита.

Выражаем особую благодарность научным руководителям д.б.н. Пименову Николаю Викторовичу и к.б.н. Брюханову Андрею Леонидовичу за предоставление возможности осуществить исследование по данной теме и неоценимую помощь в его проведении. Работа финансировалась за счет гранта РФФИ №13-04-00033А.

Метагеномный анализ микробных сообществ водной толщи глубоководного района Среднего Байкала

Курилкина Мария Ивановна

Лимнологический институт СО РАН, Россия, Иркутск, maria.kurilkina@gmail.com

Байкал – самое большое по глубине (1640 м) и объему (23500 км³) пресных вод озеро в мире. Применение метода высокопроизводительного секвенирования позволяет значительно расширить наши знания о биоразнообразии и структуре микробных сообществ, которые являются одним из ключевых компонентов экосистемы. Целью работы было проведение метагеномного анализа вертикального профиля бактериальных сообществ глубоководного района Среднего Байкала.

Пробы байкальской воды отбирали летом и осенью (52°53'46" с.ш., 107°31'53" в.д.) с глубин 0 м, 25 м, 700 м, 1465 м и 1515 м. Пиросеквенирование участка гена 16S рРНК проводили на GS FLX 454 Roche, затем данные анализировали с использованием программы Mothur v.1.22.0.

В результате для 8 образцов было выявлено 37403 последовательностей домена Bacteria, и 299 - домена Archea. На основе таксономии RDP последовательности были отнесены к 33 филумам и 193 родам. Использование кластерного расстояния 0.03 позволило получить 4604 OTU для всех образцов, однако количество OTU варьировало от 346 до 2055 на один образец, при этом только лишь 16 OTU были общими для всех проб воды. Богатство и разнообразие

видов оценивали с использованием индексов Чhao 1 и Шенона. По вертикали водной толщи наибольшее значение индексов богатства (4875; 3145) и разнообразия (6.61; 5.46) было в глубинных слоях (1465 м и 1515 м соответственно), чем в поверхностных (0 м, 25 м) и средних слоях (700 м). Большинство выявленных последовательностей принадлежало к филуму *Actinobacteria* (27,67%), доля которого была наибольшей в образцах с глубины 700м (43%) и уменьшалась к 1465м и 1515м (13-16,5%), и к филуму *Proteobacteria* (36,21%) количество последовательностей которого увеличивалось от поверхности (22%) до придонного слоя (50%). В поверхностном слое также преобладали филумы *Caldiserica*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, а глубинные слои были представлены главным образом филумами *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* и *Firmicutes*. Методом UPGMA при сравнении сходства и различия в составе сообществ показано, что на дендрограмме они формируют три кластера: глубоководных и средних слоев в летний период; глубоководных и поверхностных слоев; средних и поверхностных слоев в осенний период.

Таким образом, метод метагеномного анализа позволил выявить доминирующие и минорные компоненты экосистемы, дать достоверную статистическую оценку богатства и разнообразия бактериальных сообществ, провести сравнение структуры сообществ по вертикали водной толщи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного проекта № 137, Проекта VI 50.1.3.

Анаэробная сульфатредуцирующая бактерия *Desulfofrigus* sp., выделенная из поверхностных окисленных вод Черного моря

Налдина Елена Петровна, Корнеева В.А.

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва,
naldinaelena@rambler.ru*

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) представляют собой весьма интересную группу прокариот, традиционно относящихся к строго анаэробным микроорганизмам. Они широко распространены во многих анаэробных экосистемах и играют важнейшую роль в глобальном круговороте серы, осуществляя восстановление сульфатов (иногда также сульфитов, тиосульфатов и серы) до сероводорода. Доказано также существенное значение сульфатредукторов в процессах электрохимической биокоррозии металлоконструкций в морской воде.

В последнее время фиксируется все больше фактов, демонстрирующих существование многих СРБ в периодически аэрируемых биотопах, таких как циано-бактериальные маты, временно затопляемые почвы, илы сточных вод. Наличие таких адаптивных возможностей сульфатредукторы обязаны эффективным ферментативным системам защиты клетки от активных форм кислорода, к которым относят супероксиддисмутазу, супероксидредуктазы, каталазу и различные пероксидазы, в том числе и уникальные по своим молекулярно-биохимическим свойствам.

Нашей исследовательской группой из поверхностных окисленных вод Чёрного моря (глубина – 30 м, концентрация O₂ – 300 мкМ) впервые была выделена сульфатредуцирующая бактерия, которая по результатам анализа фрагмента гена 16S рРНК отнесена к роду *Desulfofrigus*. При этом наиболее филогенетически близким видом является *Desulfofrigus fragile*, выделенный из арктических морских осадков в районе Свальбарда (Норвегия). Но черноморский *Desulfofrigus* sp. значительно отличается от типового штамма *D. fragile* LSv21 по физиологическим характеристикам и, по всей видимости, представляет собой новый вид. Было

показано, что температурный оптимум роста культуры лежит в пределах 18-23°C, оптимальный для роста рН равен 7,2. В качестве доноров электронов выделенный нами *Desulfofrigus* sp. может использовать довольно широкий спектр органических соединений (сукцинат, пируват, лактат, пропанол, этанол, глицерол, сорбитол и некоторые аминокислоты), а в качестве акцепторов электронов могут быть использованы сульфат, сульфит, тиосульфат и сера.

Радиоизотопным и колориметрическим методами установлено, что при внесении в среду 300-500 мкМ O₂ скорость образования сероводорода культурой *Desulfofrigus* sp. практически не отличалась от анаэробных условий, а дальнейшее увеличение содержания O₂ в среде приводило к резкому замедлению процесса сульфатредукции. Рост культуры, определяемый путем прямого подсчета клеток на эпифлуоресцентном микроскопе, также практически не снижался при однократных кислородных стрессах (до 500 мкМ O₂), но останавливался при продолжительных стрессах. С помощью ПЦР и последующего секвенирования продуктов амплификации показано наличие в геноме *Desulfofrigus* sp. генов следующих ферментов антиокислительной защиты: супероксиддисмутазы (*sod*), десульфоферредоксина (*dfx*), рубреритрина (*rbr*), бактериоферритина (*bfr*), рубредоксин-кислород оксидоредуктазы (*roo*), цитохром *c* оксидазы (*cox*), цитохром *bd* убихинооксидазы (*bdox*). Также наблюдалось возрастание активностей СОД и каталазы в условиях различных O₂-стрессов, что, вероятно, тоже обуславливает относительную аэротолерантность выделенного нами штамма.

Авторы выражают большую благодарность своим научным руководителям – д.б.н. Пименову Н.В. и к.б.н. Брюханову А.Л. Работа была выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 10-04-00220_a и 12-04-91052- НЦНИ_a.

**Супероксиддисмутазная активность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* разного уровня
антимикробной активности**
Напалкова Мария Вячеславовна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва,
mariyanapalkova@yandex.ru

Еще в конце позапрошлого века И.И. Мечников высказал мнение, что продолжительность жизни у людей разного этнического происхождения зависит от уровня потребления молочнокислых продуктов. Основой многих молочнокислых продуктов являются различные штаммы бактерии *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, которые также встречаются в микробиоте желудочно-кишечного тракта, благотворно влияя на макроорганизм. Анализ систем детоксикации активных форм кислорода и свободных радикалов является важным критерием при создании пробиотического продукта. Имеются незначительные и противоречивые данные о наличии у лактококков антиоксидантной активности, обусловленной наличием супероксиддисмутазы (СОД). Поиск лактококков с высокой супероксиддисмутазной активностью (СОД) является актуальной проблемой.

В работе использовали штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* разного происхождения: выделенные из национальных лечебно-профилактических молочнокислых продуктов, свежего молока, а также полученные с помощью метода слияния протопластов, которые отличаются спектром антимикробного действия на разные группы микроорганизмов, включая патогенные формы. Активность СОД измеряли в лизате клеток по методу McCord и Fridovich.

Было установлено, что самой высокой СОД активностью, в 4; 6; 12 раз превышающей активность природных штаммов 1605, 194, МГУ, обладал рекомбинантный штамм F-116, полученный слиянием протопластов. Наряду с высокой СОД активностью штамм F-116 был эффективен против широкого спектра патогенных микробов, включая дрожжи и микромицеты,

что является актуальным, поскольку микромицеты являются причиной многих заболеваний важных систем человека и порчи продуктов питания при их хранении. Использование таких штаммов молочнокислых бактерий с высокой антиоксидантной и антибиотической активностью позволит потребителям увеличить круг полезных продуктов питания, а также преумножить количество антиоксидантных средств в борьбе с тяжелыми заболеваниями и ранними признаками старения.

Генетический анализ кластеров конверсии хлорфеноксиуксусных кислот протеобактерий родов *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Raoultella*

**¹Сагитова Алина Иршатовна,^{1,3} Жарикова Н.В.,¹ Ясаков Т.Р.,² Стариков С.Н.,
^мСтарикова З.М.,² Гафаров Р.Ф.,^{1,3} Коробов В.В.**

¹Институт биологии УНЦ РАН; ²Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы; ³Учебно-научный центр БГПУ им. М. Акмуллы и ИБ УНЦ РАН, Россия, Уфа, a_sagitova@mail.ru

В настоящее время все большее внимание привлекает изучение геномов микроорганизмов, способных вовлекать в обмен веществ галогенсодержащие производные ароматического ряда.

Выявление генетических детерминант конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т, нашедших широкое применение в качестве пестицидов, может быть проведено с помощью ПЦР-анализа генов, контролирующих начальные стадии метаболизма молекул хлорфеноксиуксусных кислот, таких как гены *tftA* и *cadA*.

Huong N.L. и соавторы установили, что ген *tftA*, входящий в кластер *tftAB* штамма *Burkholderia* sp. M38 VN3-2W, кодирует 2,4,5-Т-оксигеназу, которая катализирует первую реакцию метаболизма 2,4,5-Т, приводящую к образованию 2,4,5-трихлорфенола. В работах Kitagawa W. и соавторов показано, что ген *cadA* штамма *Bradyrhizobium* sp. HW13 кодирует стадию деградации 2,4-Д с накоплением 4-хлорфенола в качестве промежуточного продукта.

Цель настоящей работы – выявление генов *tftA* и *cadA* в геномах природных штаммов бактерий родов *Pantoea*, *Pseudomonas* и *Raoultella*.

Объектами исследований служили представители гамма-подкласса протеобактерий *Pantoea agglomerans* 36P, *Pseudomonas fluorescens* 33P и *Raoultella planticola* 36D, выделенные из смешанных популяций почвенных микроорганизмов промзоны г. Уфы.

Препараты геномной ДНК из клеток микроорганизмов выделяли методом лизиса нагреванием до 95°C и далее их применяли в качестве матриц. Скрининг генов-мишеней проводили методом ПЦР с модифицированными праймерами, разработанными для анализа консервативных регионов *tftA* (*tftA*-f - ACATTCGA(C/T)GG(A/G)AA(C/T)TGGAA, *tftA*-r - AGGATTGAAGAAATCCTGATA) и *cadA* (*cadA*-f – AAGCTGCA(A/G)TTTGA(A/G)AA(C/T)GG, *cadA*-r GAGGCAATGCGACACCATCTC) генов. В качестве контроля использовались образцы ДНК штаммов *Burkholderia* sp. M38 VN3-2W и *Bradyrhizobium* sp. HW13.

Результаты ПЦР-анализа препаратов ДНК выявили присутствие генов *tftA* в геномах *P. agglomerans* 36P и *Ps. fluorescens* 33P. В то же время установлено отсутствие гена *tftA* в геноме *R. planticola*.

ПЦР-анализ не выявил наличия генов *cadA* в геномах штаммов *P. agglomerans* 36P и *Ps. fluorescens* 33P, однако в ходе анализа ген *cadA* был обнаружен у *R. planticola* 36D.

Полученные данные указывают на то, что геномы изученных штаммов обладают генетическими детерминантами контроля конверсии хлорфеноксиуксусных кислот, а именно: *P. agglomerans* и *Ps. fluorescens* 33P генами катаболизма 2,4,5-Т, *R. planticola* 36D – 2,4-Д.

Результаты работ могут быть использованы в разработках микробиологических методов очистки окружающей среды от ксенобиотиков.

Работа выполнена при содействии гранта программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» на базе Учебно-научного центра БГПУ им. М.Акмиллы и ИБ УНЦ РАН под руководством д.б.н., проф. Маркушевой Т.В. и к.б.н. Журенко Е.Ю.

Изучение фотообеззараживающего действия сенсibilизаторов в отношении штаммов санитарно-показательных микроорганизмов в зависимости от органического загрязнения воды

Снегирев Дмитрий Владимирович, Карепина Т.А.

*РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, Факультет почвоведения, агрохимии и экологии,
Россия, Москва, antiminc@mail.ru*

Механизм бактерицидного действия фотосенсibilизаторов основан на генерации синглетного и других активных форм кислорода, что происходит под воздействием солнечного света в обогащенной растворенным кислородом воде.

Целью работы является изучение фотообеззараживающего действия сенсibilизаторов в отношении штаммов санитарно-показательных микроорганизмов в зависимости от органического загрязнения воды. Задача заключалась в сравнительной оценке эффективности бактерицидного действия сенсibilизаторов: октакис {N-(2 гидроксietил)-N, N - диметиламмонийметил} фталоцианин цинка октахлорид ($ZnPeChol_8$), профлавина ацетата и метиленового голубого в отношении штамма санитарно-показательного микроорганизма *E.coli* в зависимости от органического загрязнения воды.

Объектом обеззараживания явился штамм музейной культуры *Escherichia coli* 1257. Кишечные палочки (*Escherichia coli*) являются классическими индикаторными микроорганизмами при оценке фекального загрязнения воды различного вида водопользования. Кишечные палочки являются нормальным обитателем толстого кишечника. Микроорганизмы определяли методом прямого посева и мембранной фильтрации на дифференциальные питательные среды в соответствии с видовой принадлежностью.

Выявлена закономерность влияния органического загрязнения воды на эффективность фотообеззараживания в отношении *E.coli* в присутствии профлавина ацетата и метиленового голубого при концентрации 0,5 мг/л. Установлено, что наибольшая эффективность действия этих сенсibilизаторов на кишечную палочку (99,99 – 100%) наблюдалась при высоком уровне органического загрязнения (перманганатная окисляемость 22,0 мг/л), при существенно меньшей эффективности обеззараживания при более низких уровнях (2,56 и 6,56 мгО₂/л) органического загрязнения.

Наибольшая эффективность инактивации в отношении *E.coli* (100%) установлена при действии сенсibilизатора фталоцианин цинка в концентрации 0,15 и 0,5 мг/л при времени освечивания 30 минут. Выявлена действующая концентрация 1 мл/л сенсibilизаторов профлавина ацетата и метиленового голубого в процессе фотообеззараживания.

Психрофильные углеводородокисляющие микроорганизмы для очистки Арктического региона от нефти

Федоренко Виктория Николаевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, Россия,
Москва, kusenochka@mail.ru*

Нефть является одним из основных источников энергии на протяжении нескольких десятилетий, при этом объемы ее добычи с каждым годом продолжают увеличиваться. Не так давно на Арктическом шельфе были обнаружены крупные запасы углеводородов, полномасштабное освоение которых уже началось. Вместе с тем неизбежные утечки и разливы нефти при ее добыче и транспортировке ставят уникальную природу северных широт под угрозу. В связи с этим необходимы эффективные и экологически безопасные методы утилизации нефтяных загрязнений в условиях низких температур. Целью данной работы является разработка биопрепарата на основе психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов (УВОМ) с дальнейшим его применением в условиях Арктики.

