



МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

2019

Материалы
XI Международной
научной конференции

Минск, 3–6 июня 2019 г.

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Отделение биологических наук
ГНПО «Химический синтез и биотехнологии»
Институт микробиологии
Белорусское общественное объединение микробиологов

МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Материалы
XI Международной научной конференции

Минск, 3–6 июня 2019 г.

Минск
«Беларуская навука»
2019

УДК 606:579.6(043.2)
ББК 30.16я43
М59

Организационный комитет конференции:

Э. И. Коломиец (председатель), Н. В. Сверчкова (заместитель председателя),
А. В. Сидоренко (секретарь), З. М. Алещенкова, Л. Н. Валентович,
Е. М. Глушень, А. И. Зинченко, А. Г. Лобанок,
Т. В. Романовская, Т. В. Семашко

Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты :
М59 материалы XI Междунар. науч. конф. (Минск, 3–6 июня 2019 г.) / орг. ком.
конф.: Э. И. Коломиец (председатель) и [др.]. – Минск : Беларуская навука,
2019. – 281 с.
ISBN 978-985-08-2453-0.

В сборнике представлены материалы выступлений участников XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» по следующим направлениям: физиология, биохимия и генетика микроорганизмов; микробный синтез биологически активных соединений, генно-инженерное конструирование микроорганизмов, коллекции микроорганизмов; биотехнологии для сельского хозяйства; биотехнологии для медицины и промышленности; природоохранные биотехнологии. Представляет интерес для специалистов в области микробиологии и биотехнологии.

УДК 606:579.6(043.2)
ББК 30.16я43

ISBN 978-985-08-2453-0

© Институт микробиологии НАН Беларуси, 2019
© Оформление. РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Секция 1 Физиология, биохимия и генетика микроорганизмов	12
The study of molecular-genetic characteristics of isolates of lactic acid bacteria in fish Abisheva G.Zh., Sarmurzina Z.S., Bissenova G.N., Abitaeva G.K., Urazova M.S., Tekebaeva Zh.B., Abilchadirov A.S., Abzhalelov A.B.	13
Характеристика бактерий рода <i>Bacillus</i> - перспективных агентов биологического контроля патогенов растений Белявцева К.В., Шмыга Е.Ю., Сидоренко А.В.	14
Характеристика бактериофагов Hena1 и Hena2 специфичных в отношении <i>Erwinia amylovora</i> Бесараб Н.В., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н., Моховиков М.А., Мильчанин О.В.	16
Устойчивость бактерий <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> 5Ap к ионам тяжелых металлов Букляревич А.А., Охремчук А.Э., Кутюн Е.Л., Чернявская М.И., Валентович Л.Н., Титок М.А.	18
Исследование липолитической активности микроорганизмов, выделенных из морских звезд и ежей, собранных во время 7 Белорусской антарктической экспедиции Герловский Д.О., Литвинко Н.М.	21
Исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств мезофильных молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников Головнева Н.А., Рябая Н.Е., Сафонова М.Е., Морозова А.Н., Щетко В.А., Самарцев А.А., Буко А.И.	24
Влияние плазмиды pBS72 на жизнеспособность бактерий <i>Bacillus subtilis</i> в стрессовых условиях среды Гуринович А.С., Титок М.А.	26
Распространение плазмиды тета-типа pBS72 в клетках природных бактерий <i>Bacillus subtilis</i> Гуринович А.С., Сацункевич Н.А., Титок М.А.	28
Выделение и определение функций <i>Bacillus subtilis</i> EP-ABA и <i>Moraxella osloensis</i> EP- ABA2 в метаногенных сообществах, разрушающих азокрасители и аминокислоты Дьяконова А.Т., Тактарова Ю.В., Чердынцева Т.А., Котова И.Б.	30

Изучение фитопатогенных свойств бактерий <i>Bacillus pumilus</i> , изолированных на территории Беларуси Евдокимова О.В., Валентович Л.Н.....	32
Бактериофаг DT57C - платформа для создания терапевтических фаговых препаратов нового поколения Ефимов А.Д., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летаров А.В.	35
Оценка антибиотикочувствительности бактерий группы <i>Bacteroides fragilis</i> , изолированных от пациентов с интраабдоминальными инфекциями Кожухметова С.С., Жолдыбаева Е.В., Атавлиева С.Ш., Тарлыков П.В., Нугманова Р.Е. Сыздыков Т.А., Хожаева Г.С., Раманкулов Е.М.....	38
Молекулярно-генетический анализ эндофитов эрикоидной микоризы у рода <i>Vaccinium</i> Камельчук Я.С., Баранов О.Ю.....	40
Воздействие <i>Mycoplasma pneumoniae</i> и CARDS-токсина на продукцию ИЛ-33 клетками респираторного эпителия Костюк С.А., Глинкина Т.В.	42
Производство α - и β - галактозидаз бактериями <i>Bifidobacterium adolescentis</i> Морозова А.Н., Головнева Н.А.....	44
Сравнительная характеристика методов выделения ДНК из биоматериала с помощью высокопроизводительного массового секвенирования Охремчук Е.В., Охремчук А.Э., Буйницкая С.В., Сидоренко А.В., Валентович Л.Н.....	46
Морфология колоний <i>Cladosporium</i> sp. 2 под воздействием биоцида Rocima GT Надеева Г.В., Евграфова Е.С., Изотова Е.Д.....	48
Влияние фенольных соединений растений на продукцию экзополисахаридов и образование биопленок бактериями <i>Erwinia amylovora</i> Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н.	50
Микробиологическая характеристика синовиальной жидкости коленного сустава пациентов с реактивной артропатией Полуян О.С., Костюк С.А., Бенько А.Н.....	52
Идентификация спорообразующих бактерий K9 и 40 и выявление генетических детерминант синтеза антимикробных метаболитов в их геномах Проскурнина И.А., Кантор К.В., Коломиец Э.И.....	54
Флуориметрический анализ взаимодействия глюкозооксидазы <i>Penicillium adametzii</i> и наночастиц благородных металлов Семашко Т.В.....	57
Предобработка прочтений последовательностей ДНК в контексте определения видового состава микробных сообществ Сиколенко М.А., Валентович Л.Н.....	59
Рестрикционный анализ генов <i>gro</i> для видовой идентификации бактерий рода <i>Rhodococcus</i> Титок М.А., Букляревич А.А.	61
Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, способных развиваться при низких температурах Тригубович А.М., Мямин В.Е.....	64
Характеристика профагов бактерий <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> 5Ap Чернявская М.И., Кугач А.А., Валентович Л.Н., Титок М.А.	66

Выделение природных изолятов спорообразующих микроорганизмов, обладающих высокой экзоферментативной активностью и способностью к росту в широком диапазоне условий Шонина М.Ю., Давыдовская А.М., Лапец А.Е., Лагодич А.В.	69
--	----

Секция 2 Микробный синтез биологически активных соединений.

Генно-инженерное конструирование микроорганизмов.

Коллекции микроорганизмов.	71
Towards development of plasmacytoma cells-based expression systems utilizing alphavirus vectors: an NS0-VEE model Keyer V.V., Shevtsov A.B., Ramankulov Y.M., Shustov A.V.	72
Construction of an infectious DNA clone of yellow fever virus Syzdykova L.R., Keyer V.V., Shevtsov A.B., Ramankulov Y.M., Shustov A.V.	73
Новая эндо-1,3(4)-β-глюканаза из бактерий <i>Rhizomucor</i> sp. Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П., Федоров А.С.	74
Разработка основ биотехнологического способа получения молочной кислоты Буко А.И., Головнева Н.А., Круль Л.П., Климовцова И.А.	76
Бактериофаг <i>Pseudomonas phage BV-70</i> и способы его консервации Герасимович А.Д., Новик Г.И.	79
Новая фитаза из бактерий <i>Kosakonia sacchari</i> Гордеева Т.Л., Борщевская Л.Н., Калинина А.Н., Синеокий С.П., Каширская М.Д. Воронин С.П.	82
Конструирование вектора для экспрессии гена глицерол-3-фосфатоксидазы Демешко О.Д., Семашко Т.В., Казловский И.С., Зинченко А.И.	84
Получение аналогрезистентных мутантов бактерий <i>Pseudomonas fluorescens</i> способных к сверхсинтезу индолил-3-уксусной кислоты Заинчковская А.Н., Храпцова Е.А.	86
Коллекция культур промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз Зайнитдинова Л.И.	88
Создание штамма-продуцента рекомбинантного мутантного сладкого белка – браззеина Казловский И.С., Бельская И.В., Зинченко А.И.	90
Создание рекомбинантного штамма <i>Escherichia coli</i> – продуцента браззеина Казловский И.С., Лемеза Д.А., Зинченко А.И.	92
Аннотация векторных конструкций, для создания коллекции генетических конструкций для генно-инженерных целей Казловский И.С., Чеботарёв Л.Ю., Охремчук А.Э., Булатовский А.Б., Зинченко А.И. ...	93
Новая эндо-1,4-ксилаза из бактерий <i>Pyromyces finnis</i> Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П.	95
Поиск новых штаммов бактерий, проявляющих липолитическую активность Курманбаев А.А., Байгонузова Ж.А.	97
Создание генетической конструкции для получения клеток <i>Escherichia coli</i> , продуцирующих человеческий сапосин С Ладысюк В.А., Булатовский А.Б., Казловский И.С., Зинченко А.И.	99

Создание генетической конструкции для нокаута генов ДАГФ-синтаз II типа у бактерий <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> В-162 Левданская А.И., Василевская М.Е., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П.	101
Анализ влияния <i>hcn</i> -кластера генов на антибактериальную и антифунгальную активность бактерий <i>Pseudomonas brassicacearum</i> БИМ В-446 Муратова А.А., Валентович Л.Н.	103
Конструирование векторной системы на основе репликона природной плазмиды бактерий <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i> 8 Пилипенко Н.Н., Валентович Л.Н.	105
Разработка нового метода определения точки встраивания mini-Tn5хуIЕ при транспозоном мутагенезе бактерий Попова И.В., Валентович Л.Н.	107
Морфобиологическая характеристика видов рода <i>Alternaria</i> Nees из коллекции кафедры ботаники БГУ Федюшко И.А., Поликсенова В.Д.	109
Влияние химического мутагенеза на рост актиномицетов и образование антибиотиков Хасенова А.Х., Акылова М.А., Турлыбаева З.Ж., Султанова А.	112
Использование рекомбинантной диаденилатциклазы для синтеза цикло-ди-АМФ Хмельская К.С., Казловский И.С., Зинченко А.И.	114
Получение флуоресцентно меченных фитопатогенных бактерий <i>Pseudomonas corrugata</i> для их детекции <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> Шавела Ю.В., Буйницкая С.В., Валентович Л.Н.	116
Медико-биологические эффекты водорастворимых экстрактов высших грибов Шамцян М.М., Соколова С.В.	118
Создание библиотеки генов <i>Cryptococcus flavescens</i> – продуцента β-галактозидазы Шляхотко Е.А., Кулиш С.А., Сапунова Л.И.	120
Секция 3 Биотехнологии для сельского хозяйства	122
Выделение и идентификация кератиндеградирующих бактерий Актаева С.А., Балтин К.К., Хасенов Б.Б.	123
Анализ ферментативной активности дрожжевых грибов рода <i>Saccharomyces</i> Баневская К.Г., Кулиш С.А., Сапунова Л.И.	124
ПЦР-диагностика грибов – возбудителей болезней огурца и томата, выращиваемых в защищенном грунте Барейко А.А., Пилипчук Т.А., Купцов В.Н., Валентович Л.Н., Сидоренко А.В., Титок М.А., Коломиец Э.И.	127
Влияние дробной подачи субстрата на эффективность культивирования бактерий <i>Bacillus velezensis</i> БИМ В-439Д Бережная А.В., Коломиец Э.И.	129
Термошок как фактор повышения продуктивности периодического процесса получения биопестицида Бетапротектин Бережная А.В., Романовская Т.В., Коломиец Э.И.	131
Идентификация гетероферментативных бактерий рода <i>Lactobacillus</i> с помощью видоспецифичной ПЦР Бирюк Е.Н., Тарашкевич Ю.С., Фурик Н.Н.	133

Стимуляция роста растений ячменя под влиянием штамма микромицета <i>Talaromyces</i> sp. T 14 Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Игнатова Л.В.	136
Молекулярно-генетический анализ агробиотехнологически значимых признаков штамма <i>Ochrobactrum cytisi</i> IPA7.2 Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В.	138
Подбор питательной среды для культивирования бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-268 и наработки фага PcN1 Волотович О.А., Пилипчук Т.А., Гирилович Н.И., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.	140
Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальному препарату «Рецеф 4,0» Гласкович А.А., Одинцов Д.В., Нестеров А.Г.	143
Симбиотическое действие биологически активных препаратов «Апистимулин-А» и пробиотика «Биофлор» на продуктивность и микробиоценоз желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров Гласкович М.А.	145
Разработка и внедрение в ветеринарную практику различных композиционных форм препаратов с продуктами пчеловодства Гласкович С.А.	147
Отработка технологии получения пробиотической кормовой добавки для пчел Апипро Гапонова И.И., Макаревич О.В., Болотник Е.В., Романова Л.В., Щетко В.А.	149
Обоснование параметров применения закваски замороженной концентрированной поливидовой термофильных микроорганизмов для сыров с чеддеризацией и плавлением сырной массы Головач О.С., Бабицкая М.А., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.	151
Влияние углеводов на способность к синтезу экзополисахаридов у штаммов термофильного стрептококка и болгарской палочки Головач О.С., Бабицкая М.А., Иванько М.В., Жабанос Н.К., Смоляк Т.М., Фурик Н.Н.	153
Эффективность использования пробиотической кормовой добавки для пушных зверей Головнева Н.А., Романова Л.В., Андрусевич А.С., Мистейко М.М., Стрельчяня И.И. .	155
Поиск значимых компонентов питательной среды по плану Плаккета-Бермана для культивирования <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>aizawai</i> Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Чешкова А.Ф.	158
Производство бактериальной фитазы с помощью периодической ферментации с подпиткой Кириллов С.О., Силаев Д.В., Ли П.К., Хасенов Б.Б., Раманкулов Е.М., Муканов К.К., Абельденов С.К.	160
Картофельный сок – субстрат для микробиологического синтеза протеина Кудряшов В.Л.	162
Выделение и характеристика микромицетов с гербицидной активностью в отношении одуванчика лекарственного Купцов В.Н., Мандрик-Литвинкович М.Н., Волоханович А.А., Коломиец Э.И.	165
Влияние бензоата натрия и пиросульфита натрия на развитие консорциумов молочнокислых бактерий Липень В.А., Прищепа Л.И., Василенко С.Л., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.	167

Оценка перспективности использования изолятов <i>Bacillus</i> sp. в качестве основы пробиотической кормовой добавки Лобан Е.Н., Проскурнина И.А., Романовская Т.В., Коломиец Э.И.	170
Биоконтроль фузариозной корневой гнили ризосферными штаммами рода <i>Pseudomonas</i> Масленикова С.Н.	172
Особенности развития <i>Trifolium pratense</i> L. с арбускулярными микоризными грибами на луговых фитоценозах при демутации Мазурек Б.Г., Жебрак И.С.	174
Выделение и характеристика бактериофагов <i>Pseudomonas syringae</i> Орловская П.И., Гирилович Н.И., Пилипчук Т.А., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.	176
Скрининг спорообразующих бактерий, перспективных для создания кормовой добавки на основе крахмалсодержащего сырья Проскурнина И.А., Сверчкова Н.В., Романовская Т.В., Кантор К.В., Коломиец Э.И., Михалюк А.Н.	178
Эффективность выделения штаммов <i>Lactobacillus</i> ssp. из пресноводной и морской рыбы Романович Н.С., Кравченко Н.С., Крученок Т.В., Василенко С.Л., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.	180
Изучение влияния ЭМ-ассоциации на микрофлору деградированных сельскохозяйственных почв Смирнова И.Э., Саданов А.К.	182
Изучение влияния биопрепарата «Фосфобацирин» в полевых условиях Смирнова И.Э., Саданов А.К., Шорабаев Е.Ж.	185
Биотехнологический подход оптимизации процесса развития отдельных представителей микроценоза кишечника с использованием пчелиного подмора Тимошко М.А., Струтинский Ф.А., Богдан В.К., Велчу А.И., Мантоптин А., Строкова В.Н., Чокинэ М.	187
Изменение активной кислотности молока при ферментации замороженными концентрированными заквасками на различных сроках хранения Титова О.А., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н., Савельева Т.А.	189
Феромониторинг совки озимой — основа экономического и экологического совершенствования системы мероприятий защиты озимых зерновых культур Трепашко Л.И., Бойко С.В.	191
Выделение, идентификация и скрининг пробиотических бактерий, выделенных из слепой кишки <i>Gallus domesticus</i> Тургимбаева А.М., Кириллов С.О., Абуталипов Д.Б., Еримханқызы Г., Мурат А.У., Мусахметов А.С., Хасенов Б.Б., Абельденов С.К.	193
Оптимизация параметров культивирования новых штаммов бактерий рода <i>Bacillus</i> – основы биофунгицидов для защиты растений Хомяк А.И., Асатурова А.М., Сидорова Т.М.	195
Консорциум микроорганизмов – основа комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур Шмыга Е.Ю., Мандрик-Литвинкович М.Н., Купцов В.Н., Сидоренко А.В., Коломиец Э.И.	197

Влияние лиофилизации на жизнеспособность дрожжевых грибов <i>Cryptococcus flavescens</i> и <i>Rhodotorula species</i> , выращенных в средах различного состава Щетко В.А., Гапонова И.И., Кулиш С.А., Сапунова Л.И., Романова Л.В., Ерхова Л.В., Макаревич О.В.	199
Секция 4 Биотехнологии для медицины и промышленности	201
Production and antimicrobial properties of peptides derived from recombinant human lactoferrin-containing whey protein concentrate of transgenic goat origin Hubchuk K., Kastsianevich A.	202
Production and antimicrobial properties of peptides derived from recombinant human lactoferrin of transgenic goat origin Kastsianevich A., Hubchuk K.	204
Development of new approaches for waste-less simultaneous production of bioethanol and other valuable products from colza straw Rozenfelde L., Vedernikov N., Puke M., Kruma I., Khroustalyova G., Zala D., Rapoport A.	206
Испытания стойкости финишных покрытий системы утепления фасадов «Сапарол» на основе минеральной ваты к воздействию плесневых грибов Арашкова А.А., Тригубович А.М., Кособуцкая О.Н., Пирогов К.В., Летунович Е.А.	207
Эффективность полиенового антибиотика розеофунгина в отношении возбудителей кандидозного вульвовагинита Балгимбаева А.С., Ибрагимова Л.Н., Треножникова Л.П., Турлыбаева З.Ж., Султанова А.Ж., Тугелбай Г.Е., Галимбаева Р.Ш., Есіркепулы М.	209
Использование бактериальной фосфолипазы D для синтеза липонуклеотидов Биричевская Л.Л., Винтер М.А., Сивец Г.Г., Михайлопуло И.А., Зинченко А.И.	211
Получение 5'-фосфатидил-2-хлор-2'-фтораденинарабинозида с использованием бактериальной фосфолипазы D Биричевская Л.Л., Сивец Г.Г., Артемьева Ю.Н., Михайлопуло И.А., Зинченко А.И.	213
Биотехнологический аспект зависимости уровня стрептококков в кишечнике от состояния здоровья организма Богдан В.К., Тимошко М.А., Велчу А.И.	216
Создание генетической конструкции для получения штамма-продуцента пурииннуклеозидфосфорилазы, слитой с аннексином-A5 Булатовский А.Б., Казловский И.С., Зинченко А.И.	218
Ферментация как перспективный способ технологической обработки коровьего молочива Головач Т.Н., Асафов В.А., Харитонов В.Д., Танькова Н.Л., Романович Р.В., Курченко В.П.	220
Перспективы использования рекомбинантных ферментов микроорганизмов и модифицированных компонентов нуклеиновых кислот для терапии рака Зинченко А.И.	223
Влияние микроудобрений на антирадикальную активность экстрактов ксилотрофных базидиомицетов Коваленко С.А., Бордок И.В., Ковзунова О.В.	225
Изменение поверхностного слоя полиамидных волокон бактериями-деструкторами Комаровская Я.В., Козьячая Т.И., Тарасюк О.А., Юхневич Г.Г., Бурдь В.Н.	228

Сравнительный анализ тест-систем для выделения нуклеиновых кислот из мокроты Костюк С.А., Полуян О.С., Руденкова Т.В., Глинкина Т.В., Смирский В.В.	230
Преимущества использования препарата бактерий <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> для улучшения технологических показателей белорусских глин в производственных условиях Маркевич Р.М., Якимович Л.В.	232
Оценка микробиологических показателей хлеба на основе продукта ферментированного горохового безглютенового Нелюбина Е.В., Урбанчик Е.Н., Сапунова Л.И., Каминская О.С., Тамкович И.О., Шляхотко Е.А.	234
Искусственное выращивание лекарственного гриба <i>Lentus edodes</i> на разных средах Пушкарская О.В., Жебрак И.С.	236
Технологические аспекты биосинтеза полиенового антибиотика розеофунгина в ферментаторе Саданов А.К., Треножникова Л.П., Балгимбаева А.С., Березин В.Э., Кулмагамбетов И.Р.	238
Разработка биосенсоров для детекции глюкозы на основе наноструктурированного графита Семашко Т.В., Жуковская Л.А., Демешко О.Д., Михаленок Е.В., Бельская А.И., Бусла А.П.	240
Антимикробное действие дезинфицирующих препаратов на суспендированные клетки и био пленки Сикор А.Н., Юхневич Г.Г.	242
Выделение, очистка и характеристика молокосвертывающих протеиназ из культуральной жидкости <i>Pleurotus ostreatus</i> Сакович В.В., Жерносеков Д.Д.	244
Секция 5 Природоохранные биотехнологии	246
Выделение и скрининг микроорганизмов-деструкторов ксилы и толуола Алешкевич И.И., Петрова Г.М., Глушень Е.М.	247
Изучение термотолерантных микроорганизмов, выделенных из почв Западного Казахстана Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А.	249
Выделение галотолерантных бактерий для стимуляции роста растений в условиях засоления почвы Евенкова-Чернецова К.И., Алещенкова З.М., Ананьева И.Н., Сафронова Г.В., Наумович Н.И.	251
Гидроксिलированные полихлорированные бифенилы – как источник углерода для штамма <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> КТ112-7 Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г.	253
Биосинтез наночастиц серебра различными микроорганизмами Зайнидинова Л.И., Куканова С.И., Жураева Р.Н., Лобанова И.В., Вохинова Н.	255
Бактериальная деградация трибенурон-метила – гербицида класса сульфонилмочевины Крючкова Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В.	257

Ускорение деструкции нефти различных месторождений с помощью микробного препарата Родобел-ТН Клишевич Н.Г., Алешенкова З.М.	259
Скрининг микроорганизмов-деструкторов органических веществ с высокой ксеро- и термоустойчивостью, перспективных для очистки коммунально-бытовых сточных вод Петрова Г.М., Кельник Д.И., Алешкевич И.И., Чирикова М.С., Глушень Е.М.	261
Выявление потенциально коррозионных микроорганизмов из проб воды Финского залива Петрова М.С., Няникова Г.Г., Царовцева И.М.	263
Лигнинолитические грибы для экологических биотехнологий: теоретические и практические аспекты Позднякова Н.Н., Баландина С.А., Бондаренкова А.Д., Турковская О.В.	265
Деградация фенола бактериями <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> 5Ap Соляникова И.П., Чернявская М.И., Титок М.А.	267
Адсорбционная иммобилизация микроорганизмов-деструкторов формальдегида Степанян Р.А., Глушень Е.М.	269
Выделение и изучение микроорганизмов-деструкторов о-ксилола Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н.	272
Скрининг микроорганизмов-деструкторов наиболее распространенных растворителей лакокрасочного производства Чирикова М.С., Петрова Г.М., Глушень Е.М.	274
Развитие нитчатых микроорганизмов в аэротенках городских очистных сооружений канализации Юхневич Г.Г., Мурина Д.А.	276
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	278

Секция 1

**Физиология, биохимия и генетика
микроорганизмов**

The study of molecular-genetic characteristics of isolates of lactic acid bacteria in fish

Abisheva G.Zh., Sarmurzina Z.S., Bissenova G.N., Abitaeva G.K., Urazova M.S., Tekebaeva Zh.B., Abilchadirov A.S., Abzhalelov A.B.