Отбор образцов нефтезагрязненной морской воды, грунта, а также растительной биомассы для выделения активных микроорганизмов-деструкторов углеводородов проводили в зоне литорали Белого и Баренцева морей. Для получения накопительных культур использовали модифицированную среду Таусона с добавлением 1% (объемн.) товарной нефти Усинского–Возейского месторождения. Культивирование микроорганизмов проводили в круглодонных колбах на шейкере с системой контроля температур Innova 43 (New Brunswick Scientific), имитирующем условия приливно-отливной зоны, при температуре 4°C. Для определения общей микробной численности и выделения чистых культур использовали среду РСА с минеральным фоном, применяя метод предельных разведений. После получения отдельных колоний поверхность агаризованной среды с микробной биомассой накрывали бумажным фильтром, пропитанным смесью нефти и дизельного топлива в соотношении 1:1, с целью селекции УВОМ по признаку просветления зоны вокруг колонии. Морфологию наиболее активных УВОМ исследовали с использованием фазово-контрастного микроскопа.

Было обнаружено, что все накопительные культуры способны к росту в психрофильных условиях. Некоторые из них активно снижали рН среды до значений 4,0-4,5 с изменением свойств нефти и образованием мицеллярных структур при взбалтывании содержимого колбы, что может предполагать наличие биоэмульгирующей активности у отдельных представителей микробного сообщества. Общая численность микроорганизмов при высеве из разведений на чашки Петри достигала до 10^6 - 10^7 КОЕ/мл. Были выделены 6 чистых культур. Микроскопирование показало, что они представлены подвижными и неподвижными палочками средних размеров, а также дрожжами. После накрывания колоний микроорганизмов фильтрами, пропитанными смесью нефти и дизельного топлива, клетки проявили высокую устойчивость к возможному токсическому воздействию углеводородов, что проявлялось в дальнейшем наращивании биомассы и просветлении фильтров. Последний факт может свидетельствовать о наличии не только высокоэффективной УВО ферментной системы, но и синтезе внеклеточных ПАВ, ускоряющих микробную деградацию нефтяных углеводородов.

На следующем этапе исследований планируется проведение количественной оценки деструкции нефти при низких температурах, а также определение биоэмульгирующей активности микроорганизмов с последующей их селекцией для разработки биопрепарата нового поколения, применяемого в условиях Арктики.

Сравнительная геномика штаммов *Bifidobacterium longum*, колонизирующих кишечник человека

Чаплин Андрей Викторович

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, кафедра микробиологии и вирусологии, Москва, Россия, okolomedik@gmail.com

Вид *Bifidobacterium longum* (Рейтер, 1963) является численно доминирующим среди бифидобактерий в микрофлоре кишечника человека, многочисленными исследованиями показаны его иммуномодулирующие свойства и важный вклад в формирование колонизационной резистентности. Вследствие внутривидовой неоднородности (наличия среди штаммов, колонизирующих кишечник человека, трудноразличимых подвидов *longum* и *infantis*) и высокой штаммоспецифичности пробиотических свойств важным является изучение внутривидового разнообразия *B. longum*, в том числе и на геномном уровне.

В рамках данной работы было осуществлено высокопроизводительное секвенирование геномной ДНК 11 штаммов *B. longum*, выделенных из кишечной микрофлоры здоровых детей, также для сравнительного анализа использовано 14 геномных последовательностей представителей данного вида из базы данных Genbank. Для всех последовательностей была проведена аннотация с помощью платформы RAST, полногеномное выравнивание с помощью программы Mauve, построение филогенетических деревьев по набору housekeeping-генов с использованием алгоритмов neighbor-joining и ClonalFrame, а также по тотальному набору генов с использованием Dollo Parsimony, поиск ортологов с помощью OrthoMCL, выявление гликозил-гидролаз приложением CAZymes Analysis Toolkit.

Размер генома анализируемых штаммов *B. longum* находился в пределах от 2,23 до 2,83 миллионов пар оснований, среднее значение – 2,43 миллиона. При полногеномном выравнивании выявлена высокая степень синтении, однако присутствовало большое количество инсерций/делеций. На основании геномных последовательностей и последовательностей гена 16s рРНК 22 штамма были кластеризованы в подвид *longum*, 4 штамма – в подвид *infantis*. Реконструкции филогении по последовательностям генов и тотальному набору генов последовательностям показали, что подвид *longum* образует монофилетическую группу, а подвид *infantis* является парафилетическим таксоном, предковым по отношению к подвиду *longum*. Вклад изменений в последовательности housekeeping-генов, вносимых горизонтальным переносом генов, был сопоставим с вкладом точечных мутаций. Пан-геном подвида *B. longum* является открытым, его размер составил 4145 генов, в геномной последовательности каждого отдельного штамма содержится $2023,4 \pm 126,8$ генов. Анализ главных компонент данных по наличию гликозил-гидролаз различных семейств показал достоверное разделение подвидов ($p = 2,7 \cdot 10^{-4}$).

Полученные данные говорят о высоком уровне генетической и метаболической изменчивости *B. longum* и значительном вкладе горизонтального переноса генов в её формирование.

Влияние различных факторов на подвижность бактерий *Providencia stuartii*

Шляпкикова Екатерина Вячеславовна, Курмашева Н.Р.

ФГАУВПО КФУ, Россия, Казань, izzi_ui@mail.ru

Одной из важнейших проблем современной клинической микробиологии является поиск новых методов борьбы и профилактики внутрибольничных инфекций. Повсеместно наблюдается рост оппортунистических инфекций, вызванных различными видами энтеробактерий. Одними из таких возбудителей являются бактерии рода *Providencia*, способные вызвать инфекции различной локализации. Бактерии рода *Providencia* обладают

различными факторами вирулентности, такими как адгезины, уреазы, способность инвазировать эукариотические клетки, подвижность и др.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния различных факторов на подвижность штамма *Providencia stuartii* MRSN 2154. Способность к роению (swarming) исследовали, используя LA с разной плотностью (0,4-1,0% агара), а подвижность в жидкой среде (swimming) – на 0,25% агаре. Исследовали влияние на разные типы подвижности температуры (30° и 37°C), казаминовых кислот и глюкозы. Казаминовые кислоты добавляли в конечной концентрации 0,5%, а глюкозу – 1%. Известно, что концентрация железа в среде может регулировать экспрессию различных факторов вирулентности. Исследовали подвижность в присутствии бипиридила, связывающего свободное железо. Бипиридил вносили в среду в конечной концентрации 1мкМ/мл. Скорость движения бактерий оценивали по диаметру колонии.

Показано, что при росте на питательной среде с 1% агаром диаметр колонии через 24 часа культивирования не превышает 3 мм. На среде LA с 0,8% агаром колония через 24 часа роста достигает 20 мм в диаметре, что говорит о слабой способности к роению бактерий на плотных средах. Оптимальной для роения оказалась плотность среды 0,5-0,6% агара. В данных условиях диаметр колонии через сутки достигает 83 мм. Казаминовые кислоты и глюкоза ингибируют способность бактерий к роению на среде с 0,5-0,8% агара, также как и недостаток железа в среде. Показано, что для *P. stuartii* характерно изменение морфологии клеток в роющейся колонии. На краю колонии обнаружены длинные бактерии, превышающие в 5-10 раз длину вегетативных клеток. На 0,25% агаре бактерии движутся по типу плавания с помощью жгутиков. Показано, что при 37°C подвижность бактерий выше на 43%.

Таким образом, подвижность бактерий *P. stuartii* MRSN 2154 (роение и плавающая подвижность) ингибируется по типу углеродной катаболитной репрессии, казаминовыми кислотами и зависит от концентрации железа в среде. Оптимальной температурой для подвижности является 37°C. Для бактерий *P. stuartii* характерна клеточная дифференциация при роении по типу швермерных клеток *Proteus mirabilis*.

Работа поддержана грантом РФФИ-рег № 13-04-97130.

Ежесуточная волнообразная динамика численности и активности азотфиксаторов как метод выявления различий в трансформации азота в почвах

Эмер Наталья Рудольфовна

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва,
emer2005s@gmail.com*

Известно, что существование и развитие микробного сообщества (МС) почвы имеет волнообразную динамику в силу роста и отмирания его компонентов.

Целью работы было проведение сравнительного анализа динамики численности и активности азотфиксаторов почв одного типа (серая лесная), но с различной историей предобработки: залежь – контроль, интенсивно эксплуатируемое поле – опыт.

Динамику численности азотфиксаторов оценивали ежедневным (33 дня) учетом колониеобразующих единиц (КОЕ) на безазотистой среде, актуальную и потенциальную динамику активности азотфиксации и дыхания – газохроматографически.

Выявлен волнообразный характер динамики КОЕ в контрольных и опытных образцах почв. Активность азотфиксации также имела волнообразную динамику, но значимые величины обнаружены только в опытных образцах и в виде потенциальной активности, при равной интенсивности дыхания контрольной и опытной почв.

Колебательные динамики КОЕ залежи и поля совпадают, отличаясь только количеством КОЕ. В среднем численность КОЕ в почве поля в 4,12 раза превышала численность КОЕ в почве залежи, и в динамике поля наблюдается более выраженный тренд в снижении численности КОЕ от начала эксперимента к завершению. Значения потенциальной активности азотфиксации в пахотной почве колебались от 0,037 до 0,785 (мкгС₂Н₄/г·час) и, таким образом, превышали значения актуальной активности азотфиксации от 5 до 110 раз. В почве залежи актуальная и потенциальная активность азотфиксации практически не детектировалась. Гармонический анализ выявил значимые различия в характеристиках (амплитуда, частота, период колебаний гармоник) ежесуточной динамики численности и активности азотфиксаторов.

Так как азотфиксирующая активность в залежи практически не детектировалась, а по статусу «здоровья» почва залежи принадлежит к «здоровым» почвам, то можно допустить, что отсутствие заметной азотфиксирующей активности (как актуальной, так и потенциальной) является, скорее, нормой для «здоровой почвы», при этом МС азотфиксаторов «менее здоровой» почвы при обеспечении экстра-субстратом будет реагировать фиксацией атмосферного азота.

Регуляторная роль оксида азота (NO) у лактобацилл

Яруллина Дина Рашидовна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия, kasfes@gmail.com

Исследования последних лет расширили функции NO от свойств потенциально токсичного свободнорадикального соединения до универсального фактора регуляции физиологических систем и экспрессии генов. Сигнальная молекула NO играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах как в организмах человека и животных, так и у прокариот. Взаимодействуя с факторами транскрипции, NO может активировать экспрессию генов важнейших систем репарации ДНК бактерий (SoxRS, SOS, OxyR и Ada), тем самым участвуя в трансдукции генетического сигнала резистентности к различным стрессорам, а у обладающих NO-синтазной активностью бактерий *Bacillus subtilis* и *B. anthracis* с оксидом азота связывают механизмы устойчивости к окислительному стрессу.

В настоящей работе исследованы эффекты ряда стрессоров физической и химической природы на синтез NO пробиотическими бактериями *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Для регистрации бактериального NO использовали флуоресцентный индикатор оксида азота 1,2-диаминоантрахинон сульфат (DAA) (Molecular Probes) и флуоресцентную микроскопию. О жизнеспособности лактобацилл судили по данным дифференциального окрашивания LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). В работе также оценивали эффекты экзогенного оксида азота, выделяющегося из нитропруссид натрия, и эндогенного NO, синтезируемого лактобациллами, на образование ими биопленок.

Установлено, что увеличение биосинтеза оксида азота (NO) в клетках *L. plantarum* 8P-A3 происходит при сильном стрессорном воздействии, сопровождающимся значительным снижением жизнеспособности микробных клеток: нагревании при 70°C и 80°C, продолжительном культивировании, токсическом действии гексилрезорцина. Факторы, не вызывающие гибель клеток, такие, как нагревание при 60°C, гомосеринлактон в концентрации 50 мкг/мл и экзогенная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P в концентрации до 300 мкг/мл, не индуцируют синтез NO. Выявленные взаимосвязи между силой стрессорного влияния и уровнем биосинтеза NO указывают на функциональное значение данного агента в стресс-ответе бактерий. Впервые обнаруженное регуляторное действие NO на формирование биопленок у

лактобацилл заключается в том, что микромолярные концентрации экзогенного NO негативно влияют на этот процесс вследствие токсического действия на клетки. Однако, снижение уровня эндогенного NO в бактериях под действием скавенджера оксида азота 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксида (сРГЮ) ухудшает характеристики образующихся биопленок, что выражается в уменьшении их размера.

Результаты данной работы находятся в русле современной концепции, рассматривающей NO как ключевое звено стресс-реакции организмов различного уровня организации, а также первой демонстрацией участия оксида азота в регуляции образования биопленок у лактобацилл.

Стендовые доклады

Выделение углеводородокисляющих культур микроорганизмов из отходов полигона-накопителя месторождения «Жанажол» Актюбинской области

Баимбетова Акбота Меирамханкызы, Кайырманова Г.К.

*Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г.Алматы,
akbota_bm@mail.ru*

В зависимости от увеличения загрязнения почв и водоемов нефтью и нефтепродуктами разработка эффективных методов их очистки очень актуальна. При эксплуатации нефтяных месторождений образуются отходы, основную массу которых составляют нефтяные шламы, буровые растворы и замазученный грунт.

В настоящее время экологически безопасным методом восстановления нефтезагрязненной природной среды является биоремедиация – очистка загрязненных территорий посредством стимуляции деятельности биоты в почвах и водоемах. Это может быть биостимуляция природных микроорганизмов путем внесения удобрений непосредственно в загрязненную экосистему, или использование накопленных в лаборатории микроорганизмов из загрязненного экотопа, или применение специализированных препаратов микроорганизмов, созданных для очистки загрязненных экосистем.

Литература по замазученному грунту затрагивает, как правило, микробиологические аспекты биоремедиации, но не собственно замазученного грунта как концентрированного комплекса специфических загрязнений. Вместе с тем, создание биотехнологии, направленной на детоксикацию и утилизацию замазученного грунта, предполагает исследование микробиологического статуса этой антропогенной экосистемы, что и определило цель данной работы.

Для выделения нефтеокисляющих накопительных культур микроорганизмов использовались твердые фракции полигона накопителя отходов нефтедобычи месторождения «Жанажол», расположенного в Актюбинской области: замазученный грунт (ЗГ) и буровой шлам (БШ), отобранные на 4 действующих картах полигона-накопителя (июнь, 2012 г.). В качестве контроля исследовали почву поселка Вахта, расположенного в 5 км от полигона.

Накопительные углеводородокисляющие культуры были получены на минимальной синтетической среде Е-8, где в качестве элективного фактора и единственного источника углерода в среде являлась сырая нефть в концентрации 80%. Инкубацию проводили в течение 30 суток при 29°С при перемешивании на качалке (220 об/мин). При полном исчезновении нефтяного слоя, изменении окраски среды, появлении осадка производили последовательные пересевы из среды накопления на синтетическую агаризованную среду Е-8 с нефтью, откуда затем выделяли чистые микроорганизмы – нефтедеструкторы.

Из пробы замазученного грунта и бурового шлама получены нефтеокисляющие накопительные культуры БШС-2, ЗГ-4, БШН-4, БШН(ц). Из этих накопительных культур

выделены 9 нефтеокисляющих бактериологически чистых культур микроорганизмов и обозначены нами БШС-1, БШС-2, ЗГ-1, ЗГ-2, БШН-1, БШН-2, БШН-3, БШН-4, БШН(ц)-1. На основании результатов морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков, выделенные культуры бактерий идентифицированы нами как представители родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, а именно: культуры *БШС-1*, *БШС-2*, *БШН-2*, *ЗГ-1*, *ЗГ-2*, *БШН(ц)-1*, отнесены к роду *Pseudomonas*, культуры *БШН-1*, *БШН-3*, *БШН-4* отнесены к роду *Bacillus*.

Таким образом, нами выявлены 9 бактериологически чистых культур-нефтедеструкторов, которые могут быть использованы как микроорганизмы-кандидаты для ассоциации-деструктора отходов нефтедобычи полигона-накопителя «Жанажол» Актюбинской области.

Влияние физико-химических свойств поверхности клеток на аутоагрегацию и образование биопленок у лактобацилл

Бруслик Наталия Леонидовна, Коннова Светлана Анатольевна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, Казань, nbruslik@yandex.ru

Частой причиной неэффективности пробиотиков является быстрая элиминация клеток микроорганизмов из кишечника. Длительность их пребывания в желудочно-кишечном тракте определяется физико-химическими свойствами бактериальной поверхности (гидрофобность, основность, заряд), а также способностью к аутоагрегации и формированию биопленок. Поскольку при аутоагрегации и формировании биопленок происходят поверхностные взаимодействия, физико-химические параметры клеточной поверхности микроорганизмов могут оказывать влияние на данные процессы, однако его степень остается не выясненной. Возможное влияние аутоагрегации бактериальных клеток на интенсивность образования биопленок также требует подтверждения.

Целью работы является анализ влияния физико-химических свойств поверхности лактобацилл на их способность к аутоагрегации и формированию биопленок, а также роли аутоагрегации лактобацилл в формировании биопленок.

В работе использовали 19 штаммов лактобацилл, полученных из кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов. Гидрофобность бактериальной поверхности определяли по степени адгезии на неполярном углеводороде *n*-гексадекане, электрон-донорные (основные) свойства оценивали по адгезии на монополярном кислот углеводороде хлороформе. Заряд поверхности клеток измеряли методом микроэлектрофореза. Способность клеток к аутоагрегации оценивали по их седиментации в течение 5 часов. Образование биопленок исследовали в 96-ти луночных пластиковых планшетах с окрашиванием полученных биопленок генцианвиолетом.

Показано, что способность лактобацилл к аутоагрегации имела слабую отрицательную корреляцию ($r = -0,13$; $p > 0,05$) с гидрофобностью их поверхности, а также отрицательную корреляцию средней степени с их электрон-донорными свойствами ($r = -0,54$; $p < 0,05$) и величиной поверхностного заряда ($r = -0,52$; $p < 0,05$), что согласуется с физической теорией устойчивости коллоидных систем. Электрон-донорные свойства клеточной поверхности также имели слабую отрицательную корреляцию с формированием биопленок ($r = -0,28$; $p > 0,05$). В то же время гидрофобность, поверхностный заряд и способность к аутоагрегации существенной связи с образованием биопленок не имели ($r = 0,08$; $r = -0,07$ и $r = 0,02$, соответственно; $p > 0,05$).

Таким образом, средняя сила корреляции электрон-донорных свойств и заряда клеточной поверхности с аутоагрегацией свидетельствует, что эти свойства не в полной мере определяют

степень аутоагрегации лактобацилл: возможно, что в ряде случаев играют роль рецептор-опосредованные взаимодействия. Также, электрон-донорные свойства могут оказывать слабое влияние на формирование биопленок. Отсутствие сильной корреляции между исследованными признаками указывает на целесообразность оценки всех перечисленных показателей при отборе штаммов лактобацилл для их использования в составе пробиотических препаратов.

Автор выражает благодарность научному руководителю старшему преподавателю кафедры микробиологии ИФМиБ КФУ, к.б.н. Яруллиной Дине Рашидовне, а также аспиранту кафедры микробиологии ИФМиБ КФУ Конновой Светлане Анатольевне за помощь в выполнении измерений на анализаторе *Malvern Zetasizer Nano*.

Физиологические свойства и биотехнологический потенциал умеренно термофильного штамма архей рода *Acidiplasma*

Булаев Александр Генрихович, Муравьев М.И.

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Россия, Москва,
bulaev.inmi@yandex.ru*

Биоокисление сульфидных руд и концентратов с использованием ацидофильных микроорганизмов успешно применяется в металлургической промышленности для получения цветных и благородных металлов. Наиболее эффективны процессы при 40-45°C – при температурах, оптимальных для умеренных термофилов. Доминируют в таких процессах бактерии (родов *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*) и археи семейства *Ferroplasmaceae* (pp. *Ferroplasma* и *Acidiplasma*). Конкретная роль этих архей в процессах биовыщелачивания малоизучена. Штаммы *Ferroplasmaceae* нуждаются в органических источниках углерода, и многими исследователями считается, что их роль сводится к потреблению экзометаболитов автотрофов.

В рамках нашей работы на примере штамма *Acidiplasma* sp. МВА-1, выделенного из сообщества микроорганизмов, сформировавшегося в процессе окисления пиритно-арсенипиритного золотосодержащего концентрата при 45°C в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта (ДЭ), были изучены свойства представителей рода *Acidiplasma*, важные для понимания их биотехнологического потенциала. Оптимальным для роста и окисления двухвалентного железа являлся диапазон температур 50–60°C и pH 0,7–1,2 (нижний предел pH 0,1), концентрация ДЭ 0,1% (без ДЭ штамм окислял двухвалентное железо с низкой скоростью и не рос более одного пересева). Окисление двухвалентного железа не ингибировалось значительно при концентрации трехвалентного железа 15 г/л. Впервые для штаммов *Ferroplasmaceae* показана способность к окислению элементарной серы. Штамм окислял серу в диапазоне температур 35-60°C в присутствии ДЭ, однако не был способен к росту на данном субстрате (окисление происходило только в первом пересеве).

Таким образом, показано, что представители р. *Acidiplasma* могут обладать значительным биотехнологическим потенциалом, так как способны окислять железо и серу при высоких температурах (до 60°C) и при значениях pH более низких, чем многие ацидофилы, и при этом высокие концентрации ионов трехвалентного железа не ингибируют их рост. Свойства представителей *Acidiplasma* могут позволить изменить рекомендуемые для процессов биовыщелачивания условия и повысить эффективность процесса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31210 мол_а.

Влияние значений температуры и pH на рост *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*

Бурова Ю.А., Захаркина Алиса Сергеевна, Ибрагимова С.А.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», Россия,
г. Саранск, Alanika96@yandex.ru

Среди ризосферных микроорганизмов чаще других позитивным действием на растения отличаются бактерии из рода *Pseudomonas*. Им присуща высокая динамичность роста, способность поселяться в ризосфере и ризоплане культивируемых растений, вытесняя тем самым микроорганизмы, негативно влияющие на рост растений. Бактерии рода *Pseudomonas* широко используются для разработки биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а также биопрепаратов, т.к. в большей или меньшей степени они способны синтезировать гормоны роста, фиксировать азот атмосферы, переводить соединения фосфора в усвояемые формы, продуцировать соединения, обладающие фунгицидными или фунгистатическими свойствами против фитопатогенных грибов. Однако при выделении новых штаммов необходимо детальное изучение роста и влияния на него различных факторов.

Для роста каждого микроорганизма необходимы определенные условия культивирования – кислотность среды, температура, освещенность, степень аэрации и другие параметры. На данном этапе целью работы стало изучение влияния некоторых физико-химических факторов на рост бактерии *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* В-11634 при глубинном культивировании на водно-солевой среде. Исследовали влияние начального значения pH и температуры на динамику содержания биомассы. Использовали температурные режимы 20, 25 и 30°C и значения pH от 5 до 7,5 (с интервалом 0,5). С 15 по 25 часы культивирования каждые два часа контролировали содержание биомассы.

Во всех вариантах максимум значения биомассы зафиксирован на 19 и 21-е часы культивирования. Минимальный прирост биомассы отмечен при более кислых значениях pH и составил в среднем $5,1 \pm 0,6$ г/л, что на 43% меньше максимально полученного результата. При нейтральном значении pH уровень биомассы в 9 раз превысил начальный уровень. Полученный результат не противоречит литературным данным, т.к. нейтральное значение pH наиболее благоприятно для работы ферментных систем и развития бактерий. Оптимальной для роста бактерии явилась температура 25°C, при которой уровень биомассы превысил значения других исследуемых температурных режимов практически в два раза и составил $10,9 \pm 1,1$ г/л. Количество биомассы снижается в следующем ряду температур: 25, 30 и 20°C. При этом максимальные значения при 30°C выше, чем при 20°C на 22,9%, что может быть обусловлено активацией работы ферментативных систем при повышении температуры.

Таким образом, были выявлены оптимальное значение температуры, равное 25°C, и pH – нейтральное значение, при которых уровень биомассы *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* максимален.

Устойчивость микроорганизмов нейстонной пленки оз. Байкал к ультрафиолетовому излучению

¹Галачьянц Агния Дмитриевна, ¹Суханова Е.В., ^{1,2}Зименс Е.А., ³Гладка Г.В., ^{1,2}Белькова Н.Л., ¹Парфенова В.В.

¹Федеральное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия, ²Иркутский Государственный Университет, Иркутск, Россия, ³Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина, agniagal@lin.irk.ru

Бактерионейстон – это сообщество бактерий, населяющих поверхностный микрослой воды толщиной около 50 мкм. В связи с особенностями своего расположения – на границе раздела воды и воздуха – этот слой подвержен сильному влиянию солнечной радиации. До сих пор остается открытым вопрос о том, являются ли бактерионейстонные сообщества специфически адаптированными к воздействию УФ-излучения.

Монокультуры бактерий, выделенные из образцов поверхностного микрослоя воды оз. Байкал, подвергали УФ-облучению (лампа БУФ-15, $\lambda=254$ нм) в течение 1-20 минут (40-800 Дж/м²). Выживаемость микроорганизмов и летальную дозу УФ оценивали по изменению процентного содержания выживших клеток от их исходного количества.

Была протестирована 21 изолированная культура бактерий. Чувствительными к ультрафиолету оказались микроорганизмы, являющиеся широко распространенными водными гетеротрофами: *Variovorax* sp., *Janthinobacterium* spp., *Sphingomonas* spp., *Brevundimonas* sp., *Flavobacterium* sp. и *Pedobacter* sp., пороговая доза облучения для которых составила 20-65 Дж/м², а летальная – 55-160 Дж/м². Устойчивость к УФ-облучению продемонстрировали представители следующих родов: *Chryseobacterium* spp., *Rhodococcus* sp. и *Deinococcus* sp. Пороговая доза облучения для них варьировала от 60 до 280 Дж/м², а летальная – от 200 до 720 Дж/м².

Проведенное исследование показало, что в нейстонном сообществе озера Байкал присутствуют микроорганизмы, специфически адаптированные к высоким дозам ультрафиолета. Ввиду того, что широко распространённые виды гетеротрофных бактерий, наиболее часто изолируемые на стандартных питательных средах, не обладают выраженной УФ-резистентностью, для поиска и культивирования новых устойчивых штаммов требуется более тщательный подбор селективных питательных сред.

Создание микробного препарата для очистки бытовых сточных вод

Гальперина А.Р., Иващенко Ксения Валерьевна

ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет», Прикладная биология и микробиология, Россия, Астрахань, ksinyu-24.03@inbox.ru

Вода – ценнейший природный ресурс, потребности в котором ежегодно возрастают, при этом ежегодный расход воды на земном шаре по всем видам водоснабжения составляет 3300-3500 км³.

Вследствие низкой обеспеченности многих населенных пунктов Астраханской области системой централизованной канализации не менее 50% населения вынуждены пользоваться такими разновидностями местной канализации, как выгребные ямы. Основными минусами их применения является потенциальная эпидемиологическая опасность (особенно в теплый период), наличие неприятного запаха, необходимость регулярно откачивать нечистоты за ощутимую плату.

Метод биологической очистки сточных вод основан на способности как гетеротрофных, так и автотрофных микроорганизмов использовать в качестве источников питания разнообразные органические соединения, подвергая последние биохимическим превращениям. Использование свойств адаптации микроорганизмов позволяет успешно решать вопросы биологической очистки бытовых сточных вод, содержащих сложные органические соединения.

Для исследования эффективности очистки бытовых сточных вод проводили опытно-промышленные испытания, объектом исследования которых являлся экспериментальный образец биопрепарата на основе циано-бактериальных сообществ.

В выгребную яму объемом 2 м³ вносили 50 г биопрепарата. Эксперимент продолжали в течение 30 суток. В исследуемых стоках каждые 10 суток отслеживались следующие параметры: содержание растворенного органического вещества (РОВ), химическое потребление кислорода (ХПК), численность санитарно-показательных микроорганизмов (МАФАМ, ОКБ, ТКБ); содержание общего азота оценивали при постановке и окончании эксперимента.

Исследуемая сточная вода обладала светло-соломенным цветом, мутностью и интенсивным запахом сероводорода, гидрохимические исследования выявили ХПК – 908 мг/л, РОВ – 164,9 мг/л, интегральный показатель степени фекального загрязнения – менее 900 кл/мл; численность сапротрофов – 10⁴ КОЕ/мл, содержание общего азота – 33 мг/мл.

В ходе исследования отмечено снижение химического потребления кислорода до 98%; растворенного органического вещества – до 96%; общего азота – до 95%. Численность сапротрофов снизилась на 2 порядка; а интегральный показатель фекального загрязнения остался неизменным. Кроме того, наблюдалось снижение мутности и практически полное уничтожение неприятного запаха.

Таким образом, применение биопрепарата для очистки систем местной канализации, позволит существенно снизить количество органических веществ, уменьшить объем твердых фракций, что способствует отсутствию заиливания канализации, естественным образом уменьшить неприятные запахи. Это создает предпосылки использования подобного рода сообществ для разработки методов биологической очистки бытовых сточных вод.

Оценка способов иммобилизации микрофлоры для создания технологии предобработки высококонцентрированных сточных вод нефтехимической промышленности

Дао Линь Тхи Тху, Григорьева Татьяна Владимировна

*Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, Россия, Казань, linhdao.kpfu@gmail.com*

Сточные воды производства стирала с окисью пропилена (СОП) предприятия «Нижнекамскнефтехим», кроме высокой концентрации органики (ХПК варьировало от 2700 до 16800 мг/л), имеют в своем составе высокотоксичные соединения, что сильно затрудняет использование биологической очистки. Для устранения отрицательного воздействия на активный ил требуется предварительная очистка таких сточных вод перед их поступлением в общезаводские очистные сооружения. Одним из приоритетных и перспективных направлений является создание биотехнологий интенсивной очистки локальных промышленных сточных вод с использованием высокоактивных специализированных микробных комплексов и устройств. Для поддержания высокой концентрации в системе очистки микроорганизмов деструкторов и повышения устойчивости биоценоза к неблагоприятным факторам с целью увеличения степени очистки использовали технологию иммобилизации микроорганизмов на полимерном носителе. Данная работа посвящена анализу возможности снижения уровня загрязнения сточных вод

СОП биологическим путем при использовании иммобилизованной микрофлоры. Эксперименты проводили в полномасштабных промышленных условиях на локальных очистных сооружениях в течение 46 месяцев. В работе использовали накопительную культуру микроорганизмов, адаптированных к высоким концентрациям компонентов сточных вод СОП. Сравнивали эффективность предочистки данных сточных вод без использования носителя для закрепления микрофлоры (в первый период – до 20 месяцев) и при использовании различных иммобилизующих носителей – пенополиуретан, активированный уголь, а также носитель в виде ершей, изготовленных из стекловолокна (во второй период – с 37 до 46 месяцев). В первом периоде эффективность предочистки стоков в биореакторе не превышала 55%. Во втором периоде испытание различных носителей для иммобилизации биомассы в условиях непрерывного культивирования показало, что наиболее эффективно биомасса иммобилизуется на ершах из стекловолокна. При этом ХПК снижалось до 96%. В том случае, когда носителем служил активированный уголь, работа установки в течение первых 10 дней обеспечивала высокую эффективность очистки (до 92%). После 10 дней эффективность очистки снижалась до 50 – 56%. Испытание пенополиуретана в качестве носителя микроорганизмов показало наряду с хорошими адгезионными свойствами его низкую устойчивость к воздействию органических веществ, что приводило к быстрому разрушению носителя. В основе предложенной технологии лежит закрепление селекционированного сообщества микроорганизмов с высокой активностью обезвреживания и разложения органических загрязнений сточных вод на стекловолоконном ерше в биореакторе. Пенополиуретан и активированный уголь не проявили высокой эффективности в процессе предварительной очистки, не обеспечивая достижение требуемых величин адгезии и удержания микробной массы в условиях интенсивной аэрации.