*RSE "Republican collection of microorganisms", Astana, Kazakhstan,
e-mail: g.galiya@list.ru*

Modern biotechnology groups of microorganisms. The objects of the study were collection cultures is inextricably linked with the use of new approaches to the selection of natural microorganisms when creating bacterial preparations. Fundamental achievements and practical studies of recent decades in microbiology, genetics and molecular biology made it possible to study the genetic diversity of microorganisms. With the development of genetic taxonomy, a variety of methods used to study the bacterial genome and the accumulation of experimental data, allowed to solve many controversial issues of taxonomy of specific and isolates of lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) isolated from water, sludge of a pond and fish intestines.

In this regard, the purpose of this work was to study the molecular genetics properties of isolated isolates of lactic acid bacteria in fish.

The molecular genetics properties of 23 active isolates were assessed by isolating DNA, obtaining a PCR product, followed by sequencing and analyzing the nucleotide sequences in the GenBank-BLAST program to determine the genus and species identification of microorganisms. The nucleotide sequences were analyzed and combined into a common sequence in the SeqMan software. As a result, molecular genetics identification of 23 isolates of lactic acid bacteria isolated from the intestines of fish inhabiting the Nura reservoir was carried out. Selected 3 active isolates of lactic acid bacteria with high antagonistic and bacteriocinogenic activity were brought to the form: 10 / 9K – *Pediococcus pentosaceus*, 9C – *Lactobacillus paracasei*, 24C – *Lactobacillus fermentum*. A biological preparation was created on the basis of 3 strains (24C, 10 / 9K, 9C): *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*. Conducted research in the laboratory confirmed the effectiveness of a biological product in the experimental group compared with the control group, which is reflected in a decrease in the total mortality of fish.

Характеристика бактерий рода *Bacillus* - перспективных агентов биологического контроля патогенов растений

Белявцева К.В.^{1,2}, Шмыга Е.Ю.¹, Сидоренко А.В.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kseniyabelyavtseva@protonmail.com

²Биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск,
Беларусь

Биологический контроль возбудителей болезней сельскохозяйственных растений с использованием микроорганизмов — экологически безопасная и эффективная альтернатива широко применяемым химическим пестицидам. Среди агентов биологического контроля наиболее перспективными считаются бактерии рода *Bacillus*, которые продуцируют широкий спектр биологически активных веществ (антибиотики, ферменты, фитогормоны, органические кислоты, др.) с антимикробным и ростостимулирующим действием [1, 2].

Цель данной работы — характеристика бактерий рода *Bacillus*, перспективных для биологической защиты растений от болезней.

Объектами исследования служили штаммы бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* 1, *B. amyloliquefaciens* 59, *Bacillus mojavensis* 61, *Bacillus subtilis* 21с, *B. subtilis* 4(2), выделенные из почвы.

Видовая принадлежность исследуемых штаммов определена на основании данных MALDI TOF масс-спектрометрического анализа белковых профилей и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Выполнено генотипирование штаммов *B. amyloliquefaciens* 1, *B. amyloliquefaciens* 59, *B. mojavensis* 61, *B. subtilis* 21с, *B. subtilis* 4(2) с помощью RAPD-ПЦР с праймерами 1254 и M13. Для каждого из тестируемых штаммов получены штаммоспецифичные ПЦР-фингерпринты, которые могут применяться для генетической паспортизации и контроля аутентичности при использовании в производстве.

Показано, что штаммы *B. amyloliquefaciens* 1, *B. amyloliquefaciens* 59, *B. mojavensis* 61, *B. subtilis* 21с, *B. subtilis* 4(2) проявляют антагонистическую активность в отношении широкого спектра бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных растений. Зона задержки роста тест-культур фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* 2.16, 25.1 составляет 13-33 мм; *Pseudomonas syringae* БИМ В-267, БИМ В-268 — 28-35 мм; *Pseudomonas corrugata* — 15-32 мм; фитопатогенных грибов *Alternaria tenuis* БИМ F-460 — 19-24 мм; *Colletotrichum lupini* БИМ F-382 — 15-31 мм; *Fusarium oxysporum* БИМ F-381 — 18-28 мм. Среди исследуемых штаммов наиболее

выраженной антифунгальной активностью обладал штамм *B. amyloliquefaciens* 1, антибактериальной активностью – штамм *B. subtilis* 4(2).

С помощью ПЦР-анализа в геномах штаммов *B. amyloliquefaciens* 1, *B. amyloliquefaciens* 59, *B. mojavensis* 61, *B. subtilis* 21с, *B. subtilis* 4(2) выявлен ряд генов, кодирующих синтез антимикробных пептидов: *bae* (бациллин), *baci* (бациллибактин), *bac* (бацилломицин), *dif* (диффицидин / оксидиффицидин), *fen* (фенгицин), *mac* (макролактин), *srf* (сурфактин). Вероятно, способность исследуемых штаммов бацилл к синтезу широкого спектра антимикробных пептидов и обуславливает их высокую антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов и бактерий. Различия в уровне антагонизма связаны с качественными и количественными отличиями в продукции антимикробных метаболитов.

Литература

1. Shafi, J. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review / J. Shafi, H. Tian, M. Ji // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2017. – № 3 (31). – P. 446–459.
2. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus* – Nonmedical / R.A. Slepecky, H.E. Hemphill // *Prokaryotes*. Vol. 4. – Springer, 2006. – P. 530–562.

Характеристика бактериофагов Hena1 и Hena2 специфичных в отношении *Erwinia amylovora*

Бесараб Н.В.¹, Лагоненко А.Л.¹, Евтушенков А.Н.¹, Моховиков М.А.², Мильчанин О.В.²

¹Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск, Беларусь, электронный адрес: natal-vasilna@rambler.ru

²Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

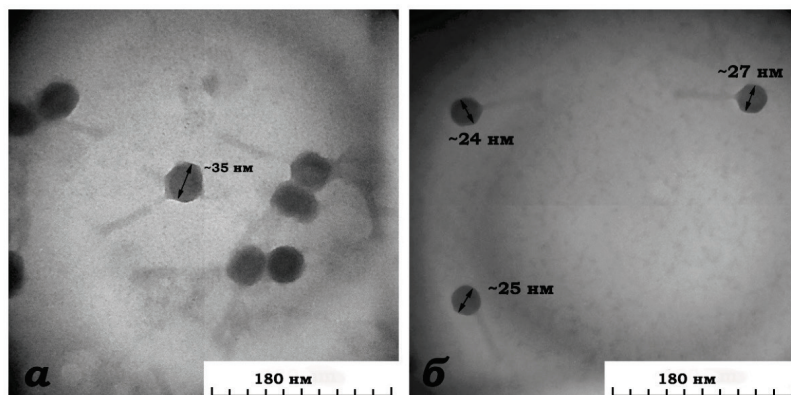
Бактерия *E. amylovora* является карантинным объектом для стран, входящих в список ЕРРО А2 (список организмов на территории Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР)) и А1 (список организмов, отсутствующих на территории ЕОКЗР), в том числе и для Беларуси. Заболевание, вызываемое бактерией *E. amylovora*, бактериальный ожог, при благоприятных условиях для развития патогена является вредоносным для таких важных в плодоводстве культур, как яблони и груши [1]. В настоящее время ведутся исследования по оценке эффективности применения препаратов на основе бактериофагов для контроля возбудителя бактериального ожога.

Целью данной работы являлось изучение потенциальных агентов борьбы с бактериальным ожогом – специфичных бактериофагов. В задачи входила характеристика морфологических, физиологических и молекулярно-генетических свойств бактериофагов.

На территории г. Новогрудка (Гродненская область) из образцов почвы под грушами и яблонями частного подворья выделены бактериофаги Hena1 и Hena2. После проведения серии пассажей на бактериях *E. amylovora* 1/79Sm получены чистые линии бактериофагов и изучены их морфологические, физиологические и молекулярно-генетические свойства.

Первичная характеристика бактериофагов с помощью электронной микроскопии позволила отнести их к хвостатым бактериофагам семейства *Myoviridae*. Так, бактериофаги Hena1 и Hena2 имели хвостовые отростки и икосаэдрические головки размером, в среднем составляющем 35 нм и 26 нм, соответственно (рисунок).

Изучено влияние присутствия в питательной среде органических добавок, 2,5% сорбитола, 0,4% глицина или 2,5% глюкозы, на эффективность размножения бактериофагов. Установлены необходимые добавки для повышения титра бактериофага Hena2 при размножении на штамме бактерии *E. amylovora* 1/79Sm – 2,5% сорбитол или глюкоза.



а) Hena1; б) Hena2

Рисунок – Микрофотография частиц бактериофагов, полученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi H-800

Фрагменты геномов фагов Hena1 и Hena2 были встроены в вектор pUC18 по сайту EcoRI и клонированы в клетках *E. coli* XL-1 Blue и частично секвенированы. Нуклеотидный BLAST (NCBI) фрагмента генома Hena1 выявил в базе GenBank гомологичные последовательности бактериофагов *Klebsiella* vB_KpnM_BIS47, *Raoultella* Ro1, *Proteus* Mydo, *Klebsiella* vB_KpnM_KB57, *Salmonella* PVP-SE1, *Escherichia* 4MG, *Cronobacter* vB_CsaM_GAP31. Нуклеотидный BLAST (NCBI) последовательности фрагмента генома Hena2 выявил в базе GenBank гомологичные участки геномов различных бактериофагов. Наибольший процент идентичности имела последовательность бактериофага *Erwinia* vB_EamM-M7. Анализ фрагментов геномов исследуемых бактериофагов позволил предположить их систематическое положение. Hena1 предварительно отнесен к подсемейству *Vequintavirinae*, Hena2 – подсемейству *Ounavirinae*, роду *Ea214virus*.

Литература

1. *Erwinia amylovora* (fireblight) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908>. – Дата доступа: 10.04.2019.

Устойчивость бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap к ионам тяжелых металлов

Букляревич А.А.¹, Охремчук А.Э.², Кутюн Е.Л.¹, Чернявская М.И.¹,
Валентович Л.Н.^{1,2}, Титок М.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Одним из быстро развивающихся направлений экологической биотехнологии является использование микроорганизмов-деструкторов для очистки окружающей среды от загрязнений природного и антропогенного происхождения. В этом плане определенный интерес представляют бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, утилизирующие широкий спектр углеводов, многие из которых токсичны, мутагенны и канцерогенны для живых организмов [1]. Поскольку попадание в окружающую среду углеводов, как правило, сопровождается загрязнением тяжелыми металлами, бактерий-деструкторы, используемые для биоремедиации, должны обладать эффективными системами устойчивости к ним.

Целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих устойчивость бактерий – деструкторов углеводов *R. pyridinivorans* 5Ap к ионам тяжелых металлов, а также изучение их способности расти в присутствии ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} .

В результате анализа генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap были обнаружены генетические детерминанты, плазмидного (7 открытых рамок считывания) и хромосомного (4 открытые рамки считывания) происхождения, кодирующие белки эффлюкс-систем, обеспечивающих активное выведение из клетки ионов кадмия, свинца, цинка и ртути. Установлено, что аминокислотные последовательности этих белков (состоят из 652–913 а.о.) не идентичны, и проявляют различную степень идентичности по отношению друг к другу (36,2–97,2%). Данные белки относятся к Р-типу АТФаз, о чем свидетельствует присутствие в их составе консервативной аминокислотной последовательности DK[TS]GT[LIVM][TS]. Присутствие данного функционального домена в составе белковой молекулы определяет ее способность при гидролизе АТФ обратимо фосфорилировать аспарагиновую кислоту, что приводит к конформационным изменениям и транспорту ионов [2]. Другая функционально значимая аминокислотная последовательность [CST][PC][CHP], входящая в их состав, представляет собой сайт связывания ионов тяжелых металлов [3-4]. На основании множественного выравнивания исследованные полипептиды были

разделены на 3 функциональные группы. В первую группу включены белки, синтез которых определяется генами, локализованными на фрагментах NODE_54 (координаты 1005–3266 п.н.), NODE_41 (координаты 6962–8920 п.н.), NODE_28, (координаты 35 240–37 204 п.н.) и NODE_25 (координаты 1 122–3 080 п.н.), а также одним хромосомным геном (координаты 3 662 591-3 664 852 п.н.) [5]. У данных белков функциональный домен DKTGTLT, определяющий функцию фосфорилирования, локализован между 338 и 344 аминокислотными остатками, а ион-связывающий домен SPC между 294 и 296 аминокислотными остатками. Вторая группа представлена белками, синтез которых определяется генами, локализованными в пределах фрагментов NODE_28 (координаты 47 877–50 024 п.н.) и NODE_22 (координаты 4 815–7 040 п.н.), а также в хромосоме (координаты 4 268 109-4 270 169 п.н.). В составе данных полипептидов между 415 и 421 а.о. обнаружен функциональный домен DKTGTLT, обеспечивающий функцию фосфорилирования, а между 373 и 375 а.о. локализуется СРН-домен, отвечающий за связывание ионов тяжелых металлов. Третья группа представлена белком, синтез которого определяется геном, локализованным на фрагменте NODE_61 (координаты 287–2 290 п.н.), и белком, кодируемым хромосомным геном (координаты 48 736-51 018 п.н.). В состав этих полипептидов между 315 и 321 а.о. входит домен DKTGTVT, определяющий фосфорилирование, а между 373 и 375 а.о. локализован домен СРС.

Следует отметить, что присутствие в клетке целого ряда белков, обладающих сходной функциональной активностью, как правило, является результатом дупликации генов с последующей дивергенцией, обеспечивающей их специфичность. Такая стратегия является весьма характерной для всех живых организмов в целом, и бактерии рода *Rhodococcus* не являются исключением [6].

Кроме этого, в хромосоме выявлены гены, кодирующие белки, обеспечивающие устойчивость к ионам меди, магния, кобальта и др.

Анализ способности бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap расти в присутствии ионов тяжелых металлов позволил установить, что они активно размножаются на средах, содержащих Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ или Fe^{2+} в концентрации 2; 1; 5; 1; 14; 0,1 и 4 ммоль/л соответственно.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что присутствие ионов тяжелых металлов, как правило, попадающих в окружающую среду вместе с углеводородами, не должно оказывать влияние на деградативные свойства бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Литература

1. Биоразнообразие почвенных углеродоокисляющих бактерий из разных климатических зон / М.И. Чернявская [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 5. – С. 581-594.
2. Kühlbrandt, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases / W. Kühlbrandt // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 282-295.
3. Mana-Capelli, S. Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain. / S. Mana-Capelli, A.K. Mandal, J.M. Argüello // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 42. – P. 40534-40541.
4. Argüello, J.M. Heavy metal transport CPx-ATPases from the thermophile *Archaeoglobus fulgidus* / J.M. Argüello, A.K. Mandal, S. Mana-Capelli // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2003. – Vol. 986 – P. 212-218.
5. Анализ генома бактерий - деструкторов нефти *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html – Дата доступа: 25.02.2019.
6. Klatte, S. *Rhodococcus opacus* sp. nov., an unusual nutritionally versatile *Rhodococcus* species / S. Klatte, R.M. Kroppenstedt, F.A. Rainey // Syst. Appl. Microbiol. – 1994. – Vol. 17, № 3. – P. 355-360.

Исследование липолитической активности микроорганизмов, выделенных из морских звезд и ежей, собранных во время 7 Белорусской антарктической экспедиции

Герловский Д.О.^{1,2}, Литвинко Н.М.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: denis2904-83@mail.ru

²Биологический факультет, Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Фосфолиполитическая активность, в результате которой разрушаются мембраны, используется микроорганизмами для внедрения в организм-хозяина и распространения инфекции. Ввиду физиологических особенностей антарктических микроорганизмов, фосфолипазная активность таких штаммов представляет собой особый научный интерес. 17 изолятов бактерий, выделенных из морских звезд и ежей, собранных во время 7 Белорусской антарктической экспедиции были любезно предоставлены Мяминым В.Е., кафедра микробиологии БГУ, для исследования фосфатацилгидролазной активности.

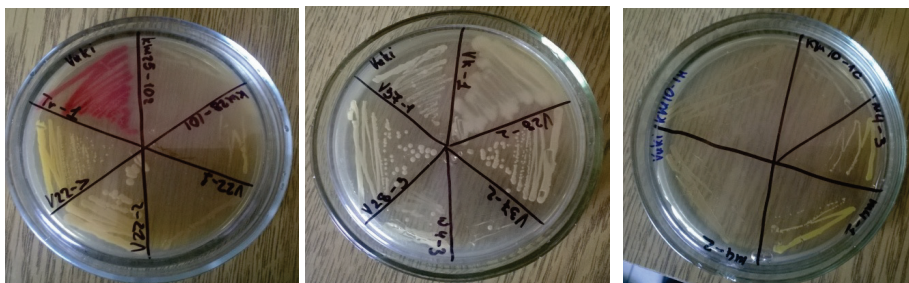


Рисунок 1 – Коллекция изолятов бактерий, выделенных из морских звезд и ежей

Первичное изучение ферментативной активности данных штаммов показало, что 13 изолятов продуцируют каталазу и 7 способны к продукции оксидазы. У 6 штаммов была обнаружена хитиназная активность.

Ранее нами была показана фосфолиполитическая активность культуральных жидкостей штаммов ряда микроорганизмов из коллекции кафедры микробиологии Белгосуниверситета: *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* B, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 6538, *Staphylococcus aprophyticus* и др. Все изученные штаммы микроорганизмов, для которых была зафиксирована фосфолиполитическая активность, проявили гемолитическую активность, т.е. способность разрушать фосфолипиды в составе клеточных мембран эритроцитов.

В дополнение к проведённым исследованиям ферментативной активности бактерий, выделенных из морских звезд и ежей, нами было предположено, что в совокупности с хитиназной активностью данные штаммы должны проявлять фосфолипазную активность, используя липолитический фермент в качестве дополнительного фактора вирулентности. В соответствии с ранее полученными нами результатами [1,2], а так же литературными данными [3-5], впервые установлена выраженная фосфолипазная активность микроорганизмов V37-1, V22-3 и V28-2 по отношению к липиду в составе липопротеинового комплекса яичного желтка (рис. 2): диаметр зоны просветления вокруг места высева на желточном агаре 192,325 мм², 169,56 мм², 105,975 мм² соответственно.



Рисунок 2 –Фосфолипазная активность штамма V37-1

Установлено, что фосфолипазная активность штаммов микроорганизмов V37-1, V22-3 и V28-2, сохраняется по отношению к субстрату в составе других форм надмолекулярной организации, в том числе в составе смешанных мицелл фосфолипид-детергент.

Полученные результаты подтверждаются данными литературы об использовании микроорганизмами фосфолипаз в качестве факторов вирулентности: *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus thuringiensis*, *Rickettsia conorii* и многие другие патогенные микроорганизмы обладают несколькими фосфолипазными активностями: PLA₁, PLA₂, PLC, PLD, действие которых связано с деградацией фосфолипидов клеточных мембран организма хозяина [3, 4, 5] и убедительно свидетельствуют, что секреторные фосфолипазы могут использоваться микроорганизмами в качестве факторов вирулентности и (или) в качестве ферментов для усвоения питательных веществ [1, 2].

Литература

1. Исследование фосфолиполитической активности культуральной жидкости микроорганизмов, Ю.Ш. Ермакович, Н.М. Литвинко, Д.О. Герловский, Тез докл. X Межд. научной конфер. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, 5-9 июня 2017 г. – Минск, - с.49-51.

2. Фосфолипазы микроорганизмов – важнейшие биологически активные соединения белковой природы Ю.Ш. Ермакович, Н.М. Литвинко, Д.О. Герловский, Тематический сборник научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты».- Мн: «Беларуская навука», 2017. – Минск, - С.78-86.
3. Istivan, T.S. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis / T.S. Istivan, P.J. Coloe // *J. Microbiology*. – 2006. – Vol. 152, № 5. – P. 1263-1274.
4. Schmiel, D. H. Bacterial phospholipases and pathogenesis / D.H. Schmiel, V.L. Miller // *J. Microbes and Infection*. – 1999. – Vol. 1. – P. 1103-1112.
5. Snijder, H.J. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase / H.J. Snijder, B.W. Dijkstra // *J. Biochim. Biophys. Acta*. – 2000. – Vol. 1488, № 1-2. – P. 91-101.

Исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств мезофильных молочнокислых бактерий, выделенных из природных источников

Головнева Н.А., Рябая Н.Е., Сафонова М.Е., Морозова А.Н., Щетко В.А., Самарцев А.А., Буко А.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by*

Незаменимым компонентом производства ферментированных молочных продуктов являются бактериальные закваски, основу которых составляют молочнокислые бактерии родов *Lactococcus*, а также *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*. Качество производимых кисломолочных продуктов и сыров непосредственно зависит от видового и штаммового состава, технологии получения, условий культивирования и селекции микроорганизмов заквасок [1].

Для расширения ассортимента выпускаемой молочной продукции, улучшения ее качества, санитарно-гигиенических показателей и органолептических свойств требуются закваски с различными производственными характеристиками: быстро- и медленноквашивающие, ароматобразующие, с пробиотическими свойствами, ограниченным постокислением, утилизирующие галактозу, продуцирующие витамины, ферменты и др. Помимо этого для поддержания заквасок в активном состоянии необходимо постоянно производить замену заквасочных штаммов, что связано с изменением их биологических свойств при длительном культивировании и хранении.

Выделение и скрининг микроорганизмов из природных источников является наиболее эффективным средством получения полезных и генетически устойчивых штаммов бактерий для промышленного использования [2]. В связи с этим актуальны исследования, направленные на выделение чистых культур молочнокислых бактерий и характеристику их свойств.

Из образцов сырого коровьего и козьего молока, сливочного масла и творога, а также квашеных и свежих овощей и фруктов, изолированы бактерии, соответствующие по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам молочнокислым бактериям. По морфологии отобранные изоляты представляют собой округлые или овальные клетки размером от 0,8 до 1,6 мкм, соединенные попарно или в цепочках – коротких или средних, иногда изогнутых. Из них 95 % являются мезофилами. Исследованы культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства выделенных молочнокислых бактерий. Максимальная активность кислотообразования к 24 час роста при 30°C достигала 125 - 130⁰Т, при 37°C – 110 - 120⁰Т. При культивировании в молоке

около 60% бактерий образовывали сгусток к 8 час роста, 70% – к 9 час, к 12 час у 100% культур наблюдалось образование сгустка, преимущественно равномерного, без отделения сыворотки (рис. 1).

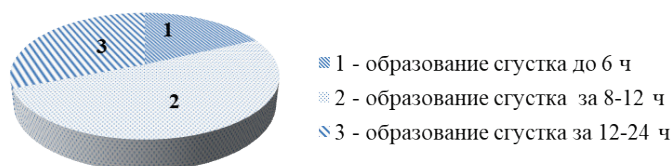


Рисунок 1 – Характеристика выделенных культур молочнокислых бактерий по активности образования сгустка

Энергия кислотообразования через 24 ч культивирования бактерий варьировала от 60 °Т до 120 °Т, предельное накопление кислот через 5 суток роста – от 60 °Т до 140 °Т, значение рН – от 4,8 до 4,02. Исследование казеинолитической активности показало, что у 33% из выделенных культур активность не превышает 200 ед., более 58% имеют активность от 300 до 400 ед., 8% – более 400 ед. (рис. 2)

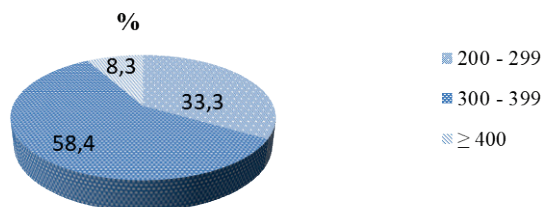


Рисунок 2 – Распределение выделенных культур молочнокислых бактерий по уровню протеолитической активности

Исследование штаммоспецифичных особенностей выделенных культур молочнокислых бактерий важно для обоснования их биологических и технологических преимуществ при дальнейшем использовании в составе заквасок.