Анализ свойств углеводородокисляющих термотолерантных бактерий, выделенных из образцов грунта России, Казахстана и Антарктиды

^{1,2} *Делеган Янина Адальбертовна, ²Ветрова Анна Андрияновна, ²Иванова Анастасия Алексеевна*

¹ *ФГБОУ ВПО Пуцинский Государственный естественно-научный институт, Россия, Пушино;* ² *ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Россия, Пушино, tewgia@ya.ru*

Загрязнение грунтов и водных экосистем нефтью и нефтепродуктами в настоящее время остается одной из наиболее актуальных проблем. Углеводородные поллютанты в окружающей среде являются одним из распространенных источников углерода и энергии для бактериального метаболизма. Генетические системы, контролирующие способность окислять углеводороды, обнаружены даже у микроорганизмов, выделенных из незагрязненных участков.

В ходе выполнения работы из образцов нефтезагрязненного грунта, отобранных в Подмоскowie и Актауской области (Казахстан), а также на Байкале и в Антарктиде, где загрязнение отсутствовало, методом накопительного культивирования было выделено 86 штаммов бактерий-нефтедеструкторов. Анализ способности выделенных штаммов метаболизировать углеводороды при повышенной (45-50°C) температуре показал, что 18 из 86 штаммов являются термотолерантными.

Таксономическое положение термотолерантных бактерий определяли путем анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рРНК. Было выявлено, что штаммы из пробы грунта в Подмоскowie принадлежат к роду *Gordonia*. Из проб, отобранных в Казахстане, было выделено 4 штамма термотолерантных бактерий рода *Rhodococcus* и бактерия, являющаяся представителем вида *Paenibacillus naphthalenovorans*. Микроорганизмы,

выделенные из проб незагрязненного грунта вблизи озера Байкал и воды из озера в Антарктиде, были идентифицированы как представители родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Все исследуемые штаммы, включая культуры видов *Rhodococcus erythropolis* и '*Pseudomonas teessidea*', выделенные из образцов антарктической воды, способны утилизировать нефть, а также отдельные ароматические и алифатические углеводороды, входящие в состав различных фракций нефти, в качестве единственного источника углерода и энергии при температурах окружающей среды 45-50°C. Анализ исследуемых бактерий на способность к минерализации дизельного топлива в присутствии различных концентраций соли выявил, что микроорганизмы рода *Gordonia* утилизируют углеводороды в присутствии 10% соли. Для остальных углеводородоксиляющих штаммов максимальная допустимая концентрация соли в среде составила 5%.

Структурно-функциональные особенности *Penicillium adametzii* – продуцента глюкозооксидазы

Демешко Ольга Дмитриевна

Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, Минск, demeshkoo@mail.ru

Глюкозооксидаза (ГО) (КФ 1.1.3.4) – ФАД-содержащий фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. ГО катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо-1,5-лактона и пероксида водорода. В дальнейшем D-глюконо-1,5-лактон самопроизвольно или под действием лактоназы превращается в глюконовую кислоту.

Цель работы - изучение структурно-функциональных особенностей *Penicillium adametzii* – продуцента ГО, используемого в промышленной технологии производства препарата Глюкозооксидаза для медицинской диагностики, в условиях глубинного культивирования и сравнение образования ГО различными морфотипами *Penicillium adametzii*.

Известно, что для мицелиальных грибов в условиях глубинного культивирования характерна поливариантность развития, и что направленность биосинтетических процессов соответствует определенной форме роста грибов. Поэтому установление структурно-функциональных особенностей грибов-продуцентов ферментов и определение зависимости уровня образования фермента от морфотипа продуцента чрезвычайно важно для интенсификации и повышения рентабельности биотехнологий производства ферментных препаратов.

Ранее в лаборатории ферментов разработан промышленный способ получения сыпучего посевного материала продуцента ГО *Penicillium adametzii* ЛФ 2044.1 (далее – *P. adametzii*).

При использовании указанного посевного материала в условиях глубинного культивирования *P. adametzii* выявлена поливариантность развития гриба, рост которого может происходить в виде альтернативных морфотипов - нитчатой (мицелиальной) или пеллетной формах.

Пеллеты гриба имели четкую округлую форму, диаметр в процессе культивирования составил 1,2 мм (24 ч), 2,9 (48 ч), 4,0 (72 ч) и 4,9 мм (96 ч). Пеллеты отличались плотной центральной зоной, которая увеличивалась и уплотнялась при выращивании, и опушенной мицелиальной зоной роста, которая соответственно уменьшалась во времени. При мицелиальном росте *P. adametzii* его мицелий характеризовался септированием, разветвлением гиф, наличием ядер и включений.

Проведен сравнительный анализ образования ГО различными морфотипами *P. adametzii*.

Установлено, что уровень образования ГО мицелиальным морфотипом составил 7 ед/мл, пеллеточным - 5 ед/мл; длительность культивирования в первом случае - 72 ч, во втором – 96 ч.

В результате выполненных исследований установлено, что *P. adametzii* в глубинной культуре проявляет диморфизм, представленный двумя морфологическими формами развития мицелия. Формы мицелия гриба отличаются по морфологическим признакам и по способности к синтезу ГО. Показана зависимость образования ГО от морфологической формы роста мицелия гриба.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ № Б13М-139.

Антимикробные свойства хлорофилла люцерны

Денисенко Т.В., Сагаль Владислав Андреевич

ГУО «Лицей №2 г. Минска», Беларусь, Минск, stk71016@yandex.by

Быстрое приобретение микробами резистентности к противомикробным препаратам стимулирует поиск новых средств борьбы и требует строгого контроля за их применением. В связи с этим интерес представляют вещества природного происхождения, способные избирательно воздействовать на различные группы микроорганизмов, регулируя, таким образом, их соотношения в микробиоценозах. В этом отношении определенный интерес представляет фотосинтетический пигмент зеленых растений – хлорофилл.

Целью данной работы являлось исследование антимикробного эффекта хлорофилла люцерны в отношении различных групп микроорганизмов.

В работе использовались методы стерильного приготовления питательных сред, количественного посева бактерий и микроскопического определения жизнеспособности дрожжей. Водорастворимый экстракт хлорофилла разводили физраствором и разливали по чашкам Петри с МПА до получения конечных концентраций 10%, 5%, 1% и 0,5%. Антимикробное действие хлорофилла было исследовано в отношении *Escherichia coli* (ATCC35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), а также *Saccharomyces cerevisiae*.

Исследование показало, что хлорофилл люцерны в концентрациях 0,5-10% обладает способностью в различной степени подавлять рост всех трех исследуемых культур микроорганизмов. Наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение числа КОЕ *S. aureus* (не менее чем на 1 порядок) при его культивировании на МПА, содержащем хлорофилл уже в конечной концентрации, равной 0,5%. В отношении же *E. coli* была отмечена только тенденция ($p < 0,1$) к снижению роста на среде, содержащей хлорофилл по сравнению с контролем (не более, чем в 6,3 раза при конечной концентрации хлорофилла 10%). В экспериментах с дрожжами достоверное ($p < 0,05$) снижение их численности (на 1 порядок) и жизнеспособности (до 55%) спустя 1 час культивирования было отмечено только в присутствии хлорофилла в концентрации 10%. Для более низких концентраций хлорофилла была отмечена лишь тенденция ($p < 0,1$) к подавлению роста дрожжей, не сопровождающаяся потерей жизнеспособности.

Рассматривая *E. coli* и *S. aureus* как представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры кишечника человека (соответственно), находящихся между собой в конкурентных взаимоотношениях, можно предположить возможность целенаправленного воздействия на их соотношение с помощью исследованного экстракта.

Таким образом, несмотря на то, что антимикробная активность исследованного экстракта хлорофилла уступает таковой у антибиотиков, его избирательное действие в отношении различных групп микробов может представлять интерес с точки зрения профилактики инфекционных заболеваний.

Роль региональных молочнокислых микроорганизмов в производстве национальных продуктов питания

Динкаева К.А., Махатова Айгерим Сериковна

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», КН МОН, Республика Казахстан, г.Астана, Dinkaeva_kz@mail.ru

В Республиканской коллекции микроорганизмов проводятся работы по селекции МКБ, однако количество коллекционных культур молочнокислых бактерий, выделенных из традиционных казахских национальных продуктов, ограничено. Также, целесообразным считается выделение МКБ из местных молочнокислых продуктов (шубата и кумыса), так как они более приспособлены к данным эколого-географическим условиям. Исходя из этого, выделение МКБ (шубата и кумыса) из различных регионов Казахстана, исследование биологических и технологических свойств местных штаммов заквасочных культур, с целью дальнейшего их практического использования, остается актуальным.

Объекты исследования - молочнокислые микроорганизмы. Источники выделения: кисломолочные продукты – кумыс и шубат из различных регионов Казахстана. Идентификация культур микроорганизмов проводилась общепринятыми в бактериологической практике методами с использованием определителей.

На основе изучения биохимических свойств были идентифицированы роды и виды выделенных ранее 85 перспективных культур МКБ и дрожжей, из них к роду *Lactobacillus* отнесены 23, к роду *Streptococcus* – 17, *Bifidobacterium* – 20, и 25 культур определены как дрожжи. Определена антибиотикоустойчивость 60 культур лактобактерий и бифидобактерий. Выявлены кислотоустойчивые и кислородоустойчивые бифидобактерии, и проведена их селекция. Активные культуры лактобактерий *L.acidophilus* (05ch); *L.acidophilus* (015k-1); *L.bulgaricus* (018k-3); *L.bulgaricus* (08ch-1) по биотехнологическим свойствам депонированы для пополнения коллекции МКБ музея. Впервые будет создана национальная коллекция заквасочных культур для шубата и кумыса.

Проведенный скрининг молочнокислых микроорганизмов позволил пополнить коллекцию лактобактериями, дрожжами, выделенных из различных регионов Казахстана из заквасочных культур кумыса и шубата с высокой биотехнологической активностью: а) выделены 85 перспективных культур молочнокислых- и бифидобактерий, дрожжей; б) изучены биохимические свойства и идентифицированы: 23 лактобациллы, 20 бифидобактерий и 20 дрожжей; в) по результатам исследований были отобраны штаммы лактобактерий с высокой биотехнологической активностью для создания заквасочных культур шубата и кумыса.

Образование внеклеточных протеолитических ферментов с активаторной к белкам системы гемостаза активностью культурой *Aspergillus terreus* штамм 2

Звонарева Елена Сергеевна, Осмоловский Александр Андреевич

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, zvonareva.es@gmail.com

Наиболее распространенной причиной возникновения сердечно-сосудистых заболеваний являются нарушения в работе системы гемостаза человека, главным образом, тромбозы. Для лечения больных с функциональными нарушениями системы гемостаза все чаще используют препараты ферментативной природы. Однако большую часть таких лекарственных средств получают с использованием белков животного происхождения или рекомбинантных белков, что делает их стоимость неприемлемо высокой для многих пациентов. В связи с этим особый интерес приобретает получение фибринолитических препаратов микробиологическим путем, в частности, с использованием микромицетов.

В работе была использована культура микромицета *Aspergillus terreus* 2, выращенная в условиях глубинного культивирования. Измерение активности ферментов проводили с хромогенными пептидными субстратами. Активаторную к белкам гемостаза активность определяли согласно принятой методике.

Было обнаружено, что *A. terreus* 2 выделял в культуральную жидкость протеолитические ферменты, обладающие активаторной активностью к тканевому активатору пламиногена (ТАП), (определяли с субстратом ТАП H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) и к протеину С (определяли с субстратом активированного протеина С pGlu-Pro-Arg-pNA). Также внеклеточные протеиназы этой культуры обладали хорошей плазминоподобной активностью (определяли с субстратом плазима H-D-Val-Leu-Lys-pNA). Максимум образования ферментов-активаторов ТАП приходился на 4-е и 7-е сутки культивирования, а протеиназ, осуществляющих прямой гидролиз хромогенного субстрата плазима, – на 4-е и 6-е сутки соответственно.

Таким образом, установлено, что культура *A. terreus* 2 образует ферменты, обладающие активаторной активностью к ТАП и протеину С. Наличие у внеклеточных протеолитических ферментов мицелиальных грибов активаторной к ТАП активности показано впервые. Стоит отметить, что способность активировать белки гемостаза говорит о способности этих протеиназ осуществлять реакцию ограниченного протеолиза. Активаторная к ТАП активность в динамике показала два максимума. Наиболее выгодное соотношение активаторной к ТАП и плазминоподобной активности достигается на четвертые сутки культивирования (1:1). Большой интерес представляет выделение и очистка фермента, осуществляющего данную активаторную реакцию.

**Оценка действия сим-триазинового гербицида Прометрина на микроорганизмы
почвы и возможность его биодegradации**
Иванова Елена Владимировна

*Национальный исследовательский Саратовский государственный университет имени
Н.Г.Чернышевского, Саратов, Россия, ms.eviv@mail.ru*

В связи с многолетним применением пестицидов сим-триазинового ряда в сельском хозяйстве большое внимание уделяется проблеме их токсичного воздействия на микроорганизмы почвы, обеспечивающие почвообразовательные процессы. Также стоит вопрос о выборе оптимальных стратегий трансформации пестицидов и удаления их из окружающей среды. Перспективным подходом при ремедиации загрязненных почв является применение биопрепаратов на основе микроорганизмов-деструкторов сим-триазинов.

Определение токсического эффекта от внесения гербицида в почву, длительность его действия, а также определение физиологических групп микроорганизмов, устойчивых к Прометрину и выявление их адаптивной способности к токсиканту, проводили путем анализа динамики численности почвенных микроорганизмов.

В результате выяснили, что внесение пестицида Прометрина в почву вызывает изменение численности микроорганизмов, которая зависит от дозы препаратов. При внесении доз 100 и 1000 ПДК обнаружено торможение размножения плесневых грибов, при внесении дозы 10 ПДК отмечено постепенное нарастание численности микромицетов до контрольных значений. На актиномицеты препарат оказывал сильное ингибирующее действие, которое сохранялось на протяжении 30 суток.

Анализ динамики численности бактерий выявил стимулирование их размножения при внесении всех исследуемых концентраций Прометрина (10, 100 и 1000 ПДК). За время наблюдения численность гетеротрофных бактерий превысила контрольные значения на 10-50%,

что говорит об их высокой скорости адаптации к гербициду, поэтому поиск микроорганизмов-деструкторов проводили именно в этой физиологической группе.

Методом накопительных культур на средах с возрастающими концентрациями Прометрина получено десять штаммов, устойчивых к концентрации Прометрина 2000 ПДК. Были изучены их культуральные, морфологические и биохимические признаки. Установлено, что среди выделенных деструкторов оказались штаммы родов *Acidovorax*, *Bacillus* и *Pseudomonas*. Наилучшие показатели роста культуры в среде М9 с Прометрином в концентрации 50 ПДК (25 мг/кг) в качестве единственного источника углерода и энергии, были отмечены у *P. solonacearum*, *P. putida* и *B. drentensis*.

Доказана деструкция Прометрина штаммом *Pseudomonas putida* П2, который в течение 9 суток разлагал 70% пестицида. Вследствие отсутствия у данного штамма факторов патогенности и наличия высокой деструктивной активности можно считать данный штамм перспективным для использования в составе биопрепаратов, предназначенных для биоремедиации земель, загрязненных Прометрином.

Научный руководитель: доцент, к.б.н. Ксенофонтова О.Ю.

Антимикробные свойства штамма *Pantoea vagans*

Илюхина Дарья Леонидовна, Сулейманова А.Д.

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт
Фундаментальной Медицины и Биологии, Россия, Казань, Laia9301@mail.ru;
aliya.kzn@gmail.com

Представители рода *Fusarium* (анаморфные плесневые грибы) приносят вред народному хозяйству и, являясь патогенами, вызывают заболевания растений - фузариозы, отравления животных и человека токсинами — фузариотоксикозы. Фузариозы растений проявляются в форме гнили корней, увядании, поражений плодов и семян, борьба с этим заболеванием является одним из приоритетных направлений развития сельского хозяйства.

Ранее из почв Республики Татарстан нами был выделен и идентифицирован штамм *Pantoea vagans* 3.2. Известно, что *P. vagans* является одним из эффективных агентов в борьбе с заболеваниями растений, вызванными патогенными микроорганизмами. В связи с этим целью данной работы явилось изучение антимикробных свойств *P. vagans* 3.2.

Для изучения фунгицидных свойств штамма использовали луночный метод на твердой питательной среде. В качестве тестового объекта изучали 5 изолятов микромицетов рода *Fusarium*, выделенных с поверхности пораженных клубней картофеля. Через 5 дней инкубирования при 28°C отмечали полное ингибирование штаммом *P. vagans* 3.2. роста изолятов *Fusarium* sp 1.1, *Fusarium* sp 1.4, *Fusarium* sp 1.5, *Fusarium* sp 1.6, *Fusarium* sp 2.9. Рост и развитие изолятов *Fusarium* sp 1.1, *Fusarium* sp 1.4, *Fusarium* sp 1.5, *Fusarium* sp 1.6, *Fusarium* sp 2.9 ингибировался под действием бактерии на 78, 80, 75, 70, 73 процентов соответственно.

Полученные данные позволяют утверждать о наличии фунгицидной активности у штамма *P. vagans* 3.2. против фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*. Вероятно, бактерии секретируют в окружающую среду противомикробные соединения, ингибирующие рост грибов. Это может служить основой для создания инновационных микробных агробиотехнологий для решения проблем, связанных с заболеваниями растений, вызванных представителями рода *Fusarium*.

Создание коллекции грибов – возбудителей дерматомикозов животных и человека

Киян Владимир Сергеевич, Шарипова А.М., Кухар Е.В.

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Астана, Казахстан,
vskiyen@gmail.com

Разработка серологических и молекулярно-генетических методов диагностики микозов подразумевает использование диагностических компонентов, к которым относятся антигены, специфические сыворотки, белковые компоненты и ДНК возбудителя. Для их получения требуется использование штаммов-продуцентов с заведомо известными морфологическими, биохимическими и генетическими характеристиками. В коллекциях микроорганизмов Республики Казахстан отсутствуют многие виды патогенных грибов, что осложняет задачу по разработке высокочувствительных методов их диагностики.

Цель работы – выделение возбудителей дерматомикозов из патологического материала, их комплексная характеристика и создание коллекции штаммов дерматомицетов.

Выделение возбудителей из патматериала осуществляли на модифицированной среде Сабуро с циклогексимидом и хлорамфениколом или с гентамицином. Биохимические свойства изучали на средах Гисса и Кристенсена. Идентификацию проводили с использованием определителя Саттон Д. с соавт. (2001). Генотипирование штаммов проводили методом сиквенс-типирования с использованием праймеров ITS4-ITS5, D1-D2.

В результате проведенной работы было выделено 60 возбудителей микозов от животных и 40 от человека. Были описаны особенности характера роста, цвет и консистенция колоний на твердых и жидких средах, наличие пигментации, строение мицелия и характер спорообразования. Проведенное генотипирование полученных штаммов и сравнительный анализ результатов во всемирной базе *GenBank* позволило определить видовую и родовую принадлежность возбудителей, среди которых наиболее часто встречались представители видов *Trichophyton interdigitale*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, *Arthroderma vanbreuseghemii*, *Chaetomium globosum*, *Alternaria alternata*, *Candida albicans*. Были подобраны методы получения антигенов с концентрацией белка до 0,25 мг/мл, полисахаридов до 1,0 мг/мл, проведена их биохимическая и иммунологическая характеристика, получены иммунные сыворотки с титром антител в ИФА до 1:51200. Отработаны лиофилизация и криоконсервация для хранения штаммов.

Таким образом, была собрана необходимая информация, позволившая провести процесс депонирования штаммов в Республиканской коллекции микроорганизмов. Созданная коллекция включает 100 штаммов-продуцентов, возбудителей микозов животных и человека, среди которых представители родов *Trichophyton*, *Microsporum*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Candida*. Проведена комплексная характеристика штаммов, описаны морфологические, биохимические, иммунологические и генетические характеристики.

Изучение роли белка Rv0789c в образовании и поддержании покоящихся форм

Mycobacterium tuberculosis

¹Кондратьева Кира Евгеньевна, ²Фурсов Михаил Васильевич

¹МГУ им. Ломоносова, Россия, Москва; ²Институт биохимии им. Баха РАН, Россия,
Москва, lutra-lo@ya.ru, mikhail.fursov88@gmail.com

Одна из проблем успешной терапии туберкулеза заключается в способности возбудителя *Mycobacterium tuberculosis* переходить в нечувствительное к антибиотикам, покоящееся состояние. Необходимо быстрое, эффективное и безопасное лечение подобных форм туберкулеза. Молекулярные механизмы перехода в покоящееся состояние у микобактерий все

еще не выяснены. Исследования профилей транскрипции показали, что экспрессия гена *Rv0789c* повышается в ответ на химический стресс и в модельных лабораторных условиях, вызывающих образование покоящихся форм *M. tuberculosis*. В данной работе исследуется роль белка Rv0789c в образовании и поддержании покоящегося состояния *M. tuberculosis*.

В работе использовался лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv. Мутантный штамм с делецией по гену *Rv0789c* получали методом гомологичной рекомбинации. Гиперэкспрессирующий штамм получен в плазмиде pMV261. Трансформацию клеток *M. tuberculosis* проводили путем электропорации.

Покоящиеся клетки были получены *in vitro* в модели некультивируемости в условиях недостатка калия. Для получения профиля транскрипции клеток в покоящемся состоянии было проведено полногеномное секвенирование нового поколения (RNA-Seq). Показано, что мРНК гена *Rv0789c* является одной из максимально представленных в клетках именно в состоянии покоя, а не в клетках логарифмической фазы роста. С помощью количественной ПЦР сравнили число копий мРНК гена *Rv0789c* в покоящемся состоянии с логарифмической фазой роста. Показано, что в условиях общего падения уровня транскрипции в клетках количество транскриптов гена *Rv0789* остается достаточно высоким. Получена конструкция для гиперэкспрессии Rv0789c в клетках *M. tuberculosis* с использованием вектора pMV261. Для конструирования не маркированного антибиотиками делеционного мутанта по гену *Rv0789c* был использован вектор p2NIL.

Показано, что ген *Rv0789c* кодирует белок, который может принимать участие в процессах формирования и поддержания покоящегося состояния *M. tuberculosis*, но его роль в клетке пока остается неизвестной. Характеристика физиологии полученных мутантов *M. tuberculosis* позволит установить важность гена на разных стадиях развития культуры и в образовании покоящихся клеток.

Авторы выражают благодарность научным руководителям к.б.н. Салиной Елене Геннадьевне и д.б.н., заведующему лабораторией Биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. Баха РАН Капрельянцу Арсению Сумбатовичу. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-01760-а*

Особенности численности и функциональной активности микроорганизмов и грибов в почве экотонов при пирогенной сукцессии в Среднем Приобье

Кострикина Дарья Васильевна

ФГБОУ ВПО Нижневартровский государственный университет, Естественно-географический факультет, Россия, Нижневартовск, sunnydorothy22@gmail.com

В настоящее время лесные пожары стали представлять серьезную опасность, в связи с расширением хозяйственной деятельности человека. В ряде фундаментальных работ достаточно полно освещены закономерности восстановления почв и лесных сообществ после пожаров. Сведений о восстановлении экотонов и микробиологических процессах, происходящих в их почвах на территории Западной Сибири, недостаточно. Актуальность и значимость данной проблемы связана с интенсивным развитием нефтегазовой промышленности и увеличением антропогенного воздействия на территории округа.

Исследования проводили на территории Нижневартовского района, Ханты-мансийского автономного округа-Югры. Образцы почв отбирали на четырех опытных и контрольном экотонах с разной давностью пожаров (2, 15, 30, 55 и 156 лет). Количество микроорганизмов определяли методом посева почвенных суспензий с различной степенью разведения (от 1:10 до

1:1000) на МПА, грибов - на твердую питательную среду Чапека. Протеазную активность изучали методом аппликации на рентгеновской пленке.

Максимальная численность микроорганизмов и колоний грибов была выявлена в почве экотонов поздних этапов пирогенной сукцессии и на контрольном участке – 1,2-1,4 млн/г почвы и 76-98% соответственно. Минимальные показатели отмечены на начальном этапе послепожарного возобновления в почве болотного сообщества – 0,1 млн/г почвы и 6% соответственно. Наибольшее число колоний грибов было на поздних стадиях пирогенной сукцессии в почвах экотона контрольного участка на глубине 10-15 см, глубже 15 см их численность снижается. В почвах изученных сообществ доминировали грибы из родов: *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium*, а также *Actinomyces*. В процессе пирогенной сукцессии происходит увеличение численности *Actinomyces* и грибов. На начальных этапах пирогенной сукцессии преобладает *Penicillium*, на поздних - *Actinomyces*. Протеазная активность почвы повышалась в процессе послепожарного восстановления и изменялась от 9% до 11,7% на болотах, от 23,4% до 61,3% на экотонах, лесные почвы имели средние значения.

Таким образом, для почв экотонов в процессе пирогенной сукцессии в большей степени характерно увеличение протеазной активности, количества и видового разнообразия микроорганизмов, грибов, чем для почв болотных и лесных сообществ, что объясняется «краевым» эффектом, наличием субстратов питания, изменением факторов среды.

Обнаружение нового фактора патогенности у возбудителя легионеллеза *Legionella longbeachae*

Леванова Надежда Александровна

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Россия, Москва,

LevanovaNA@gmail.com

Legionella – грамотрицательная бактерия и возбудитель острой пневмонии у человека (легионеллёз, болезнь легионеров). Хотя *L. longbeachae* стоит на втором месте по распространенности в качестве возбудителя заболевания после *L. pneumophila*, факторы вирулентности данного возбудителя остаются практически неисследованными.

Анализ генома *L. longbeachae* и его сравнение *in silico* с геномом *L. pneumophila* показал наличие у *L. longbeachae* уникального набора эффекторов, которые, по-видимому, доставляются в клетку хозяина с помощью системы секреции IV типа. К числу наиболее исследованных эффекторов *L. pneumophila* относят группу глюкозилтрансфераз семейства Lgt. По строению они принадлежат к гликозилтрансферазам типа GT-A, используют в качестве ко-субстрата УДФ-глюкозу, гликозилируют эукариотический фактор элонгации 1A (eEF1A) в положении серин-53, приводя к остановке трансляции белка и гибели эукариотической клетки. Поиск в геноме *L. longbeachae* нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки гомологичные глюкозилтрансферазе Lgt1 *L. pneumophila*, привел к обнаружению белка Llo1578, проявляющего структурные признаки глюкозилтрансфераз.

Для последующего исследования мы клонировали и экспрессировали ген *llo1578* в составе плазмидного вектора в клетках *E. coli*. Анализ белков Lgt1 и Llo1578 в вестерн-блоте с соответствующими моноспецифичными сыворотками показал, что, несмотря на высокую степень гомологии, белки не реагировали с гетерологичными сыворотками, проявляя высокую антигенную индивидуальность. Также, в отличие от Lgt1, продукт *L. longbeachae* не подавлял реакцию транскрипции/трансляции *in vitro*. Последнее наблюдение указывало на то, что молекулярная мишень Llo1578 отличается от субстрата Lgt1 (eEF1A).

Для исследования биологического действия Llo1578 на эукариотические клетки мы использовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, трансформированные геном *llo1578* «дикого типа» или содержащим мутации, приводящие к заменам аминокислот предполагаемого активного центра фермента. Синтез в дрожжевых клетках белка Llo1578 «дикого типа» приводил к гибели *S. cerevisiae*, тогда как замена W²³, D¹²⁶, D¹⁴², N¹⁷⁷ или W³²⁶ на остаток аланина приводила к потере цитотоксической активности белка. Эти данные указывают на то, что механизм наблюдаемого токсического эффекта может быть связан с глюкозилирующей активностью обнаруженного вещества.

Влияние смеси различных ростовых субстратов на эмульгирующие свойства штамма *Acinetobacter sp.* ИБ ДТ-5.1/1

Мухаматдьярова Светлана Ринатовна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Россия, г.Уфа, biolab316@yandex.ru

Важным свойством, обуславливающим способность бактерий усваивать углеводороды, является продукция ими биоПАВ, которые диспергируют нефтепродукты и увеличивают биодоступность углеводородов для микроорганизмов. Продуцируемые биоПАВ нетоксичны, подвергаются биодegradации и могут синтезироваться бактериями из дешевого сырья, что обуславливает перспективность их применения в биологической рекультивации нефтезагрязненных экосистем.

Цель данной работы – определить индекс эмульгирования культуральной жидкости, свободной от клеток (супернатанта), штамма *Acinetobacter sp.* ИБ ДТ-5.1/1, обладающего высокой окислительной активностью в отношении широкого круга углеводородов и нефтепродуктов, при культивировании на смеси различных ростовых субстратов.

К 4 мл супернатанта добавляли 4 мл подсолнечного масла с последующим встряхиванием в течение 10 мин. Полученную эмульсию оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Индекс эмульгирования определяли как отношение высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в измерительной пробирке и выражали в %. Бактерии выращивали на модифицированной жидкой минеральной среде Раймонда, куда вносили дополнительно дрожжевой экстракт- 2 г/л, NaH₂PO₄- 2 г/л, K₂HPO₄- 2.5 г/л. В качестве источника углерода и энергии использовали смесь спиртов и алканов (C₁₀-C₁₆).

Исследование эмульгирующих свойств штамма *Acinetobacter sp.* ИБ ДТ-5.1/1 показало, что индекс эмульгирования при смешивании супернатанта с маслом был высокий (61-64%) при культивировании штамма на смеси таких субстратов, как этанол и декан, этанол и ундекан, этанол и додекан, этанол и тетрадекан, этанол и гексадекан, а также глицерин и тетрадекан, глицерин и гексадекан, пентаэритрит и гексадекан, изопропиловый спирт и гексадекан. Причем индекс эмульгирования супернатанта в варианте с этанолом и гексадеканом (64%) выше, чем с тем же спиртом и деканом (61%). Таким образом, изучаемый штамм способен к продукции биоэмульгаторов и может служить основой биопрепарата-нефтедеструктора.

Антифунгальные метаболиты эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* стимулируют рост каллусов пшеницы

Нафикова Айгуль Рашитовна

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия,
aigoul.nafikova@gmail.com*

Свободноживущие спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Cohn, обладающие антагонизмом к различным фитопатогенам, давно привлекают внимание исследователей с точки зрения создания эффективных биофунгицидов. В то же время среди бацилл известны эндофитные штаммы *B. subtilis*, которые способны заселять внутренние ткани растений и стимулировать при этом их рост.