Литература

1. Parente, E. Starter cultures: general aspects / E. Parente, T. M. Cogan // Cheese: chemistry, physics and microbiology / In P. O. Fox (ed.). – 3rd ed. Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2004. – P. 123–147.
2. Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk / Fernandez E. [et al.] // Appl. and Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, No. 15. – P. 5324–5335.

Влияние плазмиды pBS72 на жизнеспособность бактерий *Bacillus subtilis* в стрессовых условиях среды

Гуринович А.С., Титок М.А.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by*

Плазмиды не являются обязательными структурами бактерий, но, в ряде случаев, могут обеспечивать селективное преимущество содержащим их микроорганизмам в изменяющихся условиях внешней среды. В этом плане определенный интерес представляет плазида pBS72 бактерий *B. subtilis*, которая выявляется в клетках бактерий, выделенных из различных природных источников [1, 2]. Данный внехромосомный генетический элемент размером более 100 т.п.н. относится к разряду криптических, поскольку не содержит генетических маркеров, обеспечивающих явно выраженные фенотипические признаки (гены антибиотикорезистентности, биodeградации, синтеза токсинов). В то же время в составе её генома выявлены гены, кодирующие синтез регуляторных Rap-белков, метилаз и рестриктаз, белков репарации UmuC и UmuD, теплового шока Hsp40, гистидинкиназ и ряда других полипептидов, что предполагает влияние плазмиды pBS72 на процессы жизнедеятельности бактерий, в клетках которых она обнаруживается. Кроме того, данный внехромосомный генетический элемент обладает эффективной системой конъюгации и, следовательно, обеспечивает горизонтальный перенос генов [3].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния плазмиды pBS72 на жизнеспособность бактерий *B. subtilis* в стрессовых условиях среды.

Для анализа использовали природный штамм *B. subtilis* 19, содержащий плазмиду pBS72, и коллекционный штамм *B. subtilis* 168, а также их производные, сконструированные с использованием молекулярно-генетических методов. Это штамм *B. subtilis* 19, из клеток которого плазида pBS72 была элиминирована путем внесения ее минимизированного варианта, с последующим отбором вариантов, спонтанно утративших мини-репликон в результате культивирования в неселективных условиях. Кроме того был получен штамм *B. subtilis* 168, содержащий плазмиду pBS72, путем конъюгационного переноса данного внехромосомного генетического элемента, в межгенную область которого введен ген устойчивости к эритромицину. Наличие изогенных штаммов, содержащих и не содержащих плазмиду pBS72 позволило определить вклад плазмидных и хромосомных детерминант в способность бактерий размножаться в стрессовых условиях среды. Для этого исследуемые бактерии в экспоненциальной фазе роста культивировали в присутствии 13% NaCl, а также в среде с низким и высоким значением pH

(рН 4,5 и рН 11). В результате было установлено, что через 4 часа культивирования в среде, содержащей 13% NaCl, количество жизнеспособных клеток у бесплазмидных вариантов в сравнении с плазмидсодержащими бактериями *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* 19 уменьшалось в 13 и 4,5 раза соответственно. Отсутствие плазмиды также приводило к снижению жизнеспособности бактерий при их выращивании в среде с низким и высоким значением рН. В частности, жизнеспособность бесплазмидных бактерий *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* 19 через 3 часа культивирования при высокой концентрации ионов водорода (рН 4,5) снижалась в 4,7 и 1,7 раза быстрее. При низкой концентрации ионов водорода в среде (рН 11) через 1 час культивирования бесплазмидные варианты погибали в 1,6 раза быстрее.

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что присутствие плазмиды рBS72 повышает выживаемость бактерий *B. subtilis* в стрессовых условиях среды. При этом клетки природного штамма *B. subtilis* 19 характеризуются более выраженными адаптивными свойствами, которые могут обеспечиваться взаимодействием генов плазмидного и хромосомного происхождения. Полученные данные могут служить основой для выявления детерминант в составе плазмидного генома, обеспечивающих устойчивость клеток к повышенной осмолярности и концентрации ионов водорода.

Литература

1. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich, A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector // Plasmid. – 2003. – Vol. 49, № 1. – С. 53-62.
2. Титок М.А., Лагодич А.В., Селезнева Ю.В. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников // Вестник БГУ. – 2003. – Сер. 2, № 3. – С. 35-38.
3. Лотарева О.В., Полуэктова Е.У., Титок М.А., Прозоров А.А. Почвенный штамм *Bacillus subtilis*, содержащий крупную плазмиду, обеспечивающую высокую частоту мобилизационного переноса // Микробиология. – 2002. – Т. 71., № 2. – С. 255-257.

Распространение плазмиды тета-типа pBS72 в клетках природных бактерий *Bacillus subtilis*

Гуринович А.С.,¹ Сацункевич Н.А.², Титок М.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Повсеместно распространенные в естественной среде обитания бактерии *B. subtilis* широко используются в разных отраслях биотехнологии [1, 2]. Изучение организации генома этих практически важных микроорганизмов предполагает комплексное изучение всех генетических детерминант, в том числе и внехромосомных генетических элементов, являющихся частью генетического аппарата и определяющих важнейшие этапы жизнедеятельности бактериальной клетки. Следует отметить, что для бактерий *B. subtilis* характерно присутствие плазмид семейства pC194, копирующихся в соответствии с механизмом «разматывающегося рулона». В то же время плазмиды тета-типа практически не выявляются в клетках этих микроорганизмов. Между тем, именно эти внехромосомные генетические элементы характеризуются разнообразием систем репликации и конъюгационного переноса, а также являются оптимальной основой для создания систем генетического анализа [3].

Целью настоящего исследования являлось изучение распространения в природных бактериях репликонов тета-типа аналогичных плазмиде pBS72.

Ранее с использованием методов рестрикционного и гибридного анализа плазмидной ДНК в клетках природных бактерий *B. subtilis* были выявлены идентичные плазмиды тета-типа, одна из которых обозначена как pBS72 [4]. В ходе настоящей работы наличие бактерий, содержащих pBS72-подобный репликон, определяли непосредственно в почвенных образцах. Для этого из почвы выделяли тотальную ДНК, которую использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции для выявления прокариотических организмов (выявляли ампликоны генов 16S рПНК), бактерий *B. subtilis* (выявляли ампликоны генов *spoA*) и плазмиды pBS72 (выявляли ампликоны размером 685 п.н., характерные для плазмиды pBS72). В результате из 36 исследованных образцов почвы, содержащей бактерии (получены ампликоны генов 16S рПНК), в 22 обнаружены бактерии *B. subtilis* (получены ампликоны гена *spoA*), из которых 6 образцов содержали репликоны pBS72 (получены ампликоны фрагмента плазмиды pBS72). Таким образом, использованный подход позволил установить, что в почвенных изолятах, содержащих бактерии *B. subtilis*, в 27% выявляются репликоны, сходные с таковыми плазмиды pBS72.

Анализ Rep-белка плазмиды pBS72 позволил выявить идентичные на 99% аминокислотные последовательности, депонированные в ГенБанк NCBI. В частности, гены, детерминирующие данные белки, обнаружены в составе геномов четырех штаммов бактерий *B. subtilis* BCM26, *B. subtilis* BOH71, *B. subtilis* MB378, *B. subtilis* MB415, выделенных из загрязненных нефтепродуктами почв на территории Пакистана (ODV48082.1, OJH64027.1, NZ_MBPE01000006 NODE_15 и NZ_MQSR01000011 NODE_14 соответственно) и в бактериях *B. subtilis* B4071, выделенных из кари супа в Нидерландах (KIN41328.1 NODE_32). Кроме того, сходные плазмиде pBS72 внехромосомные генетические элементы выявляются в штамме *B. paralicheniformis* G-1, выделенного из сухого молока в Австралии, (NZ_AZSK00000000) и в штамме *Bacillus* sp. MSP1, изолированного из засоленного пруда в Индии (NZ_JXAQ01000015 NODE_00018).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что репликоны тета-типа аналогичные плазмиде pBS72 широко распространены в природной среде обитания не только на территории Республики Беларусь, но и далеко за ее пределами.

Литература

1. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. C. Leifert, H. Li, S. Chidburee e. a. // J. Appl. Bacteriol. – 1995. - Vol. 78, № 2. – P. 97-108.
2. Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production // Can. J. Microbiol. - Vol., - № 1. – P. 1-17.
3. Титок, М.А. Плазмиды грамположительных бактерий / М.А. Титок – Минск: БГУ, 2004.
4. Титок М.А., Лагодич А.В., Селезнева Ю.В. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников / М.А. Титок, А.В. Лагодич, Ю.В. Селезнева // Вестник БГУ. – 2003. – Сер. 2, № 3. – С. 35–38.

Выделение и определение функций *Bacillus subtilis* EP-ABA и *Moraxella osloensis* EP-ABA2 в метаногенных сообществах, разрушающих азокрасители и аминокислоты

Дьяконова А.Т., Тактарова Ю.В., Чердынцева Т.А., Котова И.Б.

Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, электронный адрес: anudig@mail.ru

Из метаногенного микробного сообщества, выделенного нами ранее из ила очистных сооружений пивоваренного завода «Efes Pilsener» (Москва) и активно обесцвечивающего ряд азокрасителей и конвертирующего 2-аминобензойную кислоту (2-АБК) в биогаз [1], были получены в виде чистых культур два изолята, выделенные путем кипячения культуральной жидкости сообщества (КЖ) в течение 15 мин. При глубинном посеве ее в агаризованную анаэробную минеральную среду [2] с 20 мМ пирувата был выделен изолят EP-ABA, клетки которого представляли собой грамположительные подвижные палочки, способные образовывать эндоспоры. Они формировали светло-бежевые, неправильной формы, матовые, непрозрачные колонии 2-3 мм в диаметре. Изолят относился к факультативным анаэробам и мог расти в жидкой минеральной среде с пируватом (20 мМ), либо пептоном (1 г/л), либо дрожжевым экстрактом (1 г/л), либо глюкозой (10 мМ), но не с D-ксилозой или глицеролом. Он сбраживал пируват, глюкозу и смесь аминокислот до лактата, этанола, ацетата и 2,3-бутандиола. У изолята была определена значительная часть (1495 нуклеотидов) последовательности гена 16S рНК, что соответствует позициям с 15 по 1501 по номенклатуре *E. coli*. Скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм относится к филуму *Firmicutes* и роду *Bacillus*, попадая с максимальным значением bootstrap-поддержки (100) в филогенетический кластер, образованный имеющимися в базе данных штаммами вида *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (включающий и типовой штамм этого вида) и обнаруживая с последовательностями их генов 16S рНК очень высокий уровень гомологий (99,9-100%). Штамм был идентифицирован как *Bacillus subtilis* EP-ABA.

Изолят EP-ABA2 был выделен путем поверхностного посева той же прогретой КЖ на МПА и инкубации в анаэробных условиях. Мелкие, молочно-белые, матовые, плоские колонии с ровными краями содержали короткие грамтрицательные неподвижные бесспорные палочки. Культура росла аэробно и анаэробно на минеральной среде с пируватом (20 мМ), пептоном (1 г/л) или глюкозой (10 мМ), а на МПА – аэробно и в микроаэрофильных условиях. У изолята была определена значительная часть (1485 нуклеотидов) последовательности гена 16S рНК, что соответствует позициям с 11 по 1505

по номенклатуре *E. coli*. Скрининг по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм относится к классу *Gamma*proteobacteria и роду *Moraxella*. Изолят EP-ABA2 с максимальным значением bootstrap-поддержки (100) попадает в филогенетический кластер, образованный имеющимися в базе данных штаммами вида *Moraxella osloensis* (включающий и типовой штамм этого вида), обнаруживая с последовательностями их генов 16S рРНК очень высокий уровень гомологий (98,0-99,5%). Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК *B. subtilis* EP-ABA и *M. osloensis* EP-ABA2 были депонированы в GenBank (соответственно, JQ762447 и JQ762446).

Выделенные нами штаммы *B. subtilis* EP-ABA и *M. osloensis* EP-ABA2 не показали способности использовать аминокислоты, бензойную (БК) и салициловую кислоты, бензиловый (БС) и 2-гидроксibenзиловый (2-ГБС) спирты и бензальдегид (БА) при инкубации в минеральной среде без или с доступным ко-субстратом, хотя для представителей рода *Bacillus* ранее была отмечена возможность деградации фталата [3], а для членов рода *Moraxella* – БК, БА, БС, флороглюцина [4] и *n*-крезола [5], сопряженная с нитратредукцией. Внесение биомассы (20 об.% от исходного биоматериала) *B. subtilis* EP-ABA или *M. osloensis* EP-ABA2 в активное сообщество с 2-АБК стимулировало метанообразование на 12 и 18%, соответственно, и снижало значение рН до 6,5, хотя скорость потребления 2-АБК практически не изменялась. Одновременное добавление клеток и глюкозы, напротив, уменьшало выход метана на 7-20%, вероятно, из-за значительного закисления среды (до 5,5). Таким образом, выделенные культуры способны осуществлять сбрасывание линейных интермедиатов и их следует поместить в «бродильный» блок трофической цепи биодеструкции аминокислот (азокрасителей и аминокислот).

Литература

1. Линькова Ю.В., Есакова А.А., Дьяконова А.Т., Намсараев Б.Б., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Проверка способности анаэробных микробных сообществ к разрушению аминокислотных ксенобиотиков // Экология и промышленность России. – 2011. - №1. - С. 29-33.
2. Kalyuzhnyi S., Sklyar V. Biomineralization of azo dyes and their breakdown products in anaerobic-aerobic hybrid and UASB reactors // Water Sci. Technol. - 2000. – V. 41. - № 12. - P. 23-30.
3. Afting R.P., Taylor B.F. Aerobic and anaerobic catabolism of phthalic acid by a nitrate-respiring bacterium // Arch. Microbiol. - 1981.-V. 130. -P. 101-104.
4. Berry D.F., Francis A.J., Bollag J.M. Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions // Microbiol. Rev. – 1987. - V. 51.- №1. - P. 43-59.
5. Bossert I. D., Young L. Y. Anaerobic oxidation of *p*-cresol by a denitrifying bacterium // Appl. Env. Microbiol. – 1986. - V.52. - № 5. - P. 1117-1122.

Изучение фитопатогенных свойств бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси

Евдокимова О.В., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: evdokimovalesia@gmail.com

К настоящему времени более десяти штаммов *Bacillus pumilus* причислены к фитопатогенам, в том числе выделенные на территории Беларуси [1]. Собрана локальная коллекция данных микроорганизмов, значительную часть которой представляют штаммы, изолированные из растений с признаками бактериозов [2]. По физиолого-биохимическим свойствам такие изоляты практически не отличаются от свободноживущих почвенных штаммов [3]. Ввиду этого представляет интерес исследование способности бактерий *B. pumilus* вызывать симптомы заболевания сельскохозяйственных растений при искусственном заражении, что и явилось целью данной работы.

В работе использовали 34 культуры бактерий *B. pumilus*, в том числе 28 штаммов, выделенных из пораженных плодов огурца, томата, клубней картофеля, растения льна, 5 почвенных штаммов, 1 штамм из фекалий кур и *Bacillus subtilis* 168. В качестве тестового объекта для заражения использовали клубни картофеля сорта «Журавинка» и «Бриз», растения боба конского сорта «Белорусский». В клубнях после поверхностной стерилизации проделывали отверстия с помощью стерильных наконечников для автоматических дозаторов, в отверстия добавляли 10 мкл суспензии бактерий, выровненных по оптической плотности (ОП₆₀₀). Реакцию оценивали через 5 суток инкубации при 28 °С. Растения боба заражали инъекцией суспензии микроорганизмов под эпидермис листа. В качестве отрицательного контроля были произведены микроинъекции физиологического раствора и суспензии бактерий *Bacillus subtilis* 168.

В результате исследования было выявлено, что все изучаемые штаммы *B. pumilus*, за исключением почвенных БИМ В-369, В-401 и F6 (штамма из фекалий кур), вызывали повреждение клубней картофеля сорта «Журавинка» при инокуляции суспензией клеток содержащей 10⁸ КОЕ/мл. Степень повреждения растительной ткани была различной: в некоторых вариантах наблюдали небольшой ореол влажной рыхлой ткани цвета клубня (инокуляция В-394) или полость, покрытую сухим серым налетом (В-211), в других – влажную распространяющуюся гниль светло-коричневого цвета (рисунок). Из мацерированной ткани во всех случаях высевалась монокультура бактерий, морфологически схожая с *B. pumilus*. При снижении количества вносимых бактерий (разбавление суспензии клеток в 5 раз), наблюдали либо уменьшение площади пораженной ткани, либо отсутствие повреждений. Однако

14 штаммов вызывали появление гнили даже при внесении разбавленной в 10 раз суспензии клеток. Стоит отметить, что в число таких штаммов попал почвенный изолят БИМ В-171. Картофель сорта «Бриз» оказался более устойчивым, половина изучаемых штаммов не провоцировали развития повреждений и на срезах клубней регистрировали только следы от уколов. Штаммы БИМ В-171, 38.2, 39.2, 61.2, 61.3, Т1, 63-3-1, 65-4 вызывали появление гнили клубней данного сорта, в том числе при внесении разбавленной суспензии клеток.

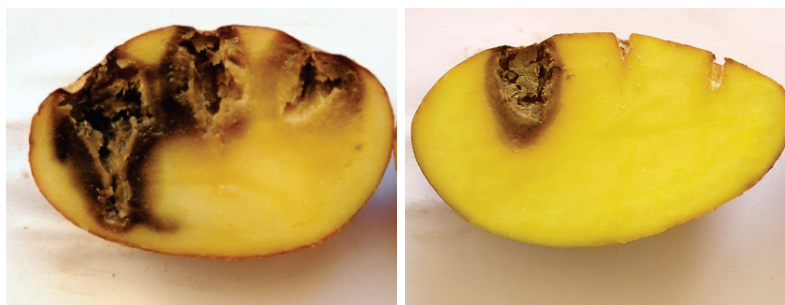


Рисунок – Срез клубня «Журавинка» (слева) и сорта «Бриз» (справа) на 5 сутки после инокуляции суспензией клеток *B. pumilus* 33-3

В экспериментах по заражению растений боба конского при инъекции бактериальной суспензии под эпидермис листа через сутки-двое развивались черные некротические пятна, которые распространялись за пределы зоны инфильтрации. Такую реакцию наблюдали при инъекции суспензии клеток большинства *B. pumilus* изолятов из пораженных растений и штамма БИМ В-171. Остальные изучаемые штаммы *B. pumilus*, как и используемый в качестве отрицательного контроля *B. subtilis* 168, не вызывали визуально регистрируемых реакций на тестируемых листьях растений.

На основании представленных результатов можно сделать вывод, что отдельные штаммы бактерий *B. pumilus* при попадании в растительную ткань способны вызывать симптомы заражения растений. Среди изученных штаммов можно выделить 38.2, 39.2, 61.2, Т1, 63-3-1, 11-1-1, БИМ В-171, которые провоцировали появление и гнилей клубней картофеля, и некроза листьев растений боба.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б19-110).

Литература

1. Kovaleva V. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine– Short Communication / V. Kovaleva // Journal of Forest Science. – 2015. – Vol. 61. – № 3. – P. 131–137.
2. Евдокимова О.В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР / О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. – 2016. – Vol. 21. – P. 53-63.
3. Евдокимова О.В. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2018. – № 1. – P. 38-49.

Бактериофаг DT57C - платформа для создания терапевтических фаговых препаратов нового поколения

Ефимов А.Д., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Летаров А.В.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Москва, Россия,
электронный адрес: letarov@gmail.com

В нынешнее время одним из перспективных видов антибактериальной терапии вновь стала фаготерапия. Особенно это касается заболеваний, связанных с грам-отрицательными бактериями сем. *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella* и др.), способными быстро приобретать резистентность к антибиотикам. Важным аспектом рациональной фаговой терапии оказывается необходимость получения высокоэффективных фаговых препаратов для применения в клинике.

Одной из групп вирулентных бактериофагов энтеробактерий, вирионы которых устойчивы к различным условиям окружающей среды, а геномы не содержат генов вирулентности, являются фаги группы T5, перспективные агенты фаготерапии [1].

Ранее было показано [2], что выделенные нами T5-подобные бактериофаги DT57C и DT571/2 осуществляют первичный и обратимый этап взаимодействия с клеткой за счет трёх разветвленных латеральных хвостовых фибрилл (LTF), выполняющих функцию распознавания поверхностного O-антигена (ОПС) клетки бактерии-хозяина. Эти фибриллы состоят из двух белков – LtfA и LtfB. Мишенями для LtfA являются O-полисахариды штаммов *E. coli* 4s O22-подобные (для фага DT57C) или HS1/2 серотипа O87 (для фага DT571/2), а LtfB – O-полисахарид серотипа O81 штамма HS3-104 (для обоих фагов).

В качестве конечного рецептора бактериофаги DT57C и DT571/2 используют тот же транспортный белок поверхностной мембраны энтеробактерий, что и родственные T5-подобным фагам бактериофаг BF23, белок BtuB, который взаимодействует с рецептор-связывающим белком фага pb5. Также известны конечные рецепторы еще для двух T5-подобных бактериофагов; для H8 – FerA и для T5- FhuA.

Бактериофаг DT57C, имеющий в составе вириона распознающие ОПС фибриллы, может быть использован как платформа для создания рекомбинантных бактериофагов, содержащих рецептор-узнающий белок pb5 с различной специфичностью. Такие бактериофаги способны инфицировать широкий спектр штаммов бактерий, а в составе коктейля для фаготерапии их применение резко снижает вероятность отбора фагорезистентных мутантов бактерий.

В связи с ограниченным числом известных рецепторов для фагов группы T5 особую актуальность приобретают исследования биоразнообразия T5-подобных фагов с целью поиска новых типов рb5, узнающих другие рецепторы, и эксперименты по изменению специфичности фага заменой рецептор-узнающего белка.

В результате поиска T5-подобных фагов с отличающимся от известных конечным рецептором, нам удалось выделить бактериофаг Gostya9 [3], который имеет уникальную последовательность рецептор-узнающего белка рb5.

По гомологии белковой последовательности бактериофагов, родственных T5 и инфицирующих энтеробактерии, нами было построено филогенетическое дерево. В его структуре можно выделить пять основных кластеров, соответствующих фагам с предположительно различными конечными рецепторами. Это группа фаг T5 (FhuA), группа BF23, к которой относятся и наши фаги DT57C и DT571/2, (BtuB), группа, состоящая из фагов *Proteus* и *Providencia*, рецепторы которых не известны, и, наконец, группа Shivani, к которой принадлежит выделенный нами бактериофаг Gostya9.

Анализ полной нуклеотидной последовательности генома фага Gostya9 обнаружил, что ближайшим родственником этого вируса является фаг DT57C. Таким образом, обнаруженный новый тип рецептор-узнающего белка оказывается потенциально совместимым с организацией вириона фага DT57C.

Нами был получен рекомбинантный бактериофаг, содержащий структурные белки вириона бактериофага DT57C и рецептор-узнающие белки бактериофага Gostya9. Этот фаг приобрёл способность инфицировать мутантные штаммы-хозяев бактериофага DT57C лишённые белка BtuB, рецептора фага DT57C. Это указывает на возможность использования бактериофагов группы T5 в качестве платформы для конструирования рекомбинантных бактериофагов с изменяемой специфичностью для целей фаготерапии.

Понимание принципов и характера взаимодействий, определяющих эффективность неспецифической защиты клеток бактерий от фагов, а также знание стратегий, которые фаги используют для преодоления этой защиты, позволит разработать требования к составу эффективных терапевтических коктейлей бактериофагов, а также выработать подходы к усилению действия фаговых препаратов.

Работа поддержана грантом РФ №15-15-00134

Литература

1. Svab D., Falgenhauer L., Rohde M., Szabo J., Chakraborty T., Toth I. Identification and Characterization of T5-Like Bacteriophages Representing Two Novel Subgroups from Food Products // Front Microbiol. - 2018. - Т. 9. - С. 202.
2. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Branched lateral tail fiber organization in T5-like bacteriophages DT57C and DT571/2 is revealed by genetic and functional analysis // Viruses. - 2016.10.3390/v8010026.
3. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Babenko V.V., Ivanov P.A., Prokhorov N.S., Letarov A.V. Escherichia coli bacteriophage Gostya9, representing a new species within the genus T5virus // Arch Virol. - 2019. - Т. 164, № 3. - С. 879-884.

Оценка антибиотикочувствительности бактерий группы *Bacteroides fragilis*, изолированных от пациентов с интраабдоминальными инфекциями

Кожаметова С.С.¹, Жолдыбаева Е.В.¹, Атавлиева С.Ш.¹, Тарлыков П.В.¹,
Нугманова Р.Е.¹, Сыздыков Т.А.², Хожаева Г.С.³, Раманкулов Е.М.¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии», Нур-султан, Республика Казахстан,
электронный адрес: SOralbaeva@mail.ru

²ГКП на ПХВ «Городская больница №1», Нур-султан, Республика Казахстан

³ГКП на ПХВ «Городская многопрофильная больница №2», Нур-султан, Республика Казахстан

Исследования последних лет показали, что среди всех анаэробов, именно бактероиды группы *Bacteroides fragilis* доминируют при интраабдоминальных анаэробных инфекциях [1, 2]. В настоящее время, также как и на протяжении многих лет, лечение интраабдоминальных анаэробных инфекций происходит путем оперативного вмешательства с последующим активным использованием антибиотиков широкого спектра для быстрого подавления микрофлоры пациента [3]. В настоящий момент такими антибиотиками являются клиндамицин, меропенем, цiproфлоксацин и метронидазол, подбор которых каждому пациенту происходит эмпирическим путем [4].

В связи с чем, в данной работе было проведено изучение антибиотикочувствительности штаммов *Bacteroides fragilis*, изолированных от пациентов с диагнозом «Перитонит» к вышеуказанным антибиотикам. Для формирования коллекции бактерий группы *Bacteroides fragilis*, в пробирки с транспортной средой Эймса, были собраны клинические образцы раневых отделяемых из дренажей от пациентов с диагнозом «Перитонит» из городских больниц №1 и №2 города Нур-султан. Идентификация бактерий была проведена, используя методы масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen Germany), а также путем секвенирования 16S rRNA гена. Скрининг лекарственной чувствительности был проведен, используя E-тест. Выделение геномной ДНК из бактерий группы *Bacteroides fragilis* было проведено с помощью QIAamp DNA MiniKit (Qiagen).

Таким образом, был проведен сбор 51 клинического образца от пациентов-добровольцев. По результатам MALDI-TOF MS идентификации, а также использования секвенирования гена 16S рPHK, было выделено 3 штамма, относящегося к виду *Bacteroides fragilis*: *Bacteroides fragilis* S14, *Bacteroides fragilis* BOB25, *Bacteroides fragilis* изолят 93N 17404.

Известно, что клинически *Bacteroides fragilis* проявляют повышенную устойчивость ко многим антибиотикам, включая цефокситин, клиндамицин, метронидазол, карбапенемы и фторхинолоны [5].

В результате изучения антибиотикочувствительности, выделенных нами штаммов *Bacteroides fragilis* было установлено, все штаммы оказались резистентными к ципрофлоксацину, а штамм №1 устойчив еще к метронидазолу. Большинство штаммов оказались чувствительными к клиндамицину. Штамм №2 оказался чувствительным к метронидазолу и меропенему, тогда как штамм №3 проявил к ним умеренную чувствительность.

Литература

1. Wexler H. M. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty//Clinical Microbiology Reviews.-2007.- Vol.20, № 4. -P.593–621.
2. Газиумарова Л.Д. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника // Инструкция по применению. – 2010. -С.17.
3. Brook I. Antimicrobial drugs used in the management of anaerobic infections in children // Drugs. – 1983.-Vol. 26, №6. -P.520-529.
4. Nagy E., Urbán E. Antimicrobial susceptibility of Bacteroides fragilis group isolates in Europe: 20 years of experience. // Clinical Microbiology and Infection. -2011. -Vol. 17, №3.-P. 371-379.
5. Snyderman D. R., Jacobus N. V., McDermott L. A., Ruthazer R., Goldstein E., Finegold S., Harrell L., Hecht D. W., Jenkins S., Pierson C., Venezia R., Rihs J., L. Gorbach S. In vitro activities of newer quinolones against *Bacteroides* group organisms // Antimicrob. Agents Chemother. - 2002. -Vol. 46.-P.3276–3279.

Молекулярно-генетический анализ эндофитов эрикоидной микоризы у рода *Vaccinium*

Камельчук Я.С.¹, Баранов О.Ю.²

¹Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
электронный адрес: yaninasamal@gmail.com

²Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

В настоящее время все больше внимание возрастает к изучению микоризных грибов, так как данная группа микромицетов является важным объектом для использования в области биотехнологии. Экспериментально доказано, что микоризованные корни более эффективно поглощают элементы питания в пересчете на единицу длины, чем неколонизированные.

В основном образование эндомикоризы для арбускулярно-микоризных грибов является облигатной стадией жизненного цикла, вне растения они существуют в форме покоящихся спор. Для прохождения жизненного цикла растений арбускулярно-микоризный симбиоз не является обязательным, но необходим для выживания в типичных для них экологических условиях. Особо важен этот симбиоз для древесно-кустарниковых форм, а также для растений со слабо развитой системой корневых волосков, например, у представителей семейства вересковых рода *Vaccinium*. Для этого семейства характерна эрикоидная микориза, структуры которой изменчивы – от экто- и до эндотипов и проявляют больше специфичности в ассоциациях растений с грибным партнером. Роль этого типа микоризы заключается в выделении ферментов и других экскудатов в почву, делая инертные соединения доступными для корней растений. Геномы видов, принадлежащих к *Ascomycetes*, формируют симбиотические генетические ассоциации с видами растений из семейства вересковых рода *Vaccinium*. Однако специальных работ, посвященных изучению микоризных грибов эрикоидного типа, до сих пор не проводилось.

Наше исследование было посвящено диагностике аборигенных эндомикоризных грибов черники и голубики с использованием методов ДНК-маркирования в условиях *in planta*. Непосредственной целью данного исследования являлась видовая и генетическая идентификация эндомикоризных грибов на основании анализа регионов рДНК микромицетов.

Методы исследования. Для проведения молекулярно-генетического анализа для каждого образца были взяты фрагменты растительных тканей. Пробы отобраны в тройной повторности. Итого было исследовано 24 образца. Выделение ДНК из образцов производили СТАВ-методом согласно протокола представленного в [1]. Амплификацию маркерных локусов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием набора

универсальных праймеров ITS1(F) и ITS4, комплементарных областям локусов 18S и 26S рРНК микромицетов [2]. Для идентификации выявленных видов было проведено секвенирование региона, содержащего локусы 18S рРНК (фрагмент), BTC1, 5,8S рРНК, BTC2, 28S рРНК (фрагмент). Секвенирование образцов проводили с применением генетического анализатора ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией. Молекулярно-генетическая идентификация грибов проводилась в международной базе данных Gene Bank NCBI.

Результаты исследования. В ходе молекулярно-генетического анализа метагеномов растительных образцов голубики и черники нами были выявлены различные по структуре и видовому составу микробиомы. Проведенный анализ доминирующих вариантов амплифицированных локусов выявил наличие трех диагностируемых типов маркерных регионов рДНК, что соответствовало аналогичному числу видов. Долевое участие доминирующего варианта генотипа, обозначенного как ITS²⁸⁴ (соответствующего *Pezizula sp.*) в образце тканей корней черники превысило 0,63. На долю генотипа ITS²⁹¹ (соответствующего *Phialocephala fortinii*) приходилось не более 0,20 от всего грибного микробиома. В незначительных количествах (менее 1%) также были диагностированы три некультивируемых вида микромицетов (согласно данным Gene Bank NCBI).

В образце тканей корней голубики были диагностированы примерно в одинаковом количестве генотип ITS²⁹¹ (соответствующий *Phialocephala fortinii*) и ITS²⁶⁶ (таксономическое описание в Gene Bank NCBI отсутствует). Сопутствующая микрофлора (менее 1% от долевой представленности микробиома) включала два некультивируемых вида микромицетов, оба из которых (ITS²⁷⁷ и ITS³¹⁹) также были выявлены в образцах тканей корней черники. Следует отметить, что нами приведены только те виды микромицетов, содержание генетического материала которых в изучаемых тканях растений являлось достоверно диагностируемым ($Ct \leq 35$) и представлено на электрофореграммах четкими пиками (зонами амплификации).

Выводы. В результате молекулярно-генетического анализа эндофитов эрикоидной микоризы у рода *Vaccinium* был выявлен комплекс грибных микромицетов и определены доминирующие виды в каждом из образцов.

Литература

1. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. - Мн.: Юнипол, 2007. - 176 с.
2. White, T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. White // In: PCR protocols: a guide to methods and applications. – 1990. – P. 315-322.

Воздействие *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина на продукцию ИЛ-33 клетками респираторного эпителия

Костюк С.А., Глинкина Т.В.

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь, электронный адрес: s.kostiuk@mail.ru

Введение. *Mycoplasma pneumoniae* является одним из этиологических факторов развития внебольничной пневмонии и бронхиальной астмы у взрослых и детей. Механизм патогенного действия возбудителя основан на его способности взаимодействовать с клетками респираторного эпителия и выделять токсичные для клеток вещества метаболического действия, в частности токсин, ассоциированный с респираторным дистресс-синдромом (Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin, CARDS) [1, 2]. *Mycoplasma pneumoniae* является астма-ассоциированным микроорганизмом [3], при этом CARDS-токсин рассматривается в качестве классического аллергена [4]. Таким образом, особый интерес представляет изучение продукции цитокина ИЛ-33, который вырабатывается клетками респираторного эпителия и ассоциирован с развитием аллергических заболеваний и астмы. ИЛ-33 обладает способностью индуцировать продукцию цитокинов, стимулирующих Th2 иммунный ответ, которому отводится ключевая роль в возникновении и поддержании аллергического воспаления [5].

Цель исследования – оценить влияние *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина на продукцию ИЛ-33 клетками респираторного эпителия *in vitro*.

Материалы и методы. В качестве *in vitro* модели использовали клеточную линию карциномы легких человека A549, полученную из американской коллекции типовых культур ATCC (CCL-185). Клетки культивировали в минимальной поддерживающей среде (MEM-Eagle, Sigma) с добавлением 10% FBS и антибиотиков (Sigma, 10 000 Ед пенициллина и 10 мг стрептомицина на 1 мл 0,9% NaCl) при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Отделение клеток с поверхности роста проводили путем обработки 0,25% трипсином при достижении ими 80-90% конфлюэнтности. Для инфицирования клеток A549 использовали *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531, выращенную в среде для микоплазм в течение 2-3 недель при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Оценку действия рекомбинантного CARDS-токсина (rCARDS, MyBioSource, США) на выживаемость клеток оценивалась в тесте с трипановым синим. Концентрацию ИЛ-33 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) определяли методом ИФА в соответствии с инструкцией производителя. Статистический анализ выполнялся с использованием пакета прикладных программ Statistica 9. Все количественные данные имели непараметрическое

распределение (проверка на нормальность проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни (U-тест). Корреляция анализировалась с использованием метода Спирмена. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Инфицирование A549 клеток *Mycoplasma pneumoniae* было подтверждено обнаружением ДНК микроорганизма методом ПЦР в A549 клетках через 24, 48 и 72 часа после замены среды, в контрольных клетках ДНК *Mycoplasma pneumoniae* не была выявлена. Выживаемость A549 клеток спустя 24, 48 и 72 часа после действия CARDS-токсина в различных концентрациях (0,05; 0,5; 5 и 20 мкг) составила более 80%. Изменения в продукции ИЛ-33 наблюдались через 48 часов после инфицирования *Mycoplasma pneumoniae* и действия CARDS-токсина. Выход ИЛ-33 в клеточные супернатанты составил: 10,5 [9,75;13,75], 24,4 [22,2;30,0] и 60,0 [56,8;61,35] пг/мл при инфицировании *Mycoplasma pneumoniae* в концентрациях 0,1, 0,25 и 0,5 ЕД МакФарланда; 18,5 [15,5;21,0], 34,6 [31,25;40,1], 68,0 [60,0;76,5] и 105,4 [90,45;129,7] пг/мл при действии CARDS-токсина в концентрациях 0,05; 0,5; 5 и 20 мкг/мл соответственно. Концентрации ИЛ-33 положительно коррелировали с концентрациями *Mycoplasma pneumoniae* и CARDS-токсина ($r = 0,949-0,963$; $p < 0,05$).

Заключение. Для реализации патогенного потенциала *Mycoplasma pneumoniae* значимо не только присутствие жизнеспособного патогена, но и выделение в биотоп инфицирования основного фактора патогенности *Mycoplasma pneumoniae* – CARDS-токсина.

Литература

1. Parrott, G. L. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae* [Electronic resource] / G.L. Parrott, T. Kinjo, J. Fujita // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – Article 513. – Date of access: 11.12.2018.
2. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae* / A. Becker [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – Vol. 112, №16. – P. 5165–5170.
3. Yin, S. S. Association of *Mycoplasma pneumoniae* infection with increased risk of asthma in children / S. S. Yin, F. L. Ma, X. Gao // Exp Ther Med. – 2017. – Vol.13, №5. – P.1813-1819.
4. *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation / J. L. Medina [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2012. – Vol. 46, № 6. – P.815-822.
5. Molofsky, A. B. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury and inflammation / A.B. Molofsky, A. Savage, R. M. Lockley // Immunity. – 2015. – Vol.42, №6. – P.1005-1019.

Продукция α - и β - галактозидаз бактериями *Bifidobacterium adolescentis*

Морозова А.Н., Головнева Н.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by

В настоящее время возрос интерес к использованию пробиотических микроорганизмов для ферментации пищевых продуктов растительного происхождения. С этой целью бифидобактерии, обладающие широким спектром гидроксил гидролаз, используются в составе пробиотиков, пищевых и кормовых продуктов [1]. Галактозидазы являются ферментами, осуществляющими гидролиз сложных галактозосодержащих углеводов растительного и животного происхождения. Исследование условий биосинтеза этих ферментов бифидобактериями важно для расширения возможности применения этих микроорганизмов в биотехнологии и медицине.

Целью работы являлось исследование продукции галактозидаз бифидобактерий в зависимости от источника углеродного питания.

Объектом исследования выбран штамм *Bifidobacterium adolescentis* Cf-G, который, как показано ранее [2], обладает высокой β -галактозидазной активностью. Культуру выращивали на модифицированной среде MRS с разными источниками углерода (глюкоза, лактоза, мелибиоза, раффиноза) в концентрации 10 г/л при температуре 37°C. Накопление биомассы фиксировали по показателю оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 590 нм после 18 часов культивирования. Активность α - и β -галактозидаз определяли колориметрически при 410 нм по количеству освободившегося о-нитрофенола из о-нитрофенил- α -D-галактопиранозида или о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида, соответственно, после 5-15 мин инкубации при 37°C. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое осуществляет гидролиз 1 мкмоль субстрата в минуту при 37°C. Активность рассчитывали в единицах Миллера [3].

Показано, что *B. adolescentis* Cf-G, в отличие от других штаммов бифидобактерий [1, 4, 5], синтезирует и α - и β -галактозидазы. Исследована продукция α - и β -галактозидаз в зависимости от источника углерода в среде культивирования *B. adolescentis* Cf-G. Максимальный уровень продукции α -галактозидазы установлен на среде с мелибиозой (рисунок, А), β -галактозидазы – с лактозой (рисунок, Б). При этом активность α -галактозидазы на среде с лактозой выше, чем на среде с рафинозой. На среде с глюкозой уровень продукции обоих ферментов снижался в 3-4 раза от максимального, что свидетельствует о репрессии синтеза ферментов глюкозой.

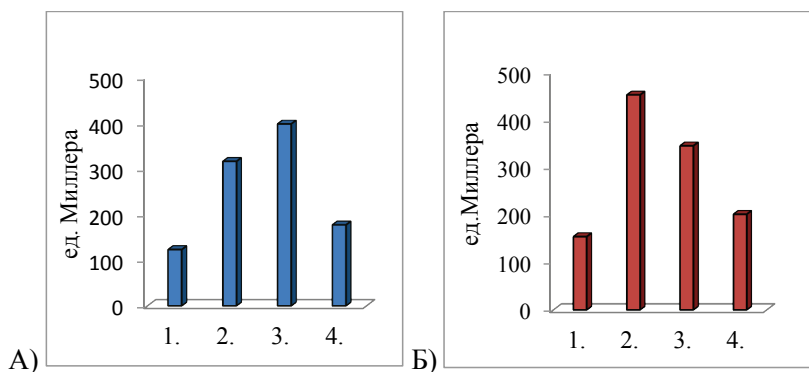


Рисунок – Продукция α -галактозидазы (А) и β -галактозидазы (Б) в зависимости от источника углерода в среде культивирования *B. adolescentis* Cf-G (1. глюкоза; 2. лактоза; 3. мелибиоза; 4. рафиноза)

Исследование синтеза ферментов в процессе роста *B. adolescentis* Cf-G выявило, что максимум гидролитической активности α - и β -галактозидаз наблюдается в экспоненциальной фазе развития при культивировании бактерий на средах с разными источниками углеродного питания.

Таким образом, показано, что *B. adolescentis* Cf-G продуцирует α - и β -галактозидазы на средах с разными источниками углерода, что позволяет рассматривать этот штамм как перспективный для использования в составе добавок с целью ферментации растительного сырья и улучшения переваримости кормовых продуктов.

Литература

1. Pokusaeva K. Carbohydrate metabolism in bifidobacteria / K. Pokusaeva, G F. Fitzgerald, D. van Sinderen // *Genes Nutr.* – 2011. – V.6. – P. 285–306.
2. Морозова А.Н. Характеристика свойств β -галактозидаз, синтезируемых *Bifidobacterium adolescentis* CF-G / А.Н. Морозова, Н.А. Головнева // Молодежь в науке – 2012: материалы междунар. науч. конф. молодых ученых. – Минск, 2012. – С.59-62.
3. Miller J. H. A short course in bacterial genetics / J. H. Miller // Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1992.
4. Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria / M. Carević [et al.] // *Hem. Ind.* – 2015. – V.69, №3. – P. 305–312.
5. Cloning and characterization of a novel α -galactosidase from *Bifidobacterium breve* 203 capable of synthesizing Gal- α -1,4 linkage / H. Zhao [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2008. – V. 285. – P. 278–283.

Сравнительная характеристика методов выделения ДНК из биоматериала с помощью высокопроизводительного массового секвенирования

Охремчук Е.В., Охремчук А.Э., Буйницкая С.В., Сидоренко А.В., Валентович Л.Н.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: katerina_akhr@bio.bsu.by*

Симбиотическую микробиоту человека можно рассматривать как особый «метаболический орган», выполняющий широкий спектр жизненно важных локальных и системных функций, способствующий гармоничным взаимодействиям макроорганизмов с экзогенным микробным миром. Нарушение качественного и количественного состава кишечной микробиоты вносит значительный вклад в развитие ряда заболеваний человека, таких как метаболический синдром, ожирение, болезнь Крона и др. Это обуславливает актуальность изучения изменений микробиоценоза кишечника, ассоциированных с различными патологиями [1].

В настоящее время наиболее информативным методом анализа структуры кишечной микробиоты считается метагеномный анализ, одним из важнейших этапов которого является выделение ДНК микробного сообщества из кала. Варьируя параметры, исследователь может получать различные результаты, работая с одним и тем же образцом биоматериала. Поэтому чрезвычайно важно подобрать оптимальный и воспроизводимый метод выделения ДНК, так как все еще не существует какого-либо универсального протокола для подобных исследований.

Ранее нами было охарактеризовано 24 образца ДНК (таб. 1), выделенных из одного образца биологического материала 15 различными методами (для ряда методов выделение проводилось в повторности) [2].

На основании базы данных RDP классифицировано около 70% прочтений, полученных в ходе секвенирования. Из них 25% операционных таксономических единиц (ОТЕ) отнесены к домену *Bacteria*, но не удалось установить их принадлежность к конкретному семейству. Выявлено, что в образцах имеются как общие ОТЕ, так и уникальные (таб. 2).

Необходимо отметить, что для ряда образцов ДНК внутри реплик характерна хорошая воспроизводимость результатов (идентифицируется схожее количество ОТЕ в случае реплик ОВ, MNSo, Q1 и ряда др.), а для набора IN наблюдается значительная разница внутри реплики.

Таблица 1 – Образцы ДНК, используемые в работе

Кодовое название образца	Наличие повторности	Наименование набора либо метода для выделения метагеномной ДНК из образцов кала
MP	-	FastDNA SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals)
HM	-	Методика, предложенная Кумар и др. [3]
QI	+	QIAampFast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)
ZRFe	+	Fecal DNA Mini Prep (Zymo Research)
DN	-	DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
ZR	+	Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Kit (Zymo Research)
IN	+	PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen)
SA	+	GenElute™ Stool DNA Isolation Kit (Sigma Aldrich)
IP	+	innuPREP Stool DNA Kit (Analytik Jena)
OB	+	E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (Omega Bio-tek)
MNSSt	+	NucleoSpin® DNA Stool (Macherey-Nagel)
MNSo	B1	-
	B1E	+
	B2	-
	B2E	-
		NucleoSpin® DNA Soil (Macherey-Nagel)

Таблица 2 – Количественная характеристика образцов ДНК по ОТЕ

Параметр	Количество ОТЕ
Общее количество ОТЕ (в 24 образцах)	349
Минимальное количество ОТЕ, приходящееся на образец	186
Максимальное количество ОТЕ, приходящееся на образец	247
Общее количество ОТЕ, представленных в количестве более 0,1% (относительно количества всех прочтений)	120
ОТЕ, представленные в количестве более 0,1% , присутствующие во всех образцах	38

На основании анализа метагеномных данных и данных спектрофотометрического, флуориметрического и денситометрического анализа электрофореграмм сделан вывод, что требованиям, предъявляемым к методу выделения ДНК из биологического материала, лучше всего соответствует набор NucleoSpin® DNA Soil (Macherey-Nagel).

Литература

1. Buford, T.W. (Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease / T.W. Buford // *Microbiome*. – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 80.
2. Сравнительный анализ эффективности различных методов выделения метагеномной ДНК из биологического материала / Е.В. Охремчук [и др.] // Биология наука 21 века: материалы 23 междунар. Пушинской школы-конф. молодых ученых / ФГБУН Пушинский научный центр РАН. – Пушино. – С. 236.
3. An Improved Methodology to Overcome Key Issues in Human Fecal Metagenomic DNA Extraction / J. Kumar [et al.] // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 14, № 6. – P. 371-378.

Морфология колоний *Cladosporium* sp. 2 под воздействием биоцида Rosima GT

Надеева Г.В., Евграфова Е.С., Изотова Е.Д.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ИФМиБ, Казань, Россия, электронный адрес: galinadeeva@yandex.ru

В последние десятилетия во многих странах активно изучается проблема обеспечения сохранности от биоповреждений объектов культурного наследия, в том числе фондов архивов и библиотек. Наиболее опасными биодеструкторами бумажных документов являются микромицеты [3], для защиты от которых самым эффективным методом служит биоцидная обработка. Биоциды, являясь стрессовым фактором, могут приводить к появлению штаммов с повышенным адаптогенным потенциалом [2]. Для изучения воздействия биоцида Rosima GT, рекомендованного для обработки бумажных документов, был выбран изолят *Cladosporium* sp. 2, выделенный при проведении микологического исследования помещения хранения документов дореволюционного периода Национального архива Республики Татарстан (НАРТ). Этот микромицет является активным биодеструктором [1], при этом, по нашим многолетним наблюдениям, встречающийся в подавляющем большинстве в летний период в помещениях библиотек. Культивирование изолята *Cladosporium* sp. 2 проводилось на агаризованной среде Чапека с и без добавления биоцида Rosima GT, в концентрации 0,1 мг/л (минимальная концентрация при которой наблюдается выживаемость популяции).