Ранее нами из культуральной жидкости эндофитных штаммов *B.subtilis* 26Д и 11ВМ (ВНИИСХМ, №128 и №519) путем осаждения соляной кислотой были получены метаболиты, способные стимулировать рост клеток мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. *in vitro*. Введение этих веществ в среду Мурасиге-Скуга в концентрациях 1, 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 мкг/мл стимулировало рост как сырой, так и сухой массы каллусов до 3-х раз относительно контроля. Наибольшая стимуляция роста растительной ткани отмечалась при концентрациях метаболитов 0,001 и 0,01 мкг/мл для штаммов 26Д и 11ВМ соответственно.

Так как рассматриваемые штаммы бактерий характеризуются антагонизмом к фитопатогенным грибам, было также исследовано фунгицидное действие выделенных метаболитов. Антагонистическая активность бактерий к грибам определялась с помощью метода агаровых блоков, а действие метаболитов – методом бумажных дисков. Как сами клетки бацилл, так и их метаболиты обладали выраженной антагонистической активностью против грибов рода *Fusarium* (*F.graminearum*, *F.avenaceum*, *F.poaе*, *F.culmorum*, *F.tricinctum*), а также гриба *Bipolaris sorokiniana*. В частности, угнетение роста тест-организмов и образование соответствующей зоны задержки развития грибов от 10 до 25 мм, в зависимости от их вида, достигалось при концентрации метаболитов обоих штаммов 25 мкг/диск.

Таким образом, полученные нами метаболиты эндофитных бактерий способны в низких концентрациях стимулировать рост каллусов пшеницы, а в высоких - подавлять рост фитопатогенных грибов. Вероятно, этим можно объяснить наличие как ростостимулирующей, так и фунгицидной активности у указанных выше эндофитных штаммов *B.subtilis* 26Д и 11ВМ. Известно, что антагонизм бацилл к фитопатогенным грибам может быть связан с продукцией антибиотиков липопептидной природы. В связи с этим не исключено, что выделенные нами стимуляторы роста клеток растений с антифунгальными свойствами также являются липопептидами.

Оптимизация условий иммобилизации молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*

Плотникова Данута Тофильевна

Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, Минск, danochka1991@yandex.ru

В настоящее время большое внимание уделяется оптимизации условий иммобилизации молочнокислых бактерий для повышения их жизнеспособности при хранении.

Объектом исследования являлся штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* БИМ В-132, депонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Для иммобилизации использовали 0,5%, 1%, 1,5% и 2% растворы альгината натрия, в качестве сшивающего агента – 0,2М раствор CaCl₂. В результате иммобилизации получены гранулы диаметром ~4 мм, содержащие ~1×10⁷ КОЕ/г лактококков. Максимальные показатели выживаемости лактококков при хранении (99±1% после 2 недель, 96±2% после месяца

хранения при 4°C) отмечались для клеток, иммобилизованных в 1% альгинатный гель. Аналогичные показатели получены при иммобилизации *L. lactis* ssp. *lactis* БИМ В-132 в 0,5% альгинатном геле (99±1% и 95±2% соответственно). Выживаемость лактококков при иммобилизации в 1,5% и 2% геле была значительно ниже (71±2% и 61±2% соответственно после 2 недель, 63±2% и 46±2% после месяца хранения). При изучении влияния кислотного стресса (рН 2,0, 180 мин) на жизнеспособность *L. lactis* ssp. *lactis* БИМ В-132 выявлено, что выживаемость клеток, иммобилизованных в 1% альгинатном геле, составляет 72±3%, что в 2 раза превышает выживаемость неиммобилизованных клеток. Выживаемость лактококков, иммобилизованных в 0,5% альгинатном геле, повышалась незначительно и составила 37±3%. В случае других концентраций альгинатного геля повышения жизнеспособности лактококков не наблюдалось.

Изучено влияние добавления пребиотиков (гуммиарабик, инулин, крахмал, казеинат натрия) в состав 1% альгинатного геля на жизнеспособность *L. lactis* ssp. *lactis* БИМ В-132. Максимальная выживаемость достигалась для лактококков, иммобилизованных в гель с добавлением казеината натрия (выживаемость после месяца хранения 93±1%, двух месяцев – 85±2%), минимальная – с добавлением инулина (64±1% и 0% соответственно).

Таким образом, оптимальным для иммобилизации *L. lactis* ssp. *lactis* БИМ В-132 является гель на основе 1% альгината натрия, введение в его состав инулина, крахмала, казеината натрия не приводит к повышению жизнеспособности лактококков.

Образование протеиназ с коллагенолитическими и фибринолитическими свойствами грибами рода *Aspergillus*

Попова Елизавета Андреевна, Звонарева Е.С., Осмоловский А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, Москва, veliania@gmail.com

Препараты протеиназ, обладающие как коллагенолитической, так и фибринолитической активностью, широко востребованы в сферах медицины и косметологии. Они необходимы для противоожоговой терапии, а также для коррекции дефектов кожи (рубцы, швы). В настоящее время такие препараты получают из гепатопанкреаса крабов и бактериальных продуцентов. Однако оба этих способа обладают существенными недостатками: большими затратами на всех этапах получения и низким выходом продукта. Изучение протеиназ микромицетов позволило выявить ряд продуцентов коллагенолитических и фибринолитических ферментов, перспективных для использования в производстве.

В работе использовали штаммы микромицетов рода *Aspergillus* из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Образование протеиназ изучали в условиях глубинного культивирования продуцентов. Коллагенолитическую активность определяли колориметрически по гидролизу азоколлы, суспендированного в 0.05 М Трис-НСl буфере, рН 8.2. За единицу активности (Е) принимали количество мкг расщепившегося азоколлы за одну мин в 1 мл культуральной жидкости. Фибринолитическую активность определяли методом Аструпа-Мюллерца и выражали в усл. ед./мл культуральной жидкости.

Показано, что большинство исследованных штаммов обладают как коллагенолитической, так и фибринолитической активностью. Наибольшую коллагенолитическую активность проявили культуры *A. ustus* (8.0×10^{-2} Е), *A. ochraceus* L-1 (6.9×10^{-2} Е) и *A. versicolor* (4.3×10^{-2} Е). Фибринолитическая активность внеклеточных протеиназ этих культур составила 652.7, 399.6 и 225.0 усл.ед/мл, соответственно. У некоторых аспергиллов, например у *A. niger* 29, коллагенолитическую активность не наблюдали. Однако данная культура проявляла высокую

фибринолитическую активность (342 усл.ед/мл). Таким образом, наиболее активным продуцентом внеклеточных протеиназ с коллагенолитической и фибринолитической активностью является культура *A. ustus*. Удельное значение коллагенолитической активности протеиназы *A. ustus* составило 8.3×10^{-2} мкг азоколл/мкг белка.

Использование микромицетов для получения коллагенолитических и фибринолитических ферментов является перспективной альтернативой существующим в современном мире способам. В качестве продуцента таких ферментов нами предложена культура *A. ustus*, проявившая высокие значения коллагенолитической и фибринолитической активности.

Биоразложение целлюлозосодержащих субстратов

Прокудина Любовь Ильинична

*МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, Россия,
Москва ljubovprokudina@gmail.com*

Исследования по поиску альтернативных возобновляемых источников энергии крайне актуальны. В частности, микробная конверсия органических субстратов в биогаз (биометан) позволяет не только получить на выходе биотопливо, но и утилизировать различные по своей природе отходы. Особый интерес представляют целлюлозосодержащие материалы, но из-за высокого содержания лигнина в растительной биомассе многие субстраты крайне трудно подвергаются биоразложению. Для этого используют различные механические и физико-химические методы предобработки, которые, однако, увеличивают стоимость всего процесса и зачастую являются неэкологичными. Все больше внимания уделяют изучению и оптимизации технологий с использованием культур микроорганизмов-целлюлозолитиков и ферментов, выделенных из них.

Целью работы было исследование микробного биоразложения целлюлозосодержащих материалов (офисная, фильтровальная, журнальная и газетная бумаги, картон и их смесь) в аэробных и анаэробных условиях. Для этого использовали аэробные микромицеты (*Aspergillus terreus* и *Trichoderma sp.*) и термофильные анаэробные метаногенные сообщества; проводили селекцию наиболее активных сообществ по образованию биогаза (соотношение водорода, углекислого газа и метана измеряли на газовом хроматографе) и определяли активность ферментов-целлюлаз.

В работе было показано, что наибольшая целлюлозолитическая активность у аэробных микромицетов наблюдается на 7 (реже 9) сутки культивирования. Для *Trichoderma sp.* максимальное значение составило 0,729 IU/ml, а для *A. terreus* - 0,626 IU/ml. Для обоих грибов при росте на средах без дополнительного источника углерода (сахарозы) значения активности были выше в 2-14 раз, чем на средах с сахарозой.

Максимальный выход биогаза в анаэробных сообществах при культивировании ряда смешанных сообществ приходится на 20 сутки, при этом кумулятивное содержание метана в наиболее активных пробах составило от 51-66% или 77,3-167,8 млмоль СН₄/л среды.

Это исследование направлено на оптимизацию используемой технологии по переработке целлюлозосодержащих субстратов, показана перспективность применения сообществ микроорганизмов, так как не требуются дополнительные затраты на использование сложных сред на поддержание чистых культур метаногенов, на сортировку отходов (в экспериментах на субстрате «смесь бумаг» выявлены наиболее высокие показатели). Предполагается провести ряд экспериментов, в которых высокая целлюлозолитическая активность микромицетов будет использована как стадия предобработки субстрата для анаэробных сообществ.

Изучение бактерий-обитателей кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки

Xenopus laevis

Росс Дарья Владимировна

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Россия,
Пушино, d_ross@ibpm.pushchino.ru*

Цель работы состояла в изучении бактерий-обитателей кожных покровов гладкой шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. С поверхности слизистого слоя было выделено 9 штаммов ультрамелких бактерий, принадлежащих к различным родам: *Chryseobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Microbacterium*. Особое внимание было уделено изучению изолята грамотрицательной подвижной бактерии, которая по результатам предварительного таксономического анализа отнесена к представителям рода *Stenotrophomonas* sp. штамм FM3. Установлено, что штамм FM3 обладает способностью подавлять рост ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. При этом сам штамм FM3 характеризуется устойчивостью к широкому спектру антибиотиков.

Проведенные комплексные цитологические и физиологические исследования штамма FM3 с применением фазово-контрастной и электронной микроскопии, позволили обнаружить следующие морфологические и ультраструктурные особенности: клетки штамма FM3 представлены тонкими палочками с заостренными концами и одним полярно расположенным жгутиком; клетки имеют типичное для грамотрицательных бактерий строение клеточной стенки, в состав которой входит трехслойная наружная мембрана; оболочка клеток штамма FM3 характеризуется наличием S-слоя с тетрагональной симметрией. При росте на различных питательных средах штамм FM3 формирует везикулы наружной мембраны, которые экскретируются в межклеточное пространство в ассоциированном с фрагментами S-слоя состоянии. Обнаружена способность S-слоя образовывать протяженные трубчатые структуры, которые выявляются в межклеточном пространстве как в свободном, так и в прикрепленном к поверхности клеток состоянии.

Совокупность полученных результатов позволяет считать выделенные штаммы перспективными для дальнейшего изучения их ультраструктурной организации, эপিбиоза, а также устойчивости к действию биологически активных веществ, выделяемых кожными покровами лягушки.

Устойчивость бактерий к аминогликозидным антибиотикам

Рудакова Наталья Николаевна

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии,
Российская Федерация, город Москва, Natachka92@mail.ru*

В настоящее время, несмотря на наличие большого количества антибактериальных препаратов, аминогликозиды по-прежнему широко используют в клинической практике при лечении разнообразных инфекционных заболеваний. Распространение устойчивости бактерий к аминогликозидным антибиотикам представляет собой одну из актуальных проблем в области здравоохранения, причем наиболее распространенным механизмом является ферментативная модификация молекулы антибиотика. Существует три группы аминогликозидмодифицирующих ферментов: нуклеотидилтрансферазы, ацетилтрансферазы и фосфотрансферазы, в данной работе изучалась аминогликозидфосфотрансфераза VIII (APHVIII).

Для исследования влияния фосфорилирования АРНVIII белка по остаткам серина на его каталитическую активность использовали микробиологические, генно-инженерные и биохимические методы: выращивание штамма *E. coli* BL21 (DE3), содержащего ген *aphVIII*, на жидких и твердых питательных средах, рассев штампом-репликатором, определение уровня устойчивости к аминогликозидным антибиотикам с использованием стандартных дисков, метод химической трансформации и выделение плазмидной ДНК, выделение и очистка белков с использованием металл-афинной хроматографии, электрофоретическое разделение белков в ПААГ.

Ранее был проведен сайт-направленный мутагенез гена *aphVIII*, предусматривающий замену выявленных фосфорилируемых остатков Ser-95, Ser-146, Ser-160, Ser-215 нейтральным Ala и получено 9 вариантов АРНVIII белка. В результате проведения серии экспериментов эти варианты были исследованы на устойчивость к канамицину в концентрациях от 50 до 500 мкг/мл в присутствии индуктора ИПТГ и ионов Ca^{2+} , а затем на устойчивость к другим аминогликозидным антибиотикам - неомицину, стрептомицину, амикацину, гентамицину и тобрамицину.

Установлено, что Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование АРНVIII белка происходит главным образом по остатку Ser-146, и эта модификация необходима для ферментативной активности АРНVIII. Фосфорилирование по остатку Ser-160, вероятно, влияет на ферментативную активность АРНVIII по отношению к аминогликозидным антибиотикам амикацину и гентамицину. Полученные результаты делают возможным создание высокоэффективных тест-систем для анализа ингибиторов бактериальных и эукариотических протеинкиназ на основе конструктора белка АРНVIII с включением Ser-146 в составе АРНVIII в каноническую аминокислотную последовательность для модификации этими протеинкиназами.

Эндофитные бактерии в тканях зеленных культур укропа и петрушки

Сарварова Елена Рафисовна

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Россия, Уфа,
sarvarova_lena@mail.ru*

За последнее десятилетие особое внимание микробиологов привлекают эндофитные бактерии, изолируемые из поверхностно стерилизованных (внутренних) растительных тканей. Растущий интерес к этим микроорганизмам связан не только с возможностью их использования в растениеводстве, но и в связи с распространением среди них возбудителей инфекционных болезней человека. Согласно определению Bai с соавторами (2003), к эндофитам относятся микроорганизмы, колонизирующие внутренние растительные ткани, поддерживающие рост и развитие растений и не вызывающие болезней. Таким образом, чаще речь может идти о PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), или, точнее, PGPEB (Endophytic Bacteria). Инокуляция растений такими бактериями вызывает эффекты, сопоставимые с обработкой синтетическими стимуляторами роста, применением минеральных удобрений, а также средств химической защиты от вредных организмов.

На наш взгляд, наибольшая инфекционная опасность эндофитов для человека связана с бактериями, заселяющими ткани зеленных культур, употребляемых в свежем виде, таких, как укроп огородный и петрушка, салат и другие. В связи с этим мы исследовали распространенность и биологическую активность эндофитов этих растений. Листья и стебли с.-х. культур предварительно стерилизовали, затем из внутренних тканей на твердой агаровой среде выделяли эндофитов. Далее методом RAPD-ПЦР оценивали разнообразие штаммов. После этого каждая группа анализировалась на наличие фунгистатической активности к

фитопатогенным грибам (*Fusarium sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*), способность растворять фосфаты, продуцировать сидерофоры и проявлять иную активность.

Встречаемость эндофитов в стеблях укропа составила 59%, в листьях - 17,5%, петрушки – 18,5% и 21,4%, соответственно. Всего было выделено 63 группы изолятов, среди которых встречались растущие на висмут-сульфит агаре и агаре Эндо. Фунгистатическая активность наблюдалась у 18% изолятов, фосфаты растворяли 76,2% изолята, продуцировали сидерофоры – 1,6%. Среди множества изолятов был выявлен один штамм с высокой фунгистатической активностью по отношению ко всем видам грибов, продуцирующий сидерофоры. Не исключено, что антагонистическая активность штамма связана с продукцией именно этих соединений. В настоящее время проводится изучение других биологических свойств выделенных изолятов, а также их родовая принадлежность методом секвенирования генов 16S рРНК.