Оценка края колонии изолята *Cladosporium* sp. 2 проводилась методом светового поля в отраженном свете. По сравнению с контролем наблюдается секреция экзометаболических, по-видимому, препятствующих негативному воздействию биоцида Rosima GT на рост и развитие микромицетов. Кроме образования слизи, размер и форма колоний в опытных чашках остаются сопоставимы с контролем. Кроме того, конидиеносцы в опытных и контрольных чашках представлены разветвленными цепями без видимых изменений в размерах и форме конидий (рисунок).

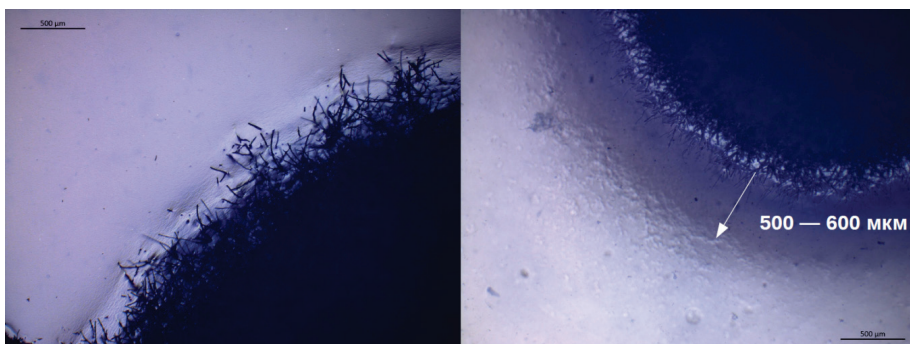


Рисунок – Увеличение образования внеклеточных экзополисахаридов под воздействием биоцида (край колонии изолята: *Cladosporium* sp. 2, под инвертированным световым микроскопом)

Литература

1. Карамова, Н.С. Методы исследования и оценки биоповреждений, вызываемых микроорганизмами: Учебно-методическое пособие / Н.С. Карамова, Г.В. Надеева, Т.В. Багаева – Казанский университет, 2014. – 36 с.
2. Velikova, T. The use of biocides for the protection of library documents: before and now [Text] / T. Velikova, E. Trepova, T. Rozen // Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. – 2011. – V.1. – P. 152-159.
3. Sterflinger, K. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment [Text] / K. Sterflinger, F. Pinzari // Environ. Microbiol. – 2012. –V.3.–P.559-566.

Влияние фенольных соединений растений на продукцию экзополисахаридов и образование биопленок бактериями *Erwinia amylovora*

Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: lagonenkoal@mail.ru*

Бактериальный ожог – одно из наиболее вредоносных заболеваний растений семейства *Rosaceae*, вызываемое бактериями *Erwinia amylovora*. Этот фитопатоген поражает около 200 видов растений, в особенности представителей подсемейства *Maloidae*. Для Республики Беларусь и стран, входящих в Европейскую и Средиземноморскую организацию по карантину и защите растений, *E. amylovora* является карантинным объектом [1].

Основными факторами вирулентности *E. amylovora* являются экзополисахариды амиловоран и леван, система секреции III типа (ССТТ), необходимые для установления и развития заболевания. Амиловоран способен нарушать работу водопроводящих тканей растений, закупоривая сосуды ксилемы, а также, наряду с леваном, участвовать в формировании клетками *E. amylovora* биопленки [2].

Растения синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов. К ним относятся алкалоиды, терпеноиды, фенольные соединения. Известно, что фенолы оказывают различное влияние на подвижность некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas* [3], экспрессию генов системы секреции III типа у *D. dadantii* [4], а также на интенсивность формирования биопленок у *Pectobacterium carotovorum* [3].

Цель данного исследования – изучение влияния ряда фенольных соединений растений (салициловой, коричной, кофейной, ванилиновой и феруловой кислот) на продукцию экзополисахаридов амиловорана и левана, а также на интенсивность формирования биопленок клетками бактерий *E. amylovora*.

В работе использованы бактерии *E. amylovora* E2 (штамм дикого типа, выделен из побегов яблони в Мядельском районе в 2009 году) и D4 (транспозоновый мутант E2, инсерция *mini-Tn5_{xy}LE* под промотор *ams*-оперона, ответственного за биосинтез экзополисахаридов амиловорана).

В результате исследований было выявлено следующее:

– некоторые оксикоричные и оксibenзойные кислоты в концентрации 10 мкг/мл оказывают влияние на продукцию амиловорана клетками бактерий штамма *E. amylovora* E2. Так, феруловая, ванилиновая и коричная кислоты

вызывают увеличение биосинтеза амиловорана, тогда как салициловая кислота вызывает снижение продукции данного экзополисахарида;

– все исследуемые фенольные соединения не оказывают значительного воздействия на биосинтез левана клетками бактерий штамма *E. amylovora* E2;

– салициловая кислота вызывает значительное ингибирование синтеза кодируемого *xylE*-геном фермента катехол-2,3-диоксигеназы у штамма *E. amylovora* D4. Ванилиновая и коричная кислоты не оказывают воздействие продукцию катехол-2,3-диоксигеназы;

– салициловая кислота в концентрации 10 мкг/мл вызывает снижение формирования биопленок при культивировании клеток в минимальной среде МВМА. При культивировании клеток в LB-бульоне достоверной разницы между контрольными и опытными значениями не наблюдается;

– салициловая кислота не оказывает влияния на способность клеток *E. amylovora* к автоагрегации.

На основании полученных данных можно сделать заключение, что фенольные соединения растительного происхождения в концентрации 10 мкг/мл изменяют интенсивность продукции амиловорана, а также оказывают ингибирующее воздействие на образование биопленок клетками бактерий *E. amylovora* E2, выращиваемых в минимальной среде. Вместе с тем для подробного изучения механизмов действия растительных фенольных соединений на экспрессию факторов вирулентности фитопатогенных бактерий необходимы дальнейшие исследования.

Литература

1. Садовская, О.В. Характеристика нового т-подобного бактериофага *Erwinia amylovora* / О.В. Садовская [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – т. 56, № 3. – С. 83–87.
2. Maes, M. Influence of amylovan production on virulence of *Erwinia amylovora* isolates from *Rubus* / M. Maes [et al.] // Eur. J. Plant Pathology. – 2001. – Vol. 107, № 8. – P. 839–844.
3. Lagonenko, L. Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria / L. Lagonenko, A. Lagonenko, A. Evtushenkov // J. Biol. Earth Sci. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 176–181.
4. Sklodowska, M. Phenolic profiles in apple leaves and the efficacy of selected phenols against fire blight (*Erwinia amylovora*) / M. Sklodowska [et al.] // Eur. J. Plant Pathology. – 2018. – Vol. 151, № 1. – P. 213–228.

Микробиологическая характеристика синовиальной жидкости коленного сустава пациентов с реактивной артропатией

Полюян О.С., Костюк С.А., Бенько А.Н.

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь, электронный адрес: olga.polyuan@mail.ru

Введение. Реактивная артропатия коленного сустава является одним из самых частых диагнозов в ревматологии. Данное заболевание имеет мультифакторную этиологию, при этом ведущие отечественные и зарубежные специалисты имеют общую точку зрения о генетической детерминированности указанной патологии в совокупности с микробным фактором. Поиски этиологического фактора развития реактивной артропатии коленного сустава направлены на выделение экзо- и эндогенных агентов, запускающих каскад реакций, приводящих к развитию патологического процесса.

Цель исследования – определить частоту выявления ДНК артритогенных возбудителей бактериальной и вирусной этиологии в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией коленного сустава.

Материалы и методы. В данное исследование было включено 69 пациентов с реактивной артропатией. В качестве биологического материала для проведения молекулярно-генетических исследований по выявлению ДНК артритогенных возбудителей бактериальной (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma species*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) и вирусной (*Herpes simplex virus* I, II, VI типов), *Epstein-Barr virus*, *Parvovirus B19*) этиологии использовали синовиальную жидкость. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «Экстракция 100» («Вектор-Бест», РФ). Постановка реакции амплификации ДНК проводилась с использованием тест-систем «РеалБест» («Вектор-Бест», РФ). Детекция результатов проводилась в режиме реального времени с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия).

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных молекулярно-генетических исследований было установлено, что при реактивной артропатии инфекционное поражение коленного сустава было верифицировано в $64,70 \pm 5,98\%$ ($n=44$), при этом бактериальный фактор был выявлен в $30,88 \pm 4,90\%$ ($n=21$) случаев, вирусный – в $33,82 \pm 5,07\%$ ($n=23$) случаев. В синовиальной жидкости 25 пациентов ($36,76 \pm 5,21\%$ случаев) с реактивной артропатией коленного сустава указанные возбудители выявлены не были. На основании полученных результатов все пациенты были разделены на соответствующие группы: группа 1 – пациенты с реактивной артропатией

коленного сустава бактериальной этиологии; группа 2 – пациенты с реактивной артропатией коленного сустава вирусной этиологии; группа 3 – пациенты с реактивной артропатией коленного сустава неустановленной этиологии.

В группе 1 пациентов с реактивной артропатией коленного сустава (рисунок) основным артритогенным возбудителем являлась *Chlamydia trachomatis* – возбудитель был детектирован в биологического материале 14 пациентов ($66,67 \pm 7,57\%$ случаев). ДНК *Chlamydia pneumoniae* была выявлена в синовиальной жидкости 8 пациентов ($38,09 \pm 5,92\%$ случаев), *Mycoplasma pneumoniae* – 1 пациента ($4,76 \pm 2,17\%$ случаев). У 2 пациентов ($9,52 \pm 3,05\%$ случаев) указанные возбудители были выявлены в виде ассоциаций ДНК *Chlamydia trachomatis* + *Chlamydia pneumoniae*.

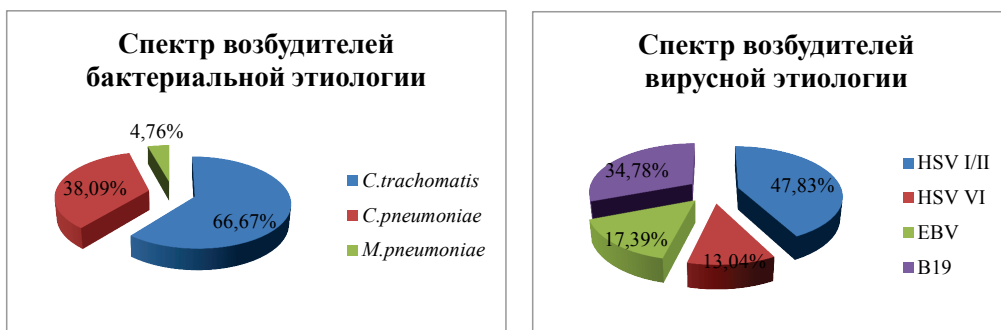


Рисунок – Спектр инфекционных возбудителей и частота их выявления в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией

В группе 2 пациентов с реактивной артропатией (рис. 1) наиболее часто ($n=11$) выявлялась ДНК *Herpes simplex virus* I/II типов ($47,83 \pm 6,26\%$ случаев). ДНК *Parvovirus B19* детектировали в биологическом материале 8 пациентов ($34,78 \pm 5,42\%$ случаев), ДНК *Herpes simplex virus* VI типа и *Epstein-Barr virus* – в синовиальной жидкости 3 ($13,04 \pm 3,41\%$ случаев) и 4 ($17,39 \pm 3,92\%$ случаев) пациентов с реактивной артропатией коленного сустава соответственно. В исследуемом биологическом материале 2 пациентов ($8,70 \pm 2,92\%$ случаев) было выявлено микст-инфицирование полости сустава в виде ассоциации *Herpes simplex virus* I/II+ VI, у 1 пациента ($4,35 \pm 2,07\%$ случаев) была выявлена ассоциация ДНК *Herpes simplex virus* I/II+ *Parvovirus B19*.

Заключение. В ходе проведенных исследований установлено, что в синовиальной жидкости пациентов с реактивной артропатией выявляются инфекционные агенты как бактериальной, так и вирусной этиологии, при этом наиболее часто выявляемый бактериальный агент – *C. trachomatis* ($66,67 \pm 7,57\%$ случаев), вирусный агент – HSV I/II типов ($47,83 \pm 6,26\%$ случаев).

Идентификация спорообразующих бактерий K9 и 40 и выявление генетических детерминант синтеза антимикробных метаболитов в их геномах

Проскурнина И.А., Кантор К.В., Коломиец Э.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: irina_pros@tut.by*

Наряду с гидролитическими ферментами и бактериоцинами, пробиотические штаммы рода *Bacillus* способны продуцировать разные классы антибиотиков, что определяет их биологическую активность [1]. Антимикробные метаболиты, как правило, обладают определенной антибиотической избирательностью. Так, итурин и фенгицин характеризуется антифунгальной активностью, сурфактин обладает главным образом антибактериальными и противовирусными свойствами [2]. Преимущество применения в ветеринарии пробиотических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* перед синтетическими противомикробными препаратами состоит в быстрой биодеградации, экологической безопасности, высокой термо- и кислотоустойчивости синтезируемых ими антимикробных метаболитов.

В настоящей работе проведены исследования по идентификации спорообразующих бактерий и выявлению у них генетических детерминант, определяющих синтез антимикробных метаболитов. Объектами исследования служили изоляты бактерий K9, 40 и коллекционный штамм *B. amyloliquefaciens* БИМ В-497Д, отобранные в результате скрининга для создания пробиотической кормовой добавки. Благодаря продукции комплекса внеклеточных ферментов и антимикробных факторов данные штаммы проявляли ферментативную и антимикробную активность.

По культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам культуры K9 и 40 были предварительно отнесены к роду *Bacillus*.

Исследуемые бактерии способны развиваться в широких пределах pH (4–9,5, с оптимумом 6,5–7,5) и температур (20°C–45°C), в средах с содержанием NaCl до 10%; утилизировать широкий спектр сахаров с образованием кислоты, гидролизовать казеин, желатину.

Высокий индекс совпадения (score value 2,08 и 2,14) при использовании масс-спектрометрического анализа методом MALDI-TOF указал на достоверную принадлежность исследуемых бактерий K9 и 40 к роду *Bacillus* и вероятную – к виду *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*.

Молекулярно-генетическая идентификация культур путем сравнительного анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей таксономически информативного гена 16S рРНК штаммов K9 и 40 с референтными

нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank выявил их высокое сходство (96–98%) с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Bacillus*, вида *Bacillus* sp.

На основании данных типирования с использованием диагностических видоспецифических праймеров 171F1 и 353r1 установлена наиболее вероятная принадлежность исследуемых штаммов к филогенетически близкородственным видам *B. velezensis* либо *B. amyloliquefaciens*. Для уточнения таксономического статуса изолятов проведены физиолого-биохимические тесты на способность гидролизовать Tween 20 и Tween 80, указавшие на сходство исследуемых культур K9 и 40 с видом *B. velezensis* по фенотипическим признакам [3].

Таким образом, по результатам комплексного исследования штаммы бактерий K9 и 40 были идентифицированы как *B. velezensis*.

В процессе скрининга методом отсроченного антагонизма ранее было установлено проявление культурами штаммов *B. velezensis* K9, *B. velezensis* 40 и *B. amyloliquefaciens* БИМ В–497Д антимикробной активности в отношении условно-патогенных *E. coli* 39А, *S. aureus* B107, *S. Dublin*, а также патогенных энтеробактерий и кокков, выделенных из клинического материала.

В связи с исследованием механизмов антагонистического действия штаммов *B. velezensis* K9, *B. velezensis* 40 и *B. amyloliquefaciens* БИМ В–497Д проведена серия полимеразных цепных реакций на матрицах их тотальной ДНК. Для выявления генетических детерминант, связанных с синтезом антимикробных метаболитов различных классов – поликетидных антибиотиков и циклических липопептидов, проводилась амплификация с применением специфических праймеров. В качестве положительного контроля использовался референтный штамм *B. velezensis* БИМ В–439Д – антагонист условно-патогенных микроорганизмов, геном которого депонирован в базе GenBank под номером CP032144 [4].

В результате исследования у тестируемых штаммов показано наличие генетических локусов, детерминирующих синтез сурфактина, фенгигина, макролактинина, диффицидина, бацилломицина, бациллена, итурина Д. Для штамма *B. velezensis* 40 ожидаемый продукт амплификации размером 1077 п.н., определяющий синтез макролактинина, не обнаружен.

Полученные данные позволяют судить о возможном синтезе культурами штаммов *B. velezensis* K9, *B. velezensis* 40 и *B. amyloliquefaciens* БИМ В–497Д антимикробных метаболитов как об одном из механизмов их антагонистического действия.

Литература

1. Mannanov, R. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria / R/ Mannanov, R. Sattarova // Chem. of Nat. Comp. – 2001. – Vol. 37, № 2. – P. 117-123.
2. Лев, И.О. Антимикробные свойства низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов и метаболитов из некоторых видов энтерококков и бацилл / И.О. Лев, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Актуальные вопросы развития современного общества: материалы I Междунар. науч.-практ. конф., Пермь, 15 мая 2016 г. / ФБУН Гос. научн. центр прикл. микр. и биотехн. ; редкол.: Т.М. Сигитов [и др.]. – Пермь: ФБУН, 2016. – 106 с.
3. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain / C. Ruiz-García1 [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.- 2005.- Vol. 55.-P.191-195.
4. Analysis of the genome of the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* BIM B-439D / M.A. Titok [et al.] // Doklady of the NASB. – 2018. – Vol. 62, № 5. – P. 592-600.

Флуориметрический анализ взаимодействия глюкозооксидазы *Penicillium adametzii* и наночастиц благородных металлов

Семашко Т.В.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tsemashko@mbio.bas-net.by*

В настоящее время одним из ключевых направлений становления новейшего технологического уклада являются биотехнологии, основанные на достижениях молекулярной биологии и геной инженерии и нанотехнологий [1]. Наночастицы обладают повышенными адсорбционной емкостью и химической реакционной способностью. Образуя конъюгаты с белками, нуклеиновыми кислотами, они способны влиять на функции данных биоструктур [2, 3].

Использование наноматериалов в биосенсорных технологиях позволяет обеспечить повышение стабильности, чувствительности, селективности сенсорных элементов, достоверности анализов практически значимых аналитов [4]. Одним из таких аналитов является глюкоза. Проблема роста числа больных сахарным диабетом актуальна во всем мире. Пока сахарный диабет неизлечим, но улучшить качество жизни пациентов возможно, благодаря обеспечению их приборами для самоконтроля за уровнем сахара в крови [5]. Ранее в лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси была показана перспективность конструирования глюкозных биосенсоров на основе ферментных препаратов глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*, иммобилизованных на золотые наночастицы [6]. В настоящее время совместно ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разрабатывается новый глюкозный сенсор с использованием конъюгатов глюкозооксидазы с наночастицами благородных металлов, иммобилизованной на наноструктурированном графите.

Цель данного исследования – определение влияния наночастиц золота и серебра на глюкозооксидазу *Penicillium adametzii*, используя метод флуориметрии.

В экспериментах использовалась глюкозооксидаза *P. adametzii*, иммобилизованная на наночастицы золота и серебра (размером 6 ± 2 нм) при молярном соотношении фермент/наночастицы – 10/1, 100/1, 1000/1.

При сравнении кинетических параметров установлено, что использование наночастиц золота приводит к повышению начальной скорости окисления глюкозы ферментом в 1,20-1,35 раза, а наночастицы серебра снижали скорость данной реакции в 1,12-1,54 раза. Независимо от используемых наночастиц сродство фермента к субстрату уменьшалась в 1,15-1,20 раза, а эффективность окисления глюкозы, напротив, возрастала.

Спектрофлуориметрический анализ белка показал, что апофермент глюкозооксидаза имеет максимумы при 276 нм (спектр поглощения), 290 нм (спектр возбуждения) и 330 нм (спектр испускания), что соответствует правилу Стокса-Ломмеля. Интенсивность спектров возбуждения белка для нативного фермента (0,3·наномоль) составляла 19 ± 2 . В присутствии наночастиц интенсивность спектра возбуждения апофермента не менялась, а на интенсивность спектра испускания увеличивалась до 1,4 раза в зависимости от концентрации используемых наночастиц. Максимальные показатели отмечены для наночастиц золота при соотношении фермент/наночастицы 1/1000 и 1/100.

Аналогичные закономерности выявлены и при флуориметрическом анализе спектров ФАД/ФАДН₂ (в окисленном и восстановленном состоянии): интенсивность спектров возбуждения нативного и иммобилизованного фермента не изменялась. Что касается спектров испускания, то в присутствии наночастиц эмиссия ФАД имела тенденцию к снижению на 2,2-5,6%, в то время как показатель ФАДН₂ увеличивался на 20,0-31,0%. Разница в интенсивности флуоресцентного излучения ФАД и ФАДН₂ была наиболее значимой при использовании наночастиц золота во всех исследуемых соотношениях и наночастиц серебра при соотношении 100/1, 1000/1. Как видно из полученных данных, не смотря на то, что наночастицы серебра оказывают ингибирующее действие на скорость реакции окисления глюкозы, катализируемой глюкозооксидазой, они оказывают положительное влияние на процесс переноса энергии в данной реакции, обусловленное увеличением интенсивности показателя эмиссии.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования наночастиц золота и серебра в процессах интенсификации катализа глюкозы.

Литература

1. Weiss, P.S. Nanoscience and nanotechnology: present and future / P.S. Weiss // ACS Nano. – 2010. – Vol. 4, N. 4. – P. 1771–1772.
2. Nanotechnology and biosensors / C. Jiarong [et al.] // Biotechnology Advances. – 2004. – Vol.22. – P. 505–518.
3. Занина, К. А. Влияние нанотехнологий и наноматериалов на человека и остальной живой мир / К.А. Занина, А.П. Цуркин / Технические науки: традиции и инновации: материалы II Междунар. науч. конф., г. Челябинск, октябрь 2013 г. // Челябинск: Два комсомольца, 2013. — С. 21-24.
4. Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (god): current updates / M.K. Dubey [et al.] // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – doi: 10.3389/fmicb.2017.01032
5. Глобальный доклад по диабету / Женева: Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс]. – 2018. Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275388/9789244565254-rus.pdf?ua=1>. – Дата доступа: 01.05.19.
6. The use of different glucose oxidases for the development of an amperometric reagentless glucose biosensor based on gold nanoparticles covered by polypyrrole / N. German [et al.] // Electrochimica acta. – 2015. – Vol. 169. – P. 326–333.

Предобработка прочтений последовательностей ДНК в контексте определения видового состава микробных сообществ

Сиколенко М.А.¹, Валентович Л.Н.^{1,2}

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: taximdeyunionih@gmail.com*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

На данный момент определение видового состава микробных сообществ является одной из важнейших задач, решаемых с помощью метагеномных подходов. Эта задача является актуальной и насущной как из фундаментальных, так и из практических соображений (например, когда речь идёт о микробиоте человеческого организма). Наиболее приемлемой филогенетической системой классификации прокариот является система, основанная на сопоставлении последовательностей нуклеотидов, однако на данный момент сравнивают лишь фрагменты генов 16S рРНК. Эта РНК присутствует во всех эубактерий, функционально постоянна и, кроме того, достаточно изменчива, чтобы установить глубокие эволюционные связи [1].

Последовательность генов 16S рРНК имеет длину около 1500 пар нуклеотидов и имеет в своём составе 9 переменных участков, которые проявляют значительное разнообразие у различных видов микроорганизмов и могут быть использованы для видовой идентификации. К сожалению, упомянутые выше изменчивые участки демонстрируют различное разнообразие последовательностей, и ни один из этих участков не может быть использован для видовой дифференциации микроорганизмов сам по себе [2].

Эффективной и широко используемой технической реализацией определения видового состава микробных сообществ является амплификация части гена 16S рРНК, содержащей изменчивые участки V3 и V4 с последующим секвенированием ампликонов по высокопроизводительной технологии Illumina MiSeq. Такой подход позволяет классифицировать исследуемые микроорганизмы вплоть до семейства.