Модификация методов выделения психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов

Сережкин Илья Николаевич

МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва, serejkinilya@gmail.com

Разливы нефти представляют большую опасность для всех обитателей морских экосистем. Помимо образования пленки на поверхности воды, нефть и её компоненты образуют трудно устранимые загрязнения вдоль береговой линии. Проблема утилизации нефтяных загрязнений становится особенно актуальной по мере развития Арктического региона, где процессы биodeградации существенно замедлены из-за воздействия низких температур. В свете грядущего активного освоения запасов нефти на арктическом шельфе, важным становится создание биопрепаратов для утилизации нефтяных загрязнений на основе аборигенных психрофильных микроорганизмов.

В рамках данной работы был проведен отбор проб грунта и воды в прибрежной зоне Баренцева и Белого моря, после чего 7 отобранных образцов культивировали на минеральной среде с добавлением сырой нефти как основного источника углерода и энергии. Колбы с накопительными культурами находились в условиях постоянного перемешивания при 4°C и 230 об./мин. Для выделения чистых культур из полученных накопительных культур и сообществ была модифицирована методика выделения углеводородокисляющих микроорганизмов. Проводили посев десятикратных разведений образцов на чашки Петри с плотной питательной средой для определения ОМЧ с добавлением минерального фона. После 2 суток инкубации в термостате при 30°C, когда на чашках появлялись видимые колонии, поверхность агара покрывали фрагментами стерильной фильтровальной бумаги, пропитанными смесью сырой нефти и дизельного топлива (толщина бумаги 0,2 мм; смесь нефти и дизельного топлива предварительно стерилизована при 1 ати). После суточной инкубации чашки анализировали на наличие зон просветления фильтровальной бумаги над колониями углеводородокисляющих микроорганизмов. Затем стерильной иглой выполняли небольшие надрезы фильтровальной бумаги над колониями с отбором биомассы микробиологической петлей (из 6 колоний), проводили посев методом истощающего штриха на свежую питательную среду. Отобранные образцы микроскопировали, в результате выявили кокки и многочисленные палочки различного размера.

Разрабатываемая модификация метода выделения углеводородокисляющих микроорганизмов позволит быстро провести отбор высокоэффективных штаммов, значительно

сокращая время создания биопрепарата, что крайне актуально при интенсивном освоении Арктического региона, где будет востребована оперативная разработка биопрепаратов на основе аборигенной углеводородокисляющей микробиоты.

Гликополимеры клеточной стенки *Streptomyces coelicolor*

Скобелев Кирилл Александрович

МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва, kskobelev@me.com

В связи с работами по изучению устойчивости актиномицетов к действию фосфогликолипидного антибиотика моюномицина, мощного ингибитора гликозилтрансфераз, участвующих в синтезе пептидогликана, изучены гликополимеры клеточных стенок некоторых видов стрептомицетов, в частности, *Streptomyces coelicolor*, среди которых выявлен сверхустойчивый к моюномицину штамм M145. Предполагалось, что чувствительность или устойчивость штамма может зависеть от особенностей строения его клеточной стенки, например, от наличия особых гликополимеров.

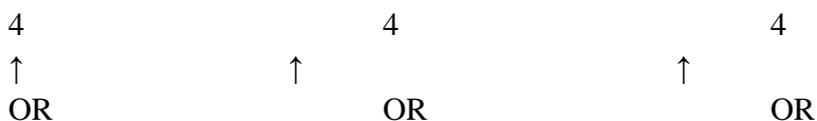
Для исследования использовали штаммы *S. coelicolor*: A3(2), M145 (бесплазмидный вариант A3(2)), три мутантных штамма, полученных из M145, с нокаутом генов *sco4879*, *sco4880*, *sco4881*, соответственно, предположительно ответственных за биосинтез бесфосфатных гликополимеров, и M145* – штамм с восстановленными генами.

Штаммы выращивали до середины логарифмической фазы роста аэробно на пептонно-дрожжевой среде. Из биомассы получали клеточные стенки, и, используя методы экстракции, выделяли препараты гликополимеров, которые изучали химическими и ЯМР-спектроскопическими (спектрометр Bruker Avance 600 в ИОХ РАН им. Н.Д. Зелинского) методами.

Исследования обнаружили наличие единственного гликополимера – поли(дигликозил-1-фосфата) в клеточных стенках штамма A3(2) и всех трёх мутантных штаммов, структура повторяющегося звена которого: $-(6)-\alpha\text{-Galp}-(1\rightarrow6)-\alpha\text{-GlcPNAc}-(1-P)-$.

В клеточных стенках M145 и M145* было выявлено по два гликополимера. Преобладающий – тейхулозоновая кислота новой структуры, принципиально отличающаяся от описанных ранее: гетерогенностью основной цепи и аномерной конфигурацией остатков Kdn – α -, а не β -:

$\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow9)-\alpha\text{-Kdn-2}[(\rightarrow6)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow9)-\alpha\text{-Kdn}-(2\rightarrow)]_n 6)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow9)-\beta\text{-Kdn}-(2\text{-OH}$



где R= H, CH₃ или $\alpha\text{-GlcPNAc}$; n = 0 – 5,

и минорный – идентичный представленному выше поли(дигликозил-1-фосфат).

Итак, введение соответствующих генов в мутантные штаммы восстановило биосинтез Kdn-содержащей тейхулозоновой кислоты, что исключает возможность фенотипических изменений мутантов из-за непредвиденных перестроек генома.

На основании полученных данных были сделаны выводы:

- в клеточных стенках всех штаммов выявлено наличие поли(дигликозил-1-фосфатного) полимера;
- клеточную стенку резистентного к моюномицину штамма M145 отличает присутствие тейхулозоновой кислоты;

- в мутантных штаммах отсутствует Kdp-полимер, что подтверждает предположение о возможном участии нокаутированных генов в его биосинтезе.

Исследуемые штаммы предоставлены кафедрой генетики Львовского Национального университета (Украина). Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00447.

Микробиологические аспекты использования добавки "Сел-Плекс" при производстве кумыса

Слинкин Артем Андреевич

ГНУ Башкирский НИИСХ РАСХН, Российская Федерация, г. Уфа, s-artemk@yandex.ru

На современном этапе молочное коневодство является важным резервом в производстве экологически безопасных продуктов, в основном, для детского и диетического питания. Республика Башкортостан относится к числу селенодефицитных регионов России. Проблема балансирования рациона животных селеном для интенсификации производства высококачественных экологически чистых и обогащенных селеном продуктов коневодства является актуальной. Однако известно, что определенные биологически активные вещества могут оказывать неоднозначное воздействие на качество готового продукта, к примеру, задерживать развитие микроорганизмов, вызывать их гибель или наоборот, способствовать росту. В связи с этим, целью нашей работы являлось изучение влияния добавки «Сел-Плекс» на развитие микрофлоры кобыльего молока и кумыса в процессе их хранения. Мы изучали изменение органолептических показателей, титруемой кислотности, количества молочнокислых микроорганизмов заквасочной микрофлоры и санитарно-показательных микроорганизмов (бактерий группы кишечных палочек, дрожжей и плесени) в процессе хранения образца с определенной периодичностью в герметичной упаковке в течение 14 суток.

Обнаружено, что введение в рацион дойных кобыл добавки «Сел-Плекс» способствовало ингибированию роста количества микроорганизмов, что заметно снижало интенсивность нарастания титруемой кислотности при хранении кумыса. Количество молочнокислых микроорганизмов снизилось к 14 дню хранения с $1 \cdot 10^9$ до $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Изучение микробиологических показателей в процессе хранения кумыса показало, что через 10 суток хранения при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ живая микрофлора в кумысе сохраняется. С учетом коэффициента запаса (1,5) при установлении продолжительности испытания продукта гарантированный срок годности данного продукта следует принять 7 суток. Таким образом, срок хранения кумыса, обогащенного селеном, увеличился в среднем на 4 суток. Селен, обладая антиоксидантными свойствами, замедлял процесс образования кислот при созревании кумыса.

Таким образом, использование селеносодержащей добавки «Сел-Плекс» снижало количество микроорганизмов, приводящих к нарастанию кислотности, что в свою очередь, способствовало увеличению сроков хранения кумыса.

Протеолитическая активность термофильных бактерий после лиофилизации

Смирнова Маргарита Викторовна, Ладутько Е.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Ladutko@mbio.bas-net.by

Термофильные бактерии используются в биотехнологии как источник термостабильных ферментов. Значительное количество генов термофильных ферментов было выделено из геномов бактерий рода *Geobacillus* для гетерологичной экспрессии в мезофильных бактериях. В последние годы исследователи обращают внимание на процессы, связанные со стационарной фазой роста бактерий. В этот период активизируются различные сигнально-сенсорные системы, которые запускают транскрипцию специфических генов. На этом этапе бациллы секретируют в

среду разнообразные белки, включая протеолитические ферменты. В нашей работе изучена протеолитическая активность штаммов бактерий рода *Geobacillus* из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов после лиофилизации при длительном хранении. Особое внимание уделено определению активности гидролитических ферментов в стационарной фазе роста штаммов бактерий *G. stearothermophilus* БИМ В-202 и *G. stearothermophilus* БИМ В-295. Культивирование бактерий осуществляли при 58°C на жидкой модифицированной среде с мясо-пептонным экстрактом. В эксперименте использовали физиологически активную культуру бактерий III генерации. Определение активности нейтральных, кислых и щелочных протеиназ проводили по методу Ансона, используя в качестве субстрата казеин (рН 6,8; 4,8; 8,6) через 72 ч. культивирования, что соответствовало поздней стационарной фазе роста бактерий. Установлено, что через 6 лет хранения культур после лиофилизации уровень протеолитической активности штаммов *G. stearothermophilus* БИМ В-202 и *G. stearothermophilus* БИМ В-295 снижается. Так, активность нейтральных протеиназ штаммов бактерий составила 143 усл. ед/мл и 144 усл. ед/мл, щелочных - 246 усл. ед/мл и 235 усл. ед/мл соответственно. Протеолитическая активность 152 ед/мл при рН 4,8 реакции гидролиза белка зарегистрирована только для штамма *G. stearothermophilus* БИМ В-295. Активность гидролитических ферментов нативных культур данных штаммов бактерий находится в диапазоне 1000-1200 усл. ед/мл. Таким образом, для штаммов термофильных бактерий *G. stearothermophilus* БИМ В-202 и *G. stearothermophilus* БИМ В-295 метод лиофилизации является достаточно эффективным для сохранения жизнеспособности в процессе длительного хранения. Для восстановления физиологической активности культур требуется культивирование на богатых питательных средах как минимум в течение 5 последовательных генераций.

Выражаем благодарность научному руководителю к.б.н. Новик Г. И. за оказанную помощь при планировании и проведении эксперимента.

Биомолекулярные исследования древних патогенов на территории Среднего Поволжья

Тухбатова Резеда Ильгизовна

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия, resedushka@gmail.com

Изучение эволюции живых организмов невозможно представить без изучения их предков и «родственников» — отдаленных и близких. Долгое время считалось, что палеонтологические методы малоприменимы для изучения эволюции микроорганизмов, поскольку относительно малые размеры и отсутствие скелета не позволяют им сохраняться в окаменелостях в доступном для изучения виде. Значительный прогресс в палеомикробиологии был достигнут относительно недавно, когда было выяснено, что отдельные биологические молекулы могут сохраняться в палеонтологических образцах в течение миллионов лет. К счастью, одной из таких молекул является ДНК, что позволяет использовать обнаруженные фрагменты этого вещества для идентификации древних микроорганизмов и изучения их биологического разнообразия.

Применительно к микроорганизмам, вызывающим эпидемические инфекционные заболевания у человека, интерес представляют более поздние находки, связанные не только с палеонтологическим, но и с археологическим материалом. Как оказалось, возбудители инфекционных заболеваний, которые сопровождаются бактериемией, — такие, например, как возбудители чумы, сыпного тифа и т.д., — заносятся с током крови во внутренние ткани зубов

(пульпу), распространяются по организму. ДНК этих возбудителей сохраняется после смерти заболевшего.

Целью нашей работы было определение возбудителей чумы (*Y. pestis*), дифтерии (*C. diphtheriae*), сифилиса (*T. pallidum*) и туберкулеза (*M. tuberculosis*) в древних захоронениях, датируемых 8-6 вв. до н.э. – 16 в. н.э. (Мурзихинский II могильник, г. Булгар, Старокуйбышевский, Танкеевский, Усть-Иерусалимский могильники, Мавзолей Казанского Кремля).

Из 140 образцов человеческих костей из захоронений была выделена тотальная ДНК с помощью набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen), согласно протоколу производителя. Далее была проведена амплификация со специфическими наборами праймеров. Детекцию ПЦР-продуктов проводили в 1,5% агарозном геле после окрашивания этидиум бромидом.

ДНК возбудителей сифилиса и дифтерии не были обнаружены, в то время как в 5 образцах были выявлены остатки ДНК чумы и в 14 – туберкулеза. Размеры продуктов амплификации составили 390 п. н. для *M. tuberculosis* и 300 п. н. для *Y. pestis*. Эти данные получены впервые на территории Татарстана и могут быть использованы для характеристики древних популяций.

Работа выполнена при поддержке РФФИ №11-04-008050а.

Молекулярно-генетическая идентификация бактерий различных таксономических групп из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов

Фальковская Ульяна Владимировна

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, uliana_006@mail.ru

Корректная идентификация поддерживаемых культур является одним из приоритетных направлений работы Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БКМ). Грамотрицательные фитопатогенные бактерии родов *Erwinia* и *Pantoea* и грамположительные бактерии рода *Arthrobacter* из фонда БКМ были идентифицированы с помощью классических микробиологических методов, основанных на изучении морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков. Однако в литературе неоднократно отмечалось, что результаты исследования фенотипических признаков не всегда дают однозначный ответ для определения видовой принадлежности бактериальных культур, и в настоящее время применение молекулярно-генетических методов для установления таксономического положения микроорганизмов является обязательным.

Объектами исследования являлись 10 штаммов бактерий рода *Arthrobacter* и 11 штаммов фитопатогенных бактерий родов *Erwinia* и *Pantoea* из фонда БКМ. В ходе исследования были применены современные методы идентификации бактерий на основании данных анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

По результатам сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК подтверждена видовая принадлежность 13 штаммов, идентифицированных на основании фенотипических признаков как *Arthrobacter citreus* БИМ В-3, *Arthrobacter nicotinae* БИМ В-5, *Arthrobacter crystallopoietes* БИМ В-13, *Arthrobacter globiformis* БИМ В-255, *Pantoea agglomerans* БИМ В-242, БИМ В-281, *Pectobacterium carotovorum* БИМ В-560, БИМ В-629, БИМ В-631, БИМ В-632, БИМ В-633, *Pantoea agglomerans* БИМ В-562, *Pectobacterium wasabiae* БИМ В-561. Для 5-ти штаммов получен новый видовой диагноз: *Arthrobacter defluvii* БИМ В-512, *Arthrobacter phenanthrenivorans* БИМ В-513, БИМ В-514, *Arthrobacter scleromae* БИМ В-2240, *Pantoea vagans* БИМ В-325. Штамм *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6 идентифицирован как представитель филогенетически близкого рода *Microbacterium*. Определить видовую

принадлежность штаммов *Arthrobacter globisporus* БИМ В-10 и *Erwinia herbicola* БИМ В-219 не удалось из-за высокой (98–99,7%) гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с референтными последовательностями нескольких видов бактерий рода *Pantoea* и *Arthrobacter*, поэтому данные штаммы идентифицированы как *Arthrobacter* sp. и *Pantoea* sp.