С целью экономии средств часто проводят секвенирование нескольких образцов за один запуск, для чего к адаптерам присоединяется последовательность-индекс, по которой позже можно определить, к какому образцу принадлежит прочтение. Однако данный индекс может быть прочитан неправильно, в результате чего прочтение попадает не в тот набор данных, которому фактически принадлежит. Такие ошибки могут оказать серьёзный эффект на последующую классификацию микроорганизмов.

В ходе данной работы был разработан скрипт под названием "preprocess_16S.py" (доступ – <https://github.com/SikolenkoMaxim/preprocess16S>), написанный на языке Python (версия 3.7), позволяющий обнаруживать и

отсеивать прочтения, указанным выше образом по ошибке оказавшиеся в анализируемых данных. Скрипт работает с файлами в формате fastq [3].

Обнаружение сторонних последовательностей производится на основании присутствия (отсутствия) в прочтении универсальных праймеров, используемых для амплификации исследуемого участка гена 16S рРНК. А именно: если ни в одном прочтении из пары не обнаруживается последовательности ни одного из праймеров, принимается решение о том, что данная пара прочтений попала в набор данных ошибочно. Такие прочтения записываются в отдельные файлы с тем, чтобы исследователь мог самостоятельно убедиться, что они действительно лишние (либо найти среди отсеянных те, использовать которые в дальнейшем анализе он посчитает целесообразным). В алгоритме скрипта учитывается, что в последовательности праймера могут присутствовать неправильно прочитанные нуклеотиды, а также то, что в описанной выше технологии используются вырожденные праймеры. При этом исследователь вправе самостоятельно указывать набор праймеров, которые были использованы им при амплификации.

Если говорить об аналогичных программных решениях, применяемых с этой целью, стоит упомянуть такую программу, как UNCROSS [4]. Однако эта программа работает с данными, уже прошедшими кластеризацию, а разработанный в ходе данной работы скрипт способен отсеивать лишние данные уже после этапа контроля качества (либо непосредственно с выхода секвенатора, если качество прочтений достаточно высоко). Таким образом можно добиться значительной экономии вычислительных ресурсов, поскольку кластеризация метагеномных данных – процесс гораздо более ресурсозатратный, чем реализованный в скрипте "preprocess_16S.py" алгоритм поиска последовательностей праймеров.

Литература

1. Лысак, В.В. Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2008.
2. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria / S. Chakravorty [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – Vol. 69, № 2. – P. 330-339.
3. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants / P.J.A. Cock [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2010. – Vol. 38, № 6. – P. 1767-1771.
4. Edgar, R.C. UNCROSS: Filtering of high-frequency cross-talk in 16S amplicon reads. UNCROSS / R.C. Edgar. – Bioinformatics, 2016.

Рестрикционный анализ генов *gro* для видовой идентификации бактерий рода *Rhodococcus*

Титок М.А., Букляревич А.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by

Определение видового статуса является важным этапом изучения природных микроорганизмов. Систематическое положение свидетельствует о степени их биологической безопасности (патогенный, условно патогенный и непатогенный), служит основой для изучения особенностей генетической организации и залогом успешного практического использования. Научный и практический интерес представляет систематика бактерий рода *Rhodococcus*. Представители этой таксономической группы деградируют широкий спектр субстратов, а также являются патогенами животных (например, *R. equi*) и растений (например, *R. fascians*) [1]. В качестве генетических маркеров для идентификации природных бактерий рода *Rhodococcus* используются генетические детерминанты, характеризующиеся консервативностью и вариабельностью. В этом плане определенный интерес представляют гены, детерминирующие синтез белков теплового шока. Они присутствуют в геноме всех живых организмов и отличаются числом копий с разным нуклеотидным составом [2].

Целью настоящей работы являлся анализ нуклеотидных последовательностей генов *gro* для использования их в качестве генетических маркеров при идентификации бактерий рода *Rhodococcus* с помощью рестрикционного анализа.

В результате филогенетического анализа было установлено, что последовательности генов *groEL2* и кодируемые ими белки подобно нуклеотидным последовательностям генов 16S рРНК разбиваются на семь групп. Следует отметить, что у представителей каждой группы последовательности генов 16S рРНК идентичны на 99%, что на основании секвенирования не позволяет идентифицировать их до вида [3]. Анализ генов и кодируемых ими белков GroEL2 бактерий рода *Rhodococcus* позволил установить возможность использования данных детерминант в качестве молекулярно-генетических маркеров для видовой идентификации. Для этого с использованием праймеров F 5'-ATGGCMAAGATCATCGCGTTTCG-3' и R (5'-TYAGAAGTCCATRCCRCCCATG-3') при режиме: 95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 60 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин 40 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл) необходимо амплифицировать последовательности генов *groEL2*. Рестрикция полученных ампликонов размером 1626 п.н. ферментами *Bgl*II, *Nar*I, *Sfi*I и *Sin*I

позволяет отнести анализируемые штаммы к определенной филогенетической группе (таб. 1).

Таблица 1 – Результаты рестрикционного анализа генов *groEL2* для установления принадлежности бактерий к определенной филогенетической группе.

Группа	Идентификация группы		Представители группы
	фермент	сайты рестрикции	
I	<i>SfiI</i>	370	<i>R. pyridinivorans</i>
			<i>R. biphenylivorans</i>
			<i>R. rhodochrous</i>
II	<i>NarI</i>	206	<i>R. coprophilus</i>
III	<i>BglI</i>	370, 823, 1108, 1333	<i>R. aetherivorans</i>
			<i>R. ruber</i>
IV	<i>SinI</i>	91, 186, 276, 633, 687, 1266, 1449	<i>R. hoagii</i>
V	<i>NarI</i>	131, 326	<i>R. opacus</i>
			<i>R. koreensis</i>
			<i>R. wratislaviensis</i>
			<i>R. jostii</i>
			<i>R. jostii</i>
		326, 1594	<i>R. imtechensis</i>
VI	<i>BglI</i>	823, 1108	<i>R. erythropolis</i>
			<i>R. qingshengii</i>
VII	<i>BglI</i>	823, 1108, 1141	<i>R. fascians</i>

После этого с использованием рестрикционного анализа можно установить видовую принадлежность исследуемых бактерий (таб. 2). При этом для представителей филогенетической группы III (кроме бактерий вида *R. imtechensis*) дополнительно необходимо амплифицировать последовательности генов *groEL3* (данная группа отличается от остальных присутствием в геноме трех детерминант *gro*). Для этого с использованием праймеров F (5'-ATGGCCAAGATCATCGGTTC-3') и R (5'-ACCATGCCTTCGCGAGATC-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 60°C – 45 с, 72°C – 1 мин 40 с (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл) получить ампликоны размером 1629 п.н. и обработать их определенными ферментами рестрикции (таб. 2).

Таким образом, анализ генов и кодируемых ими белков GroEL бактерий рода *Rhodococcus* позволил установить возможность использования данных детерминант в качестве молекулярно-генетических маркеров для видовой идентификации. Разработана схема, позволяющая на основании рестрикционного анализа продуктов ПЦР генов *groEL2* и *groEL3* с использованием рестриктаз *BglI*, *NarI*, *SfiI*, *SinI*, *RseI* и *BsrI* устанавливать видовую принадлежность природных бактерий рода *Rhodococcus*. При этом рестрикционный анализ генов *groEL2* отдельных представителей этого рода

позволяет сразу идентифицировать их до вида в результате одноразовой обработки соответственно ферментами *Bgl*I (*R. rhodochrous*), *Nar*I (*R. coprophilus*, *R. aetherivorans*, *R. ruber*, *R. imtechensis*), *Sfi*I (*R. jostii*). Отдельно следует отметить, что рестрикция генов *groEL2* ферментом *Sin*I позволяет выявить патогенные бактерии *R. fascians* и *R. hoagii* (синоним *R. equi*) (таб. 1-2).

Таблица 2 – Видовая идентификация бактерий рода *Rhodococcus* на основании рестрикционного анализа генов *groEL*

Вид	Видовая идентификация		Группа
	фермент	сайты рестрикции	
<i>R. pyridinivorans</i>	<i>Rse</i> I	0	I
<i>R. biphenylivorans</i>	<i>Rse</i> I	937	
<i>R. rhodochrous</i>	<i>Bgl</i> I	370, 823, 1333	
<i>R. coprophilus</i>	<i>Bgl</i> I	379, 823, 1108, 1264	II
	<i>Sin</i> I	186, 633, 687	
<i>R. aetherivorans</i>	<i>Nar</i> I	131, 206, 431	III
	<i>Sin</i> I	186, 687, 1395, 1449	
<i>R. ruber</i>	<i>Nar</i> I	131, 206, 431, 1139, 1460	
	<i>Sin</i> I	186, 687, 1449	
<i>R. hoagii</i>	<i>Sin</i> I	91, 186, 276, 633, 687, 1266, 1449	IV
<i>R. opacus</i> *	<i>Sin</i> I	130, 294, 684, 1077	V
<i>R. koreensis</i> *	<i>Sin</i> I	294, 342, 636, 684, 763, 1626	
	<i>Nar</i> I	206, 1583, 1594	
<i>R. wratislaviensis</i> *	<i>Sin</i> I	130, 294, 311, 684, 1077	
<i>R. jostii</i> *	<i>Nar</i> I	206, 326, 1583	
	<i>Sfi</i> I	370, 823, 1108	
<i>R. imtechensis</i>	<i>Nar</i> I	326, 1594	VI
<i>R. erythropolis</i>	<i>Bsr</i> I	717, 1274	
<i>R. qingshengii</i>	<i>Bsr</i> I	296, 717, 1274	
<i>R. fascians</i>	<i>Sin</i> I	687, 1449	VII
	<i>Nar</i> I	0	

Примечание * – видовая идентификация определяется на основании рестрикционного анализа продуктов амплификации генов *groEL3* размером 1629 п.н

Литература

- 1 Bell, K.S. The genus *Rhodococcus* / K.S. Bell [et al.] // UK Journal of Applied Microbiology. - 1998. - Vol. 85. - P. 195–210.
- 2 Ruiz-Gonzalez, M.X. Coevolution analyses illuminate the dependencies between amino acid sites in the chaperonin system GroES-L [Electronic resource] / M.X Ruiz-Gonzalez, M.A Fares // BMC Evolutionary Biology. – 2013. - Vol. 13, № 156. - Mode of access: doi:10.1186/1471-2148-13-156. Date of access: 11. 09. 2018.
- 3 Majidzadeh, M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections/ M. Majidzadeh, M. Fatahi-Bafghi // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. - 2018. - Vol. 37, № 11. - P. 2045-2062.

Физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, способных развиваться при низких температурах

Тригубович А.М., Мямин В.Е.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: trigubovich777@gmail.com*

Адаптация микроорганизмов к жизни в Антарктиде означает не только приспособленность к низким температурам, но и способность осваивать новые экологические ниши. Различные брошенные вещи (от деревянных ящиков до обрывков тканей), оставленные на открытом воздухе на долгое время, становятся новым субстратом для колонизации и развития микроорганизмов. Микробиологический мониторинг в Антарктиде за последние годы стал регулярной частью исследований, проводимых в регионе, что в основном обусловлено усилением антропогенного воздействия на хрупкую экосистему окружающей среды [1]. В связи с этим среди образцов, привезенных из Антарктиды, особый интерес представляли объекты, находившиеся под открытым небом и в заброшенных помещениях более 20 лет, собранные в период 7 Белорусской антарктической экспедиции в оазисе Гора Вечерняя.

В ходе выполнения работы было проведено выделение микроорганизмов из различных образцов антропогенного происхождения (древесина, искусственные и природные ткани и т.д.). Было выделено 157 культур микромицетов и 98 бактериальных изолятов, способных к росту при низких температурах, т.е. обладающих психротолерантными свойствами.

Среди микромицетов доминирующие в пробах изоляты относились к следующим родам: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Trichocladium*, *Trichoderma*. Среди бактериальных изолятов большинство идентифицированных культур относились к родам *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Serratia*.

Для психротолерантных микромицетов были проведены исследования по определению их коэффициента психрофильности (K_p). В результате сравнения выхода биомассы газонной культуры при температурах 4 и 15°C показана способность штаммов с высоким адаптационным потенциалом к накоплению биомассы свыше 2 мг/см² при более низких температурах культивирования. У выделенных бактериальных изолятов наблюдалась способность к росту, как при относительно низких (4–18°C), так и более высоких (28–37°C) температурах. Установлено, что у 64 изолятов бактерий оптимальные температуры роста находились в диапазоне от 4 до 18°C, у 34 изолятов оптимум роста составлял 28°C, бактерии с оптимумом роста при 37°C среди исследуемых микроорганизмов отсутствовали.

Действие экстремальных факторов (осмотический стресс, УФ–излучение) на ростовую активность оценивали для 53 культур микромицетов и 30 культур бактерий с наиболее выраженными психротолерантными свойствами.

Осмотический стресс создавали с помощью хлорида натрия. Высокой скоростью роста в присутствии различных концентраций хлорида натрия обладали культуры микромицетов, которые относились к родам *Penicillium*, *Phoma* и *Cladosporium*. Они сохраняли высокую ростовую активность при концентрации NaCl до 17% в среде. Рост большей части бактерий (22 культуры) ингибировался при концентрации NaCl в среде 2,5%. Только 8 изолятов характеризовались высокой ростовой активностью при 5% NaCl в среде. Более высокие концентрации полностью ингибировали рост бактерий.

Темнопигментированные культуры микромицетов проявили также большую устойчивость к действию УФ-облучения. 32 культуры темноокрашенных грибов родов *Phoma*, *Cladosporium* и *Aureobasidium* сохраняли жизнеспособность даже после 3 ч воздействия рассеянного излучения с длиной волны 254 нм и расчетной мощностью облучения с расстояния 30 см – 1,2 мВт/мм² на газон микромицетов.

Изученные изоляты бактерий показали достаточно широкий спектр ферментативных активностей в широком диапазоне температур от 5 до 37°C. Среди выделенных психротолерантных культур бактерий около 60% продуцировали протеазы, 23% – амилазы, 40% – ДНКазы, 40% – липазы и 16% – целлюлазы, при этом способность продуцировать соответствующие ферменты у большей части микроорганизмов сохранялась в широком температурном диапазоне.

Среди бактериальных изолятов в результате скрининга на антагонистическую активность по отношению к широкому спектру грибных и бактериальных фитопатогенов, высокую антагонистическую активность проявили штаммы рода *Bacillus*. Наибольшая активность отмечена к фитопатогенам *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*.

С помощью специфических праймеров были амплифицированы гены, ответственные за синтез различных антимикробных метаболитов, таких как липопептиды и поликетидные антибиотики у штаммов *Bacillus mojavensis*. В геноме этих бактерий установлено наличие не менее 5 генов, отвечающих за продукцию различных классов антимикробных соединений, таких как фенгицин, итурин, диффицидин, макролактин и бациллен.

Литература

1. Оценка антропогенного влияния на микобиоту Антарктики в районах российских полярных станций / И.Ю. Кирцидели [и др.] // Сибирский экологический журнал.– 2018.– № 5. – С. 514–525.

Характеристика профагов бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

Чернявская М.И.¹, Кугач А.А.¹, Валентович Л.Н.^{1,2}, Титок М.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бактериофаги, являясь универсальными переносчиками генетического материала, играют важную роль в изменчивости бактерий. Посредством бактериофагов может происходить горизонтальный перенос генов между бактериями отдаленных таксономических групп. К тому же, встраиваясь в геном бактерии-хозяина, они могут обеспечить появление новых фенотипических признаков. Наличие полных нуклеотидных последовательностей бактериальных геномов позволяет выявить вставки чужеродной вирусной ДНК, осуществить ее сравнительный и филогенетический анализ, а также определить функциональную значимость входящих в ее состав генетических детерминант. Определенный интерес представляют фаги бактерий рода *Rhodococcus*. Для представителей этой таксономической группы, способных утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, бактериофаги практически не описаны [1, 2].

Целью настоящей работы являлся анализ геномов бактериофагов, локализованных в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Для выявления в хромосоме исследуемых бактерий профагов и их характеристики использовали он-лайн ресурс PHAST [3]. Для филогенетического анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программу MEGA4 [4]. Поиск областей гомологии проводили с использованием программы Mauve [5] и он-лайн ресурса BLAST [6].

В результате проведенного анализа в составе хромосомы бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap было обнаружено 3 профага размером 38,4 т.п.н. (профаг 1), 56,1 т.п.н. (профаг 2) и 55,2 т.п.н. (профаг 3) соответственно. Содержание ГЦ-оснований в их геномах варьировало от 66,19 до 67,65 %. Наибольшее количество сходных ОРС было выявлено в геномах бактериофагов бактерий родов *Gordonia* и *Rhodococcus*. На основании сравнительного сиквенс-анализа обнаруженные бактериофаги были отнесены к семейству *Siphoviridae* порядка *Caudovirales*. Следует отметить, что большинство известных бактериофагов актинобактерий относятся к этому семейству.

С помощью программ Mauve и BLAST в геномах исследуемых бактериофагов были выявлены области гомологии. В частности, последовательность ДНК протяженностью около 3000 п.н. (в геноме профага 3 в пределах последовательности имелась вставка размером 821 п.н.), содержала гены, кодирующие интегразу суперсемейства XerC и фермент семейства SGNH/GDSL-гидролаз (необходимы для проникновения бактериофагов в бактериальную клетку и встраивания в состав хромосомы), сходные с соответствующими ферментами бактериофагов, поражающих родококков и родственных им бактерий. Интегразы исследуемых профагов имели 92-97% сходства с известными гомологичными полипептидами (с учетом синонимичных замен 99%). При этом сходство нуклеотидных последовательностей, кодирующих данные белки, не превышало 85-88%. Наличие полиморфизма в пределах жизненно важных генов может защищать вирусную ДНК от разрушения в бактериальной клетке (например, за счет CRISPR/Cas-систем). Аминокислотные последовательности ферментов семейства SGNH-гидролаз трех исследуемых профагов были сходны (99-100%) между собой. Однако их сходство с известными полипептидами не превышало 52-54% (с учетом синонимичных замен - 64-65%). Наиболее близкие нуклеотидные последовательности были выявлены в геномах бактериофагов Bowser размером 46,6 т.п.н. (KU998235.1) и Apricot размером 52,2 т.п.н. (MH536812.1), поражающих бактерии рода *Gordonia* (сходство составляло не более 64-66%).

В составе исследуемых профагов 1 и 2 выявлены гомологичные локусы, содержащие гены, кодирующие лизоцим, сходство аминокислотных последовательностей которых с известными составляло 68-93% (76-97% с учетом синонимичных замен). В составе фагов 1 и 3 присутствовали сходные детерминанты, кодирующие белки хвостового отростка. Аминокислотные последовательности данных белков, играющих ключевую роль в проникновении вирусной ДНК в клетку бактерии, имели 56% идентичности с известными полипептидами (с учетом синонимичных замен – 69 %).

Наибольшее количество открытых рамок считывания, детерминирующих белки с определенными функциями выявлено в составе бактериофага 1. В частности, гены, детерминирующие терминазу, фосфолипазу, пептидазу, белок портового комплекса, белки капсида, регуляторные белки. Большинство этих белков имели невысокую степень сходства с известными, а на филогенетическом дереве входили в группу с соответствующими полипептидами фагов, поражающих бактерий родов *Rhodococcus*, *Mycolicibacterium*, *Gordonia* или образовывали относительно обособленную ветвь.

Таким образом, в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap выявлены и охарактеризованы три профага, в состав которых входят ряд уникальных генетических детерминант. Полученные данные являются основой для изучения роли определенных белков вирусного происхождения в процессах жизнедеятельности исследуемых бактерий. Кроме того, присутствие в геноме профагов, имеющих строго определенную локализацию, может служить надежным диагностическим маркером, позволяющим быстро идентифицировать данный штамм при его коммерческом использовании.

Литература

- 1 Characterization and whole genome sequences of the *Rhodococcus* bacteriophages RGL3 and RER2 / Petrovski S. [et al.] // Archives of Virology. – 2012. – Vol. –158. – P. 601–609.
- 2 Phage life cycles behind bacterial biodiversity / T. Olszak [et al.] // Current medicinal chemistry. – 2017. – Vol. 24, №. 36. – P. 3987-4001.
- 3 PHAST: A Fast Phage Search Tool / Y. Zhou [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. 347-352.
- 4 MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24, № 8. – P. 1596-1599.
- 5 Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A. C. E. Darling [et al.] // Genome Res. – 2004. – Vol. 14, №. 7. – P. 1394-1403.
- 6 Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. – 1990. - Vol. 215, iss. 3. – P. 403-404.

Выделение природных изолятов спорообразующих микроорганизмов, обладающих высокой экзоферментативной активностью и способностью к росту в широком диапазоне условий

Шонина М.Ю., Давыдовская А.М., Лапец А.Е., Лагодич А.В.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: LagodichAV@bsu.by*

Протеолитические ферменты используются в пищевой, кожевенной, текстильной промышленности, а так же в производстве детергентов и фармацевтических препаратов, крахмала, текстиля, кожи, бумаги и продуктов гигиены [1]. В связи с широким применением протеаз возникает огромный спрос на данные ферменты. [2].

Одной из задач является получение протеаз, обладающих высокой стабильностью и активностью в широком диапазоне температур, так как многие ткани не выдерживают высоких температур, а в пищевой промышленности применяются ферменты активные как при высоких, так и при низких температурах [3].

Нами был осуществлен патентный поиск протеаз, подвергнутых модификации для повышения их биотехнологического потенциала. Была проанализирована база данных *UniProt* на наличие бактериальных протеаз, проявляющих активность в широком диапазоне условий. Было отмечено, что высокой термостабильностью и активностью обладают протеолитические ферменты, выделенные из представителей способных к росту при высоких значениях pH: *Bacillus halodurans* ATCC BAA-125, *Bacillus subtilis* 168, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Streptococcus lactis*); при низких значениях pH: *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus suntoryeus*), *Helicobacter pylori* ATCC 700392; при средних значениях pH: *Streptomyces griseus*, *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*), *Bacillus subtilis* 168; при высоких температурах: *Bacillus amyloliquefaciens* (*Bacillus velezensis*), *Brevibacillus brevis* (*Bacillus brevis*), *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*), *Geobacillus stearothermophilus* (*Bacillus stearothermophilus*), при низких температурах: *Arthrobacter aureescens* TC1.

С помощью биоинформационного анализа предсказаны локусы, ассоциированные с сохранением ферментативной активности ряда протеолитических ферментов при низких температурах. При сравнении протеаз *Sporosarcina psychrophila* (*Bacillus psychrophila*) способных к росту при низких температурах с протеазами *Bacillus subtilis* 168 (мезофил), были предсказаны позиции аминокислотных замен, ассоциированных с термолабильностью

изучаемого фермента. К числу наиболее часто встречающихся аминокислотных замен могут быть отнесены следующие: (E-A; A-E; V-S).

В ходе выполнения работы из различных природных источников были получены изоляты грамположительных микроорганизмов, предположительно относящихся к роду *Bacillus*. Для них был определен температурный интервал роста и спектр ферментативной активности. Были выявлены штаммы способные к активному росту при 65°C и один штамм при 8°C. Среди них были обнаружены изоляты с высокой протеолитической активностью. Из перспективных изолятов были получены препараты хромосомной ДНК и использованы в качестве матрицы в ПЦР для идентификации по генам 16S рНК.

Таблица – Экзоферментативная активность некоторых изолятов, выделенных из природных источников г. Минска

Место изъятия пробы	Номер пробы	Ферментативная активность		
		Расщепление казеина	Расщепление желатина	Амилолитическая активность
Лесопарк «Ангарская-2»	1-6-1	+++	+++	±
	1-4-2	-	-	+
Мкр-н Малиновка, почва возле пруда	1	+++	+++	+
	2-3	+++	-	+
	3	-	-	+
Мкр-н Малиновка, вода из пруда.	1	+++	+++	+
	5	-	-	+
Мкр-н Степянка, почва возле канала	1	-	+++	+
	4	+++	+++	+
Мкр-н Степянка, вода из канала	1	+++	+++	+
	2	+++	+++	+

Примечание. Желатин, казеин: «+++» - расщеплен практически весь; «++» - расщеплен наполовину; «+» - небольшое расщепление; «-» желатин, казеин не расщеплен. Амилолитическая активность: «+» - ярко выражена, «±» - слабо выражена, «-» амилолитическая активность отсутствует.