Полученные результаты подтверждают необходимость уточнения таксономической принадлежности коллекционных штаммов бактерий, в первую очередь имеющих практическое значение, с использованием современных молекулярно-генетических методов.

Подбор питательных сред на основе отходов пищевых производств для роста и антибиотикообразования микроорганизмов-антагонистов

Федорова Ольга Анатольевна

*Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, Узбекистан, Ташкент,
fed-olga78@mail.ru*

В последние годы происходит переориентация стратегии и тактики систем защиты растений от фитопатогенов в направлении расширения ассортимента и объёма применения различных биологических препаратов. В Институте микробиологии Академии наук Республики Узбекистан разработан комплексный микробный препарат Вербактин для защиты хлопчатника от вертициллезного вилта. Важной особенностью препарата является использование для его разработки метаболитов местных культур микроорганизмов - бактерий *Bacillus licheniformis* 234 и актиномицетов *Streptomyces roseoflavus* 33, отобранных в результате разработанного нами метода ступенчатого отбора из сотен культур ризосферы хлопчатника. Оптимизация промышленного производства биопрепаратов включает несколько этапов, из которых первым является подбор питательных сред для культивирования микроорганизмов с высокой антагонистической активностью по отношению к *Verticillium dahliae* и другим фитопатогенам хлопчатника.

Целью работы явился поиск заменителей источников углерода и азота, входящего в состав питательной среды, на более дешевые – отходы местных пищевых производств.

При изучении возможности использования отходов спиртовой, пивоваренной, сахарной, зерновой промышленности исходили из факта наличия в них питательных веществ, необходимых для роста и антибиотикообразования антагонистов. В составе питательной среды Чапека были использованы послеспиртовая зерновая барда, отработанные дрожжи - отход пивного производства, меласса, рисовые отруби. На среде с зерновой бардой показана возможность полного отсутствия источников азота и углеводов. При этом антибиотическая активность (диаметр зоны подавления роста, d) по отношению к *Verticillium dahliae* у *Bacillus licheniformis* 234 на среде Чапека составляет d=35-36 мм, на среде с бардой с добавлением NaNO₃ - 60-65 мм, в то время как на той же среде без добавления NaNO₃ - 52-61 мм, антибиотическая активность *Streptomyces roseoflavus* 33 на тех же питательных средах составляет d=58-62 мм; 51-59 мм; 52-58 мм, соответственно. Высокие показатели антибиотической активности антагонистов отмечены на среде с отходами пивоваренных производств, при этом зона подавления роста фитопатогена бактериями и актиномицетами составляет 55-60 и 52-58 мм, соответственно. Экспериментально показана также возможность использования свекловичной мелассы и рисовых отрубей для культивирования антагонистов *Bacillus licheniformis* 234 и *Streptomyces roseoflavus* 33.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что отходы местных производств (послеспиртовая зерновая барда, отработанные дрожжи, меласса, рисовые отруби) могут использоваться в качестве дешевых микробиологических питательных сред для

культивирования микроорганизмов с целью получения биопрепаратов для биоконтроля заболеваний хлопчатника, являясь альтернативой дорогостоящим компонентам в составе питательных сред.

Ингибиторы образования биопленок бактериями *B. subtilis* на основе производных фуранонов и пирролинонов

Хакимуллина Эльвина Наилевна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань, elvina5555@mail.ru

Биопленки – очень тесно приросшее к субстрату сообщество дифференцированных микробных клеток, заключенных в полисахаридный матрикс. Недавно было показано, что бациллы способны образовывать смешанные биопленки с патогенными бактериями и тем самым повышать их устойчивость к бактерицидным препаратам. В составе биопленок устойчивость бактерий к лекарственным средствам и иммунной системе человека многократно возрастает, что вызывает необходимость разработки средств их подавления. На роль таких лекарственных средств претендуют галогенизированные фураноны, которые подавляют рост бактерий и действуют в концентрациях (5 мкг/мл), не токсичных для эукариот.

Целью работы явилось провести скрининг соединений на основе фуранона и пирролинона, способных подавлять образование биопленок клетками *Bacillus subtilis*. Нами были протестированы 103 фуранона и 39 пирролинона. В результате проведенного скрининга были отобраны соединения, подавляющие рост и образование биопленок более чем на 20% - соединения с условными номерами фураноны 12, 15, 29, 94, 101 и пирролиноны 21 и 22. Было установлено, что эти соединения эффективно подавляют рост и образование биопленок *B. subtilis* уже при концентрациях 5-10 мкг/мл.

Далее была исследована цитотоксичность этих соединений на клетках линии MCF7 (рак молочной железы) и фибробластах человека. Был проведен МТС-тест и определены концентрации соединений, снижающие активность митохондриальной дегидрогеназы на 50%. Из исследованных 7 соединений фуранон 94 не оказывал токсического эффекта на клетки MCF7 и фибробласты. Исследования цитостатического эффекта проводили путем микроскопирования и подсчета количества клеток. Было установлено, что фураноны 94 и 101 не влияют на морфологию раковых клеток молочной железы при концентрации 10 мкг/мл, при которой образование биопленок снижалось в 5 раз. В случае фибробластов они не оказывали влияния при концентрациях до 10 мкг/мл. Следовательно, фураноны 94 и 101 можно считать перспективными соединениями для использования для подавления образования биопленок клетками бацилл.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 14-04-31635 мол_а.

Изучения микробиоты технологических растворов, применяемых на урановом месторождении «Семизбай» (Северный Казахстан)

Ханнанов Ринат Асхатович, Жакупов Е.Ж., Жусупов С. И., Тен О.А., Балпанов Д. С.

Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки МОН РК, Казахстан, Степногорск, ipbncbrk@mail.ru

В конце XIX века благодаря работам выдающегося русского микробиолога С. Н. Виноградского были открыты микроорганизмы, утилизирующие неорганические соединения. С практической точки зрения интересна группа тионовых бактерий благодаря их способности окислять сульфидные руды цветных и тяжёлых металлов. Таким образом, тионовые бактерии нашли практическое применение в гидрометаллургии. Для Казахстана особый интерес

представляет вид гидрометаллургического производства основанного на подземно-скваженном выщелачивание (ПВС) урана. На долю ПВС урана приходится до 15% добываемого урана в республике. В последние годы активно исследуются способы увеличения срока эксплуатации месторождений за счёт повышения полноты выработки. Это возможно достичь посредством вовлечения упорных неокисленных руд за счёт введения в технологические растворы химических окислителей. В качестве окислителей широко применяются пероксид водорода, кислород воздуха и озон. Применение химических реагентов сопряжено с экологическими проблемами и дороговизной процесса. Альтернативой могут выступать биогеотехнологии, а именно использование хемолитоавтотрофных микроорганизмов для регенерации активного окислителя (растворенного окисного железа).

В нашей работе изучались воды технологических растворов на предмет наличия хемолитоавтотрофной микрофлоры, интересной в плане технологического использования в ПВС урана. Из технологического раствора уранового месторождения «Семизбай» были выделены три изолята. Два были охарактеризованы как психротолерантные ацидофильные хемолитоавтотрофы, третий как мезофильный ацидофильный хемолитоавтотроф. Методом сопоставления полученных последовательностей гена 16S РНК с последовательностями соответствующего гена эталонных штаммов базы данных BLAST было установлено родство SU-6 и FT-19 к *Acidithiobacillus ferrivorans*, а SU-5 к *Acidithiobacillus ferroxidans*. Особый интерес представляют психротолерантные штаммы SU-6 и FT-19, относящиеся к виду *Acidithiobacillus ferrivorans*, способные окислять 3,9 и 4,2 г закисного железа в течение часа при температуре 10-12°C соответственно. Тем самым их потенциал сопоставим с применением химических агентов таких, как пероксид водорода, что открывает возможности для исследований, направленных на создание технологии бактериального выщелачивания урана.

Биологическое действие внеклеточного пептидного фактора *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* на бифидобактерии

Харченко Наталья Васильевна

МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,

Kharchenkonatasha@gmail.com

Наиболее широко используемые пробиотики включают штаммы бифидо- и молочнокислых бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, а также некоторые непатогенные штаммы, такие как *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faeciens*, *Saccharomyces cerevisiae Boulardii* и др. Активность пробиотических микроорганизмов в значительной степени определяется их способностью выживать при прохождении через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека и колонизировать кишечный тракт (КТ). Ранее было показано, что реактивирующий пептидный фактор (РФ), выделяемый клетками *L.casei*, проявляет протекторное и реактивирующее действие в отношении представителей про- и эукариот, подвергаемых действию различных стрессоров.

Цель настоящей работы – изучение защитного, реактивирующего действия РФ и КЖ *L.casei* на пробиотические бактерии ЖКТ человека.

Было показано, что при внесении 50 и 100 мкл/мл КЖ в среду для культивирования выход биомассы *B. bifidum* увеличивается более, чем на 50%. Дальнейшее увеличение количества вносимой КЖ приводит к снижению накопления биомассы, возможно, за счет снижения рН среды, что отрицательно влияет на развитие бифидобактерий. Внесение РФ в питательную среду стимулирует рост культуры. Степень стимуляции находится в прямой зависимости от количества внесенного РФ.

При создании кислотного стресса, путем выдерживания суспензии клеток в течение 16 ч в 0.1 М растворе лимонно-фосфатного буфера, рН 4.0, было показано, что число КОЕ снижалось почти на два порядка, по сравнению с контролем. Преинкубация суспензии клеток с КЖ и РФ увеличивала число жизнеспособных клеток в 11 и 12 раз соответственно. РФ и КЖ оказывали не только защитное, но и незначительное реактивирующее действие в 1.4 раза.

Из данных следует, что преинкубация с РФ суспензии клеток, подвергаемых действию желчных солей, увеличивает их выживаемость в 5.6 раза, а постинкубация – в 2.6 раза.

Изучено защитное действие РФ и КЖ на выживаемость лиофилизированных клеток бифидобактерий с криопротекторами и без них при длительном хранении. Показано, что после 2-х месяцев хранения бифидобактерий число КОЕ во всех вариантах было на одном уровне. Через 3 месяца хранения эффективность выживаемости клеток бифидобактерий, лиофилизированных с криопротекторами, была такая же, как и у лиофилизированных клеток с РФ и несколько выше у клеток, лиофилизированных только с КЖ. Однако выжившие клетки при лиофилизации только с РФ и КЖ были более жизнеспособными. Стоит отметить, что если клетки лиофилизированы с криопротектором и РФ, их выживаемость увеличивается в несколько раз по сравнению с другими образцами. Ранее было показано, что действие РФ может быть связано с включением общих репарационных механизмов как в отношении поврежденной ДНК, так и восстановления целостности цитоплазматической мембраны.

Биоконтроль фитопатогенных грибов, вызывающих корневые болезни нута, при помощи PGPR, в условиях засоления почвы

Шурыгин Вячеслав Владимирович

Национальный Университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека, Узбекистан, Ташкент, slaventus87@inbox.ru

Нут (*Cicer arietinum* L.) - очень распространённая в Турции, Индии и Центральной Азии бобовая культура. Хотя потенциальный урожай различных сортов нута превышает 4 т/га, средний получаемый урожай составляет менее 0,8 т/га. Разница между потенциальным и средним урожаем возникает в основном из-за болезней, вызываемых фитопатогенными грибами. Целью наших исследований была проверка патогенности различных фитопатогенных грибов для нута, а также попытка повысить выживаемость растений нута в заражённой грибами засоленной почве при помощи инокуляции семян нута различными бактериями - антагонистами грибов.

Для эксперимента использовались семена нута сорта *Xalima*. Фитопатогенные грибы: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium maniliforme*, *Fusarium vasinfectum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*. Бактерии антагонисты: KR 083, KR 076, 3612, Ep 14, Tivi 7, Rif ep 17, Rube 1326, BB-135, TSAU-20, *Mesorhizobium ciceri*-4, *Rhizobium sp.*-6, *Rhizobium sp.*-9, *Pseudomonas chlororaphis*-66, *Rhizobium sp.* IC-53. Был проведён горшечный эксперимент, при котором в предварительно подсоленную почву (1,5% NaCl), заражённую различными фитопатогенными грибами, высевали семена нута, предварительно инокулированные исследуемыми бактериями.

Результаты показали, что в условиях засоления наиболее патогенными для нута грибами оказались *Fusarium oxysporum* (выживаемость 0%), *Rhizoctonia solani* (выживаемость 0%), *Fusarium solani* (выживаемость 0%) и *Fusarium vasinfectum* (выживаемость 17%). Однако при инокуляции семян различными бактериальными штаммами выживаемость нута в заражённой почве повышается в той или иной степени. Особо выделились штаммы *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66, обладающие повышенным антагонизмом ко всем исследуемым

видам грибов. Так, в почве, заражённой *Fusarium oxysporum*, количество выживших растений после инокуляции семян штаммом *Pseudomonas chlororaphis*-66 составило 85%, а штаммом *Mesorhizobium ciceri*-4 – 77%. В почве, заражённой грибом *Fusarium solani*, штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 повысили процент выживаемости растений до 88 и 86 соответственно.

Бактериальные штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 обладают большим потенциалом в биологическом контроле корневых болезней нута, вызываемых различными фитопатогенными грибами в условиях засоления, и могут быть использованы для создания на их основе биологического препарата, защищающего нут от корневых болезней.

Влияние температурного фактора на биоразнообразие микроорганизмов

Ядрихинская Варвара Константиновна

Северо-Восточный Федеральный университет им М.К.Аммосова, биолого-географический факультет, Якутск, Россия, varvara-kon@mail.ru

Немаловажным фактором, влияющим на климат и почвообразовательные процессы, является наличие многолетнемерзлых пород, толщина которых в Центральной Якутии в районе г. Якутска достигает 200-400 м. Многолетняя мерзлота и явления, связанные с нею, накладывают отпечаток на всю природу Якутии и оказывают огромное влияние на биологические процессы. Изучение почвенной среды г. Якутска (2001-2013 гг.) показало, что в селитебных зонах уровень фекального загрязнения в 15% случаев превышал допустимые санитарно-гигиенические нормы: индекс БГКП (бактерий группы кишечной палочки) достигал 3×10^2 кл/г, индекс энтерококков - 1×10^1 кл/г, что относит эти территории к зоне умеренной эпидемической опасности. Почвы промышленных предприятий и автомагистралей по уровню бактериальной контаминации относятся к категории чрезвычайно опасных (индекс БГКП достигал 1×10^4 кл/г, индекс энтерококков – 1×10^3 кл/г). Для изучения выживаемости микроорганизмов при низких температурах окружающей среды в 2013 г. на разных расстояниях от автотрассы (2, 5, 10, 20, 50, 100, 250 м) и с различных глубин (0-10, 10-20 см) взяты пробы почв в июле и августе (28 проб). Результаты показали, что общее количество микроорганизмов (ОМЧ) достигало до 9×10^6 кл/г (10-20 см). Обнаружены фекальные энтерококки (*Streptococcus faecalis*) до 3×10^4 кл/г на расстоянии 250 м (10-20 см), клостридии (*Clostridium perfringens*) на расстоянии 2-10 м до 1×10^3 кл/г (10-20 см), БГКП (представители родов *Escherichia*, *Klebsiella* и *Citrobacter*). Во всех пробах обнаружены неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) (представители родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*) до 9×10^6 кл/г и грибы рода *Aspergillus* до 62×10^1 кл/г (0-10 см). После замораживания (при -18°C) в течение 3 и 4 месяцев ОМЧ уменьшилось на 1-2 порядка, обнаружены НГОБ и представители рода *Klebsiella*, относящиеся к психрофильным микроорганизмам и обладающие высокой адаптационной способностью к экстремально низким температурам.