Литература

1. Sathiya G Production of protease from *Bacillus subtilis* and its application in leather making process / G Sathiya - International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry, Received 09 January 2013; accepted 20 February 2013.
2. Oyeleke S.B. Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation / S.B. Oyeleke, O.A. Oyewole and E.C. Egwim - Advances in Life Sciences, vol. 1, no. 2, pp. 49–53, 2011.
3. Балабан Н.П., Шарипова М.Р Практическое применение бациллярных протеаз / Балабан Н.П., Н.П. Шарипова // Ученые записки казанского университета, 2011. – Том 133, кн. 2.

Секция 2

**Микробный синтез биологически
активных соединений.**

**Генно-инженерное конструирование
микроорганизмов.**

Коллекции микроорганизмов.

Towards development of plasmacytoma cells-based expression systems utilizing alphavirus vectors: an NS0-VEE model

Keyer V.V., Shevtsov A.B., Ramankulov Y.M., Shustov A.V.

*National center for biotechnology, Korgalzhin hwy 13/5, 010000 Astana, Kazakhstan,
e-mail: info@biocenter.kz*

Plasmacytoma (myeloma) cells have large protein expression capacity, although their industrial use is confined to constituent expression systems. Vectors derived from genomes of viruses from the genus Alphavirus allow obtaining of high yields of target proteins but their use is limited to transient expression [1]. Little information was published to date on attempts to combine the myeloma cells as hosts with alphaviruses as expression vectors. An infectious clone of a model alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus (VEE) was assembled. Mutations in capsid and nsP2 genes allow for noncytopathic replication [2]. A cDNA-copy of the genome was placed in a plasmid under control of the CMV promoter for the virus rescue following DNA transfection [3]. Parameters for the virus rescue by electroporating of the infectious clone in murine myeloma cells (NS0) were optimized. The highest FFU counts (1.19×10^5 FFU per 10 μ g DNA) were produced with 2 pulses (voltage 250V, capacitance 960 μ F) and the best electroporation buffer was selected from eight buffers. Self-sustained VEE infection established in NS0 culture with high titers ($>10^8$ FFU/ml) of the virus, despite a fraction of infected cells die during 5-days observation. Further development of the NS0-VEE expression system may require addressing of apoptosis induced by VEE.

References

1. Venezuelan equine encephalitis virus variants lacking transcription inhibitory functions demonstrate highly attenuated phenotype / I. Frolov [et al.] // *Virol. J.* – 2015. – Vol. 1, №89, – P.71-82.
2. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Induces Apoptosis through the Unfolded Protein Response Activation of EGR1 / [et al.] J.Jacobs // *Virol. J.* – 2016. – Vol. 7, № 90. – P. 3558-3572.
3. Alphavirus cDNA-based expression vectors: effects of RNA transcription and nuclear export / M. Bachmann [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 5, №81, – P. 553-562.

Construction of an infectious DNA clone of yellow fever virus

Syzdykova L.R., Keyer V.V., Shevtsov A.B., Ramankulov Y.M., Shustov A.V.

National center for biotechnology, Korgalzhin hwy 13/5, 010000 Astana, Kazakhstan,
e-mail: info@biocenter.kz

Yellow fever virus (YFV) being a model representative in the genus Flavivirus, may serve as a convenient model to study aspects of molecular virology of the flaviviruses. The genus includes human pathogens having wide prevalence and some pose a risk to the population of Kazakhstan (such as tick-borne encephalitis virus, Zika virus, etc.) The vaccine strain 17D was used to construct a cDNA copy of the full-length viral genome. The cDNA was cloned in an E.coli plasmid. The 5'-end of the genome is placed under control of SP6 RNA polymerase promoter to allow producing the virus genomic RNA using in vitro transcription. The 3'-end of the genome was fused with the antigenomic ribozyme (RBZ) of hepatitis D virus. RBZ cleaves itself off upon transcription to yield the correct 3'-end. Also, a gene encoding green fluorescent protein (GFP) was placed in the genomic cDNA copy in a position preceding structural proteins. GFP insertion was done in a way to preserve the 5'-cyclization signal which important for the replication. One short intron was cloned into the cDNA at the border of the genes E-NS1 to diminish the cytotoxicity which accompanies replication of plasmids containing the flavivirus sequences in *E. coli*.

The obtained molecular clone proved to be infectious. The live virus was rescued from the infectious DNA clone upon transfecting of various amounts of the plasmid (1-10 µg) into BHK-21 cell culture. The rescued virus is capable of replication to high titers ($>10^7$ PFU/ml) and preserves capacity to produce GFP during intracellular replication for at least 5 passages. Demonstrated technology can be applied to produce replication-enhanced DNA vaccines.

References

1. Flavivirus genome organization, expression, and replication / J.M.Mackenzie [et al.] // Annu. Rev. Microbiol. – 1990. – №44, – P.649-688.
2. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1 / J.J. Schlesinger [et al.] // Virol. J. – 1986. – Vol.3, №60, – P.1153-1155.

Новая эндо-1,3(4)-β-глюканаза из бактерий *Rhizomucor* sp.

Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Калинина А.Н., Синеокий С.П.,
Федоров А.С.

НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, Москва, Россия,
электронный адрес: anna.kalininaa@yandex.ru

Эндо-1,3(4)-β-глюканаза является ферментом, катализирующим гидролитическое расщепление β-1,3- или β-1,4-связей в β-глюканах.

Главным растворимым компонентом пищевых волокон зерновых культур являются (1,3;1,4)-β-D-глюканы. Это обобщенный термин, который служит для обозначения высокомолекулярных полимеров глюкозы, связанной β(1-3) и β(1-4) гликозидными связями.

Полисахариды бета-глюканы распространены в растениях семейства злаков и найдены в составе клеточных стенок ячменя, овса, пшеницы, ржи, кукурузы, риса, сорго. Величина этого показателя качества зерна у пшеницы, ячменя, овса, ржи в целом зерне составляет соответственно: 0,6; 4,2; 3,9; 2,5%.

Бета-глюканы часто выступают как негативный фактор в усвоении питательных веществ при кормлении нежвачных животных. Дело в том, что бета-глюканы препятствуют усвоению питательных веществ. Кроме того, высокая вязкость полисахаридов способствует образованию слизей, затрудняющих пищеварение и процесс ассимиляции питательных веществ из желудочно-кишечного тракта. Все это сопровождается снижением темпов привеса домашних животных и ухудшением их внешнего вида.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния β-глюкана является применение ферментных препаратов эндо-1,3(4)-β-глюканаз, получаемых микробиологическим синтезом.

Необходимость разработки новых ферментов для сельского хозяйства обусловлена интенсивно возрастающими потребностями современного животноводства и птицеводства. Поиск новых эндо-1,3(4)-β-глюканаз с промышленно-ценными характеристиками является актуальной задачей.

В нашей лаборатории была исследована новая β-глюканаза *Rhizomucor* sp. *bgl*. Ген *bgl* из штамма *Rhizomucor* sp. Bgl, кодирует секретируемую эндо-β-1,3(4)-d-глюканазу Bgl (Е.С. 3.2.1.73), состоящую из 295 аминокислот. Была проведена гетерологичная экспрессия гена *bgl* в промышленно используемых дрожжах *Pichia pastoris*, выделен и охарактеризован рекомбинантный фермент. Нуклеотидная последовательность гена *bgl* и аминокислотная последовательность зрелого белка Bgl имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,3(4)-β-глюканазы *Rhizomucor miehei* (93% и 99% соответственно). Рекомбинантный белок Bgl показал высокую

удельную активность, рН и термостабильность, а также устойчивость к пищеварительным ферментам. Характеристики нового фермента позволяют считать его перспективным для использования в кормопроизводстве, а способность гена *bgl* эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris* открывает возможность создания высокопродуктивного промышленного штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Разработка основ биотехнологического способа получения молочной кислоты

Буко А.И.¹, Головнева Н.А.¹, Круль Л.П.², Климовцова И.А.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: andrey.buko@mail.ru

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В настоящее время интенсивно развивается биотехнология синтеза из возобновляемого растительного сырья оптически чистой молочной кислоты, что связано с ее использованием в качестве мономера для производства уникальных био- и фотодegradуемых полимерных материалов поли- α -гидроксипропионатов (полилактатов) [1]. Для полимеризации используются изомеры молочной кислоты, полученные путем ферментации различных углеводсодержащих субстратов (крахмала, патоки, молочной сыворотки, тростникового или свекольного сахар и др.) с помощью бактерий, мицелиальных или дрожжевых грибов [2]. Технология получения полилактоидов предполагает использование оптически и химически чистой молочной кислоты. При этом стоимость ее выделения и концентрирования составляет до 60 % от себестоимости продукта при тоннажном производстве. В настоящее время самым распространенным способом выделения молочной кислоты, произведенной биотехнологическим способом, является осаждение лактата кальция. Несмотря на свои недостатки (использование извести и серной кислоты, а также наличие большого количества твердых отходов в виде сульфата кальция), данный метод является самым экономичным промышленным способом выделения молочной кислоты [3]. Получение относительно чистых растворов молочной кислоты при низкой себестоимости позволит реализовать ее широкое применение в разных отраслях промышленности.

Целью данной работы явилось разработка основ биотехнологического способа получения молочной кислоты, включающего этапы ферментации мелассы и выделения молочной кислоты из культуральной жидкости.

В работе использовали кислотоустойчивый вариант штамма бактерий *E. faecalis*. Культивирование бактерий проводили в ферментере объемом 3 литра в питательной среде, включающей мелассу и дрожжевой экстракт. Для нейтрализации продуктов метаболизма использовали 40% раствор NaOH. Биомассу бактерий определяли нефелометрически при 590 нм. Общее количество углеводов оценивали антроновым методом, количество синтезированного L-лактата определяли энзиматическим методом с использованием набора фирмы Elabscience и методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе фирмы «SHIMADZU» с УФ-детектором с варьруемой длиной волны.

Молочную кислоту из культуральной жидкости выделяли путем осаждения с использованием известкового молока с последующим превращением образовавшегося лактата кальция в целевой продукт. Количество выделенной молочной кислоты определяли потенциометрическим титрованием 0,5 М раствором NaOH с использованием рН метра HANNA HI 8314.

Наиболее активный рост *E. faecalis* в заданных условиях продолжался в течение 20 ч, затем скорость роста снижалась. Интенсивное образование L-лактата наблюдалось после 48 час культивирования бактерий в условиях рН-статирования (рисунок). К 96 ч культивирования концентрация молочной кислоты составила от 37,7 до 49,6 г/л при измерении методом ВЭЖХ и ферментативным методом, соответственно.

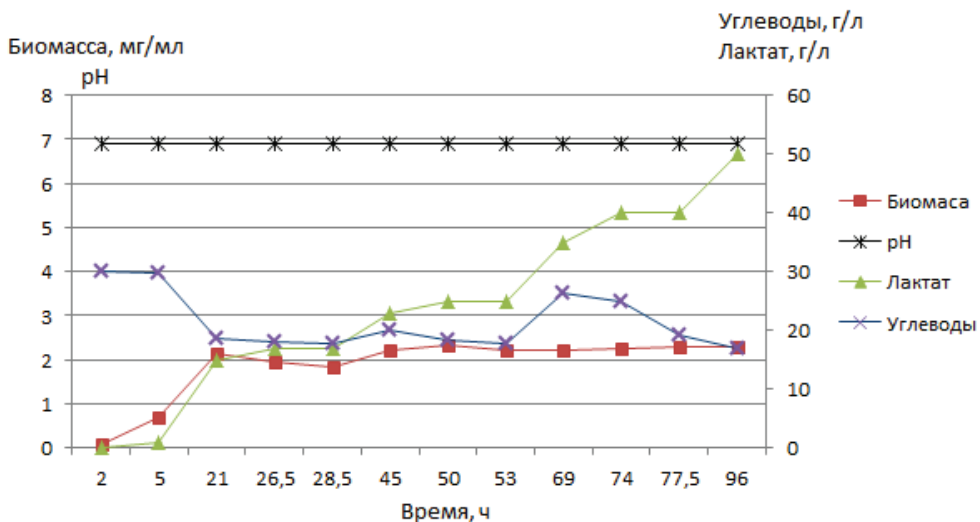


Рисунок – Динамика роста, продукции L-лактата и потребления углеводов при культивировании *Enterococcus faecalis* M4 на мелассе

При осаждении молочной кислоты известковым молоком из культуральной жидкости удалось выделить более 20 % L-молочной кислоты, что подтверждает приемлемость этого метода для очистки продукта, однако требуется дальнейшая обработка культуральной жидкости для достижения экономической эффективности процесса.

Литература

1. John, RP. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives / R.P. John, K.M. Nampoothiri, A. Pandey // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2007. Vol.3. - P. 524-534.
2. Nancib A. The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* / A. Nancib, N. Nancib, A. Boubendir, J. Boudrant // Braz. J. Microbiol. - 2015. - Vol. 46, № 3. - P. 893-902.
3. Pal, P. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes / P. Pal, S. Roy, J. Sikder, L. Giorno // Chem. Eng. Process. Intens. – 2009. – Vol. 48. – P. 1549-1559.

Бактериофаг *Pseudomonas phage BV-70* и способы его консервации

Герасимович А.Д., Новик Г.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

Серьезной проблемой растениеводства являются фитопатогенные микроорганизмы, приводящие ежегодно к 30% потерь в мировом сельскохозяйственном производстве. Бактерии рода *Pseudomonas* вызывают некрозы, увядания, опухоли, ожоги и гниль тканей, а также бактериозы корней различных сельскохозяйственных растений [1]. Учитывая значительную распространенность в природе, большое внимание уделяется мониторингу численности данных микроорганизмов. Использование бактериофагов с целью типирования культур рода *Pseudomonas* в комплексе с другими методами идентификации, позволяет получить более достоверные и четкие результаты [2]. В связи с выше изложенным, приобретают актуальность расширение коллекций фагов и разработка эффективных методов длительного хранения вирусных частиц.

Бактериофаг *Pseudomonas phage* БИМ BV-70, активный в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas fluorescens* БИМ В-582, выделен из листьев винограда, имеющих признаки бактериального поражения. На газоне чувствительных культур образует крупные (6-7 мм), прозрачные негативные колонии, с признаками вторичного роста, с четко очерченным краем и ореолом вокруг колонии. Оптимальный температурный режим для бактериального лизиса $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Оптимум pH – 7-7,5, однако вирус сохраняет литическую активность в диапазоне pH – 6-8. Максимальный титр фага в данных условиях составляет $2-8 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Обработка лизата хлороформом в концентрациях 1%, 5% и 10% в течение 30 минут не оказывает существенного влияния на активность бактериофага, титр составляет $7-8 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

Исследуемый фаг обладает выраженной специфичностью по отношению к *P. fluorescens* (спектр литической активности – 71% от выборки штаммов). Вирус также активен против *P. koreensis* и *P. syringae*, и не способен лизировать исследованные штаммы *P. putida*. Отсутствие лизиса на газоне фитопатогенных бактерий родов *Pectobacterium*, *Xanthomonas* и *Erwinia* свидетельствует о строгой специфичности BV-70 по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*.

Согласно литературным данным, наибольший уровень жизнеспособности фагов, лизирующих бактерии рода *Pseudomonas*, достигается при замораживании со сверхбыстрой скоростью охлаждения, путем прямого погружения в жидкий азот и последующего длительного хранения при

сверхнизких температурах [3]. Однако из-за необходимости и сложности постоянного поддержания нужного уровня жидкого азота, наиболее приемлемым вариантом является криоконсервация с быстрой скоростью охлаждения, и хранение при -70°C . Выживаемость BV-70 в данных условиях составляет 43-49%. Присутствие в среде 10%-ного глицерола, в качестве криопротектора, позволяет увеличить уровень жизнеспособности вируса (регистрируемое количество негативных колоний) на 22-24%. Хранение в лиофилизированном состоянии обеспечивает сохранение жизнеспособности фага на уровне 46-55% от исходных показателей (таблица).

Таблица – Выживаемость фага BV-70 при лиофилизации и криоконсервации

Срок хранения	Ллиофилизация		Криоконсервация (-70°C)			
			Без криопротектора		Глицерол (10%)	
	Титр, БОЕ/мл	%	Титр, БОЕ/мл	%	Титр, БОЕ/мл	%
Контроль	$(3,75 \pm 0,76) \times 10^{10}$	100	$(3,37 \pm 0,44) \times 10^{10}$	100	$(2,89 \pm 0,71) \times 10^{10}$	100
24 часа	$(2,08 \pm 0,25) \times 10^{10}$	55	$(1,65 \pm 0,56) \times 10^{10}$	49	$(2,06 \pm 0,21) \times 10^{10}$	71
3 года	$(1,73 \pm 0,63) \times 10^{10}$	46	$(1,45 \pm 0,44) \times 10^9$	43	$(1,94 \pm 0,13) \times 10^{10}$	67

Изученные способы консервации не оказывают существенного влияния на скорость лизиса индикаторной культуры бактериофагом BV-70. При добавлении вируса в культуру хозяина в течение первых 30-40 минут наблюдается увеличение оптической плотности среды, обусловленное ростом клеток, а через 70-80 минут бактерии полностью лизируются. При этом хранение фага в среде без протектора приводит к увеличению латентного периода размножения фага на 10-20 минут.

Таким образом, результаты исследований показали, что *Pseudomonas phage* БИМ BV-70 является специфичным по отношению к штаммам *P. fluorescens*, *P. koreensis* и *P. syringae*, и может быть использован для фаготипирования бактерий рода *Pseudomonas*. Бактериофаг обладает устойчивостью к хлороформу в концентрации 1-10% и к щелочным условиям среды, а также стабильностью при длительном хранении с использованием следующих методов:

- замораживание с быстрой скоростью охлаждения с использованием в качестве криопротектора 10% глицерола и хранение при -70°C .
- лиофилизация с применением в качестве протектора 10% обезжиренного молока.

Литература

1. Martins, P.M.M. Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? / Martins P.M.M., Merfa M.V., Takita M.A., De Souza A.A. // Front Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1099.
2. Викторов Д. А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas chlororaphis* / Д. А. Викторов, Т. А. Гринева, Д. А. Васильев // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2014. – № 2. – С. 45-49.
3. Штамм бактериофага *Pseudomonas phage*, обладающий литической активностью в отношении фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*, и способы его консервации: пат. ВУ 20968 / Г. И. Новик, Э. И. Коломиец, А. Д. Герасимович, Е. И. Ладутько. – Оpubл. 10.01.2017

Новая фитаза из бактерий *Kosakonia sacchari*

Гордеева Т.Л.¹, Борщевская Л.Н.¹, Калинина А.Н.¹, Синеокий С.П.¹,
Каширская М.Д.², Воронин С.П.²

¹НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика, Москва, Россия,
электронный адрес: anna.kalinina@yandex.ru

²АО «Биоамид», Саратов, Россия

Фитазы (мио-инозитол гексакисфосфат фосфогидролазы) являются важными ферментами для кормопроизводства. Они гидролизуют фитат (мио-инозитол гексакисфосфат), отщепляя фосфатные группы. Фитаты являются основной формой хранения фосфора в растениях. Однако такие животные, как свиньи, бройлеры, индюшки не способны усваивать фитатный фосфор из-за отсутствия необходимого фермента в пищеварительном тракте. Кроме того, фитаты являются хелатирующими агентами и препятствуют эффективному усвоению кальция, магния, цинка, железа и других минеральных веществ, а также связывают белки в недоступные для переваривания комплексы.

Наиболее эффективным способом снижения негативного влияния фитатов является применение ферментных препаратов фитаз, получаемых микробиологическим синтезом. Они с успехом используются в качестве кормовой добавки, значительно повышая усвоение фосфора.

Необходимость поиска новых ферментов для сельского хозяйства обусловлена интенсивно возрастающими потребностями современного животноводства и птицеводства. Основное место на рынке РФ занимают импортные ферментные препараты, тогда как выпуск отечественных препаратов весьма ограничен.

Поиск новых фитаз с промышленно-ценными характеристиками для импортозамещения ферментных кормовых добавок является актуальной задачей.

В нашей лаборатории была изучена новая перспективная фитаза из бактерий *Kosakonia sacchari*. Ген *phyS3*, кодирующий зрелую часть белка, состоящую из 407 аминокислот, был синтезирован с учетом правила оптимальности кодонов для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Была проведена гетерологичная экспрессия гена *phyS3* в промышленно используемых дрожжах *Pichia pastoris*, выделен и охарактеризован рекомбинантный фермент. Аминокислотная последовательность зрелого белка S3 имеет наибольшую гомологию с последовательностью фитазы *Citrobacter werkmanii*, которая составляет 76,85%. Рекомбинантный белок S3 показал высокую удельную активность, рН и термостабильность, а также устойчивость к пищеварительным ферментам. Характеристики нового фермента позволяют

считать его перспективным для использования в кормопроизводстве, а способность гена *phyS3* эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris* открывает возможность создания высокопродуктивного промышленного штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI57917X0145) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

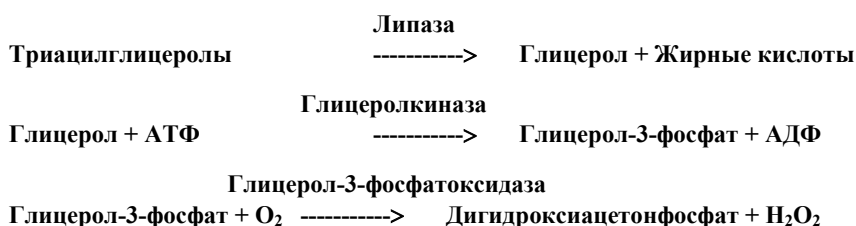
Конструирование вектора для экспрессии гена глицерол-3-фосфатоксидазы

Демешко О.Д., Семашко Т.В., Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
электронный адрес: demeshkoo@mail.ru

Определение концентрации глицерола – важная задача аналитической биотехнологии. Это связано с использованием данного соединения в различных отраслях промышленности. Глицерол является одним из метаболитов спиртового брожения, определяющий вкусовые качества напитков и пищевых продуктов. Его используют при производстве косметических средств и лекарственных препаратов. Необходимость детекции триглицеридов в крови человека связано с выявлением патологий липидного обмена приводящих к различным заболеваниям [1].

Энзиматическое определение глицерола и триглицеридов основано на каскаде реакций:



Методика определения триглицеридов основывается на последовательно протекающих реакциях: липаза катализирует гидролиз триглицеридов. Глицерол подвергается фосфорилированию в присутствии глицеролкиназы. Глицерол-3-фосфат окисляется глицерол-3-фосфатоксидазой до дигидроксиацетонфосфата с выделением перекиси водорода. Перекись водорода в реакции с 4-аминоантипирином в присутствии пероксидазы образует окрашенный продукт, определяемый фотометрическим методом.

На предыдущем этапе работы был получен штамм-продуцент гомологичной ГК *E. coli*.

Цель работы: создание генно-инженерного штамма *E. coli*, несущего ген глицерол-3-фосфатоксидазы.

Изучение баз данных Brenda и Kegg показало, что продуцентами данного фермента могут выступать такие микроорганизмы, как *Aerococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus* sp. и др. На предыдущем этапе работ при проведении скрининга среди прокариот были

отобраны штаммы *E. faecalis* и *Pediococcus* sp. в качестве источников гена глицерол-3-фосфатоксидазы.

Источниками генов глицерол-3-фосфатоксидазы служила геномная ДНК штаммов *E. faecalis* и *Pediococcus* sp. Гены были встроены в плазмиду pET42a+ под контролем сильного T7-промотора. Конструирование вектора осуществляли методом продолжительно перекрывающейся полимеразной цепной реакции (ПП-ПЦР) [2].

К гену с 3'-конца кодирующей цепи была добавлена дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая октагистидиновый олигопептид, выполняющий роль аффинного домена к Ni²⁺-NTA-смоле. На 5'-конце праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42a+ («Novagen», США). На первом этапе целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров. На втором этапе линейаризовали данную плазмиду методом ПЦР. На следующем этапе вводили ген в линейаризованную pET42a+ с помощью метода ПП-ПЦР. В качестве матрицы и затравки использовались фрагменты, полученные на первых двух этапах в эквимольных количествах. Все продукты амплификации детектировали при помощи агарозного гель-электрофореза.

Синтезированным с помощью ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL (DE3), с последующим высевом на плотную питательную среду Luria–Bertani (LB) с добавлением канамицина в качестве селективного маркера. После трансформации для детекции наличия встроенной плазмиды с геном проводили ПЦР-скрининг. Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки», часть одиночной колонии отбирали при помощи стерильного наконечника и вносили в реакционные смеси для ПЦР. В качестве ДНК-затравки использовали праймеры к последовательности T7-промотора и к последовательности, кодирующей целевой белок (glpOxEn_E_R и glpOxPed_E_R).

В результате были отобраны штаммы-продуценты рекомбинантной глицерол-3-фосфатоксидазы *E. faecalis* и *Pediococcus* sp., молекулы которых содержат октагистидиновый олигопептид на С-конце. Новые штаммы были обозначены как *E. coli* pGlpOx Ent и *E. coli* pGlpOx Ped, соответственно.

Литература

1. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide / P. Fossati [et al.] // Clin. Chem. – 1982. – Vol. 28, № 10. – P. 2077–2080.
2. Quan, J. Circular Polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, N 7. – P. 1–6.

Получение аналогрезистентных мутантов бактерий *Pseudomonas fluorescens* способных к сверхсинтезу индолил-3-уксусной кислоты

Заинчковская А.Н., Храмцова Е.А.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: annazainchkovskaya@mail.ru*

Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур и повышение их устойчивости и адаптации к неблагоприятным агроклиматическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными для сельского хозяйства, а также для решения экологических проблем и охраны окружающей среды. Особенно важны в этом отношении микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и микроорганизмов, а также процессах их взаимодействия в растительно-микробных системах. Наиболее перспективными микроорганизмами для разработки на их основе агробιοтехнологических способов повышения урожайности растений являются представители рода *Pseudomonas*, относящиеся к PGPR-группе (от Plant Growth-promoting Rhizobacteria) – ризобактерии, способствующие росту растений [1].

Одним из важнейших механизмов, который используется бактериями PGPR-группы для стимуляции роста растений, является продукция ими фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). В ответ на действие неблагоприятных факторов окружающей среды в растительных клетках в избыточном количестве образуется гормона этилен («стрессовый» этилен), который действует угнетающе на растения, подавляя развитие корней, стеблей, образование и рост листьев [2]. Снижение количества «стрессового» этилена, могут осуществлять бактерии, продуцирующие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазу (АЦК-дезаминазу) путем дезаминирования непосредственного предшественника этилена, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) [3]. В связи с этим, одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание, с помощью генетических и гено-инженерных подходов, высокоактивных штаммов ризосферных бактерий, способных к сверхсинтезу ИУК и АЦК-дезаминазы, и разработка приемов их использования для стимуляции роста сельскохозяйственных растений.

Повышение концентрации ИУК способствует уменьшению уровня «стрессового» этилена, что позволяет снизить его негативный эффект на растение.

Бактерии *Pseudomonas fluorescens* относятся к PGPR-группе и являются непатогенными организмами, которые обитают в почве, воде и на поверхности растений. Ранее было показано, что бактерии *P. fluorescens* способны к синтезу ИУК (4-8 мкг/мл), а также синтезируют высокоактивную АЦК-деаминазу.

Триптофан является основным предшественником в пути биосинтеза ИУК. В связи с этим, одним из путей повышения выхода ИУК является использование мутантов, устойчивых к аналогам триптофана.

На первом этапе работы был проведен подбор оптимальной концентрации нитрозогуанидина и условий проведения химического мутагенеза бактерии *P. fluorescens*. Было установлено, что оптимальная доза мутагена составляла 100 мкг/мл и время обработки культуры мутагеном составляет 30 мин. Обработанные мутагеном клетки высевали на среду, содержащую один из аналогов триптофана (NL-ацетил-DL-триптофан, 5-метил-триптофан).

В первом эксперименте в качестве аналога был использован NL-ацетил-DL-триптофан. Показано, что все выделенные регуляторные мутанты *P. fluorescens* продуцируют ИУК(30-35мкг/мл), что в 6 раз, чем клетки дикого типа.

После проведения повторного мутагенеза с аналогом триптофана (5-метил-триптофан) были получены аналогрезистентные мутанты бактерий *P. fluorescens* синтезирующие ИУК в 1.5-1.7 раза больше чем полученные ранее (таблица).

Таблица – Количество ИУК, синтезируемое мутантами

Штаммы	ИУК, мкг/мл
1	66±1,5
2	65±0,5
3	75±1,6

Таким образом, в ходе данной работы были получены штаммы, синтезирующие ИУК практически в 10 раз выше чем бактерии дикого типа.

Литература

1. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25–31.
2. Ma, W. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants / W. Ma, F.C. Guinel, B.R. Glick // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. - V.69 – N.8. – p.4396-4402.
3. Glick, B.R. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria / B.R. Glick, D.M. Penrose, J. Li // J. Theor. Biol. – 1998. – V.190. – p.63–68.

Коллекция культур промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз

Зайнитдинова Л.И.

*Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: zajn-lyudmila@yandex.ru*

Коллекция культур промышленно-важных микроорганизмов создавалась на протяжении более 40 лет и постоянно пополняется новыми культурами, выделяемыми в результате выполнения научных проектов Института микробиологии АН РУз. Коллекция включает в себя непатогенные для человека и некарантинные для животных культуры микроорганизмов 4-х физиологических групп (бактерии, микроскопические грибы, актиномицеты, дрожжи). Коллекция культур промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АН РУз является уникальной научной единицей в Республике Узбекистан и занимается выявлением, исследованием и сохранением микроорганизмов в Центральноазиатском регионе.

В настоящее время, коллекция Института микробиологии АН РУз включает более 2800 штаммов местных микроорганизмов. Многие штаммы представляют практический интерес, а ряд активных культур используется фармацевтическими и пищевыми предприятиями Узбекистана для производства своей продукции. В биотехнологической продукции используются десятки культур; в основном они используются для производства пива, вина, спирта, ферментов, хлебобулочных изделий, белков, витаминов, антибиотиков, органических кислот и других продуктов. Более того, коллекционный фонд содержит бактериальные культуры, способные разрушать ароматические соединения, синтезировать наночастицы металлов, а также геохимические активные микроорганизмы. Коллекция содержит бифидо- и лактобактерии – микроорганизмы, используемые в производстве молочнокислых и других препаратов.

Актиномицеты, хранящиеся в коллекции, включают представителей родов *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Thermomonospora* и *Nocardia*, активных продуцентов антибиотиков и штаммы, сорбирующие серебро.

Группа бактерий содержит более 1200 штаммов, состоящих из 22 родов и 64 видов. Они составляют основу многих биоудобрений (азотобактер, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Synorhizobium*), участвуют в разрушение сульфидов и окисляют различные металлы (*Acidithiobacillus*), разрушают ароматические соединения (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*). Ряд штаммов являются тест-культурами, позволяющими судить об эффективности антибактериальной деятельности (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*), ряд культур

являются продуцентами антибиотиков и витаминов (*Bacillus*, *Propionibacterium*), основу специализированных молочных продуктов составляют (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), используемых в качестве биоконтроля в сельском хозяйстве (*Bacillus*, *Pseudomonas*).

В коллекции содержится более 1000 микроскопических грибов, которые состоят из более 330 штаммов. Многие из этих грибов являются продуцентами антибиотиков (*Penicillium*, *Acremonium*), образуют высокоактивные ферменты (*Aspergillus*), органические кислоты (*Aspergillus*), белок (*Penicillium*, *Trichoderma*), стимулируют рост растений (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Actinomucor*, *Cunninghamella*, *Gliocladium*), фитопатогены (*Verticillium*, *Fusarium*) и патогены насекомых (*Bauveria*, *Acremonium*, *Paelelomyces*).

Дрожжевые грибы составляют приблизительно 180 штаммов. Среди них продуценты пищевых ферментов и белков (*Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debariomyces*), витаминов группы В и каротиноидов (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Zigosaccharomyces*). Используются дрожжи в производстве пива (*Saccharomyces carlsbergensis*), вина (*Saccharomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Schizosaccharomyces*) и хлебобулочных изделий (*Saccharomyces cerevisiae*). *Candida albicans* из второй группы считаются тестовыми культурами в коллекции.

Имеющиеся культуры предоставляются для выполнения научных проектов и проведения исследований, как в Институте микробиологии, так и в других научных и образовательных учреждениях. Кроме того, коллекция предоставляет свои услуги для депонирования штаммов микроорганизмов с целью их патентования и принимает вновь выделенные микроорганизмы с целью длительного хранения.

Создание штамма-продуцента рекомбинантного мутантного сладкого белка – браззеина

Казловский И.С.¹, Бельская И.В.², Зинченко А.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: grafleo139@gmail.com

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Глобальное распространение в последнее время ожирения и сахарного диабета привело к взрывообразному интересу к безопасным и низкокалорийным натуральным подсластителям с благоприятными вкусовыми свойствами.

Среди всех известных белков сладкого вкуса, браззеин является самым стабильным и с самым удовлетворительным послевкусием, что делает его одним из самых привлекательных, особенно принимая во внимание его интенсивную сладость [1].

Браззеин был изолирован из мякоти фруктов Западно-Африканского растения *Pentadiplandra brazzeana*. Он является одноцепочечным белком с молекулярной массой 6,49 кДа, а также очень хорошо растворимым белком в воде [2]. Благодаря присутствию в молекуле четырех дисульфидных мостиков, браззеин является стабильным в отношении pH (от 2,5 до 8) и температуры. Так, сообщалось [2], что браззеин остается сладким после инкубации в течение 2 ч при 98°C или 4,5 ч при 80°C.

Сообщалось, что водный раствор браззеина (40 г/л) слаще сахарозы в 1 900 раз [3].

Таким образом, благодаря интенсивной сладости, хорошим вкусовым характеристикам и долгой истории употребления людьми и приматами, браззеин можно рассматривать как весьма перспективный природный подсластитель. Кроме того, браззеин обладает физико-химическими свойствами (высокая водорастворимость, высокая pH- и термостабильность), которые существенны для пищевого применения. Главная проблема, тормозящая использование браззеина в промышленности – трудности получения сладкого белка из его природного источника [3, 4].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явилась конструирование штамма-продуцента рекомбинантного мутантного браззеина, имеющий усиленную сладость.

Ген, кодирующий браззеин, был синтезирован химически (Праймтех, Беларусь) основываясь на его известной аминокислотной последовательности. В первичную структуру гена были введены три мутации путем сайт-специфического мутагенеза. При помощи продолжительной

перекрывающийся ПЦР ген мутанного браззеина был встроен в вектор рЕТ42а(+). Созданной генетической конструкцией были трансформированы электрокомпетентные клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3).

В результате выполнения работы получен новый генно-инженерный штамм *E. coli* mBra – продуцент мутантного сладкого белка. Для этого в первичной структуре природного белка были произведены следующие аминокислотные замены: Н31R, Е36D и Е41А. На завершающем этапе работы были подобраны условия экспрессии гена, выделения и очистки мутантного браззеина. Содержание основного вещества в полученном препарате составило около 99%.

Таким образом, результаты исследования могут лечь в основу создания технологии получения сладкого белка – браззеина как потенциального бескалорийного сахарозаменителя белковой природы.

Литература

1. Ming, D. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* / D. Ming, G. Hellekant // FEBS Lett. – 1994. – Vol. 355, N 1. – P. 106–108.
2. Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris* / N. Poirier [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 2012. – Vol. 60, N 39. – P. 9807–9814.
3. Hellekant, G. Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, *Macaca mulatta* / G. Hellekant, V. Danilova, Y. Ninomiya // J. Neurophysiol. – 1997. – Vol. 77, N 2. – P. 978–993.
4. Protein sweetener [Electronic resource]: pat. PCT/US2008/055913 / F.M. Assadi-Porter. – Publ. date 18.09.2008. – Mode of access: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2008112475&redirectedID=true>. Date of access: 03.04.2019.

Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента браззеина

Казловский И.С.¹, Лемеза Д.А.², Зинченко А.И.^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: grafleo139@gmail.com

²МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь

Глобальное увеличение ожирения и сахарного диабета вызвало взрывной интерес во всем мире к полезным и низкокалорийным натуральным подсластителям с благоприятными вкусовыми качествами. Браззеин – это небольшой (6,49 кДа), термо- и рН-стабильный белок, обладающий сладким вкусом, который был выделен из мякоти плода западноафриканского растения *Pentadiplandra brazzeana* [1, 2]. Также, браззеин характеризуется хорошей водорастворимостью (более 50 г/л) с изоэлектрической точкой 5,4. Этот белок не проявляет ни горького, ни металлического привкуса и имеет исключительно высокий уровень сладости. Сладость браззеина в концентрации 40 г/л в 1900 раз выше, чем у сахарозы [2]. В связи с трудностями получения браззеина из его природного источника, возникает необходимость создания генно-инженерных технологий получения этого белка [3].

Исходя из вышеперечисленного, целью данной работы стало создание штамма-продуцента браззеина и описание основных физико-химических свойств полученного рекомбинантного белка.

Ген *qbra*, кодирующий браззеин, был получен методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды, содержащей химически синтезированный ген браззеина, и встроен в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы компетентные клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3).

В результате выполнения работы был получен новый генно-инженерный штамм *E. coli* Qbra – продуцент браззеина, а также был наработан и выделен целевой белок, с содержанием основного продукта в препарате около 98%.

Таким образом, результаты исследования могут лечь в основу технологии получения браззеина.

Литература

1. Neierse, F. The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications / F. Neiese [et al.] // *Sweeteners*, Springer. – 2016. – P. 1–20.
2. Faus, I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins / I. Faus // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53, № 2. – P. 145–151.
3. Hellekant, G. Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, *Macaca mulatta* / G. Hellekant, V. Danilova, Y. Ninomiya // *J. Neurophysiol.* – 1997. – Vol. 77, N 2. – P. 978–993.

Аннотация векторных конструкций, для создания коллекции генетических конструкций для генно-инженерных целей

Казловский И.С., Чеботарёв Л.Ю., Охремчук А.Э., Булатовский А.Б., Зинченко А.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
электронный адрес: grafleo139@gmail.com*

Генетическая конструкция – это полученная *in vitro* комбинация генетических элементов, то есть искусственно созданная рекомбинантная нуклеотидная последовательность, необходимая для переноса или экспрессии заданных нуклеотидных последовательностей в клетки-реципиенты [1].

Генетические конструкции являются важнейшим инструментом генетической инженерии. Рекомбинантные молекулы ДНК при внедрении в генетический аппарат реципиентного организма сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства. С помощью таких молекул возможно получение «биологических реакторов» – микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с новым набором хозяйственно ценных признаков. Генетические конструкции также используют для проведения генетической паспортизации, диагностики генетических заболеваний, создания ДНК-вакцин, проведения генотерапии различных заболеваний и др. [2].

К настоящему времени создано огромное количество векторов, удовлетворяющих различным требованиям исследователей. Их образцы хранятся в специализированных коллекциях, использование генетических ресурсов которых позволяет выбрать оптимальные вектора для заданных условий эксперимента. Генетические банки предоставляют структурированную информацию об имеющихся аннотированных генетических ресурсах и обеспечивают возможность повторного приобретения стандартизированных образцов рекомбинантных ДНК [3].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы явился молекулярный и биоинформатический анализ векторных конструкций, имеющихся в Институте микробиологии НАН Беларуси, для дальнейшего создания коллекции генетических (векторных) конструкций для генно-инженерных целей.

На первом этапе работы были выбраны 5 векторов: pCB20, pCB20 Blue, pRFP-Nadya, pSDG2-EFGP, pETCH1.8, pLACH1.5, pLACH2.6 и pET-11c-YFP, для дальнейшей работы по уточнению последовательностей и полной аннотации векторов.

На втором этапе, вышеупомянутыми плазмидами трансформировали соответствующие клетки-реципиенты с целью проведения молекулярного клонирования. Из биомассы трансформированных клеток бактерий методом щелочного лизиса выделяли нехромосомную фракцию нуклеиновых кислот в количестве, пригодном для дальнейшего анализа.

На третьем этапе были установлены полные или частичные нуклеотидные последовательности векторных конструкций, используя различные подходы: рестрикционное картирование, полимеразная цепная реакция со специфическими праймерами, направленное секвенирование небольших локусов наиболее значимых генетических детерминант, установление полной нуклеотидной последовательности *de novo*.

На заключительном этапе работы с помощью биоинформатического анализа провели аннотацию полученных векторов. В результате были уточнены и описаны *de novo* генетические детерминанты и их расположение, а также установлены сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции.

В результате работы, были проведены аннотации 5 векторных конструкций: pCB20, pCB20 Blue, pRFP-Nadya, pSDG2-EFGP, pETCH1.8, pLACH1.5, pLACH2.6 и pET-11c-YFP, и при помощи полученных данных и биоинформатического инструментария были созданы графические карты этих векторов.

Таким образом полученные данные могут лечь в основу создания коллекции генетических (векторных) конструкций для генно-инженерных целей на базе Института микробиологии НАН Беларуси.

Литература

1. Скуратовская, О.Д. Генетическая конструкция как объект изобретения / О.Д. Скуратовская // Патенты и лицензии. – 2005, № 5. – С. 7–11.
2. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин. – Санкт-Петербург: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
3. Addgene – Homepage [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.addgene.org/>. – Дата доступа: 19.04.2019.

Новая эндо-1,4-ксилаза из бактерий *Pyromyces finnis*

Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синеокий С.П.

НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика, Москва, Россия,
электронный адрес: anna.kalininaa@yandex.ru

Ксиланы (гемицеллюлозы) являются одними из основных структурных компонентов клеточной стенки растений и составляют примерно треть возобновляемой растительной биомассы на Земле. Это гетерополимеры, которые состоят из линейной цепочки соединенных β -1,4-гликозидными связями остатков D-ксилозы, частично ацетилированных и имеющих в боковых цепях заместители в виде остатков D-глюкуроновой кислоты, α -L-арабинозы, феруловой и п-кумаровой кислот.

Главными компонентами комплекса ферментов, осуществляющих деструкцию ксиланов в природе, являются эндо-1,4- β -ксилазы, или просто ксиланазы (КФ 3.2.1.8), катализирующие неупорядоченный гидролиз гликозидных связей между остатками D-ксилозы в основной цепи полимера. Основными источниками ксиланаз являются микроорганизмы – бактерии, археи, микроскопические грибы и дрожжи. Ксиланазы нашли широкое применение в процессах биоконверсии лигноцеллюлозных отходов, при биоотбеливании целлюлозы в целлюлозно-бумажной промышленности, как компоненты комбикормов для сельскохозяйственных животных и птиц, а также в хлебопечении. Стоит, однако, отметить, что не все применяемые на практике ферментные препараты ксиланаз обладают необходимыми свойствами: достаточной термостабильностью, высокой удельной активностью, а также устойчивостью по отношению к белковым ингибиторам злаков, открытым в конце прошлого века. Последние оказывают негативное действие на ксиланазы при гидролизе ксиланов, содержащихся в зерне злаков, в частности при использовании этих ферментов в качестве компонентов комбикормов. Поэтому поиск новых эндо-1,4-ксилаз, разработка высокоактивных рекомбинантных штаммов-продуцентов кормовых ферментов и масштабируемых технологий ферментации является актуальной задачей.

Была исследована новая эндо-1,4- β -ксилаза XylP *Pyromyces finnis* (Е.С. 3.2.1.8), состоящая из 223 аминокислот. Была проведена гетерологичная экспрессия гена *xylP* в промышленно используемых дрожжах *Pichia pastoris*, выделен и охарактеризован рекомбинантный фермент. Нуклеотидная последовательность гена *xylP* и аминокислотная последовательность зрелого белка XylP имеют наибольшую гомологию с последовательностями эндо-1,4- β -ксилазы *Pyromyces communis* (81% и 86%, соответственно). Рекомбинантный белок XylP показал высокую удельную активность, pH и

термостабильность, а также устойчивость к пищеварительным ферментам и белковым ингибиторам ксиланаз. Характеристики нового фермента, а также способность гена *хлР* эффективно экспрессироваться в дрожжах *Pichia pastoris* позволяют считать его перспективным для использования в кормопроизводстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта - RFMEFI60717X0180) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.

Поиск новых штаммов бактерий, проявляющих липолитическую активность

Курманбаев А.А., Байгонусова Ж.А.

*Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан
электронный адрес: zhanatb71@mail.ru*

В связи с развитием в последние годы пищевых предприятий и расширением сети быстрого питания, серьезными проблемами становятся очистка и удаление отложений жиров в канализационных системах предприятий и утилизация жира в жиरोуловителях.

Состояние водной среды, особенно в индустриально развитых регионах, заставляет вводить в действие все более жесткие нормативы на сброс загрязнений в водоемы и городские коллекторы. Одним из перспективных способов решения проблем утилизации органических отходов является биоферментная технология разложения, в том числе жиров и растительных масел на локальных очистных сооружениях, находящихся непосредственно на предприятиях [1, 2].

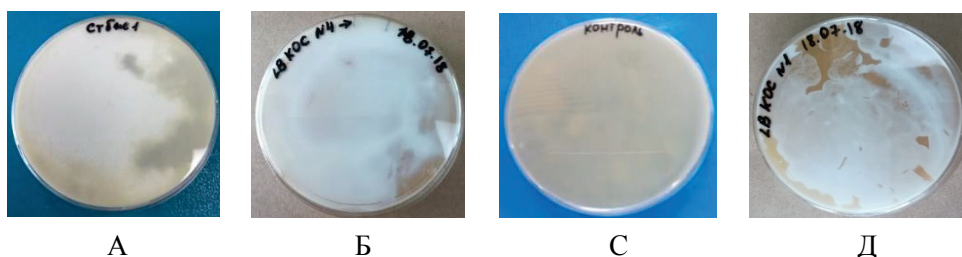
Биоферментные технологии по разложению и утилизации жиров в сточных водах основаны на использовании микроорганизмов способных к продуцированию липаз. Однако, на сегодняшний день на рынке Казахстана представлены лишь несколько препаратов импортного происхождения. Таким образом, поиск активного продуцента липаз, который мог бы стать основой биопрепарата для локальной очистки жиросодержащих сточных вод, является весьма актуальным.

Первичное качественное определение липолитической активности, позволяющее установить наличие липазы, проводили на твердых жирах (говяжьим) с соевой мукой, по образованию белого ореола вокруг колоний бактерий (рис. 1).

По результатам опыта из 26 выделенных изолятов активными изолятами оказались 16 изолятов: Fd 1, Fd 3, Fd 4, Fd 5, Fd 12, Fd 13, Fd 9, Fd 15, Fd 16, Fd 17, Fd 24, Fd 27, Fd 22, Fd 19, Fd 25, Fd 23, среди которых наиболее активными было 6 штаммов.

Таким образом, изучение деструктивной активности новых выделенных штаммов деструкторов дает возможность пополнить коллекцию производственно-ценных штаммов микроорганизмов деструкторов органических веществ.

Было отобрано 26 изолятов и произведена количественная оценка липолитической активности бактерий в отношении подсолнечного масла (рис. 2).



А – изолят Стбж (Fd 1) на твердой питательной среде МПА с говяжьим жиром и соевой мукой; Б - изолят LB КОС 4 (Fd 21) на твердой питательной среде LB с говяжьим жиром соевой мукой; С – контроль на твердой питательной среде МПА с говяжьим жиром без соевой муки; Д – изолят LB КОС 1(Fd 16) на твердой питательной среде LB с говяжьим жиром и соевой мукой

Рисунок 1 – Рост на твердых средах жирорасщепляющих изолятов из накопительной среды



Рисунок 2 – Результаты количественной оценки липолитической активности выделенных изолятов

Работа выполнена в рамках научно-технической программы 0.0809 «Создание биобанка микроорганизмов, клеточных культур, геномных и генно-инженерных материалов для сохранения биоразнообразия и обеспечения ресурсной базы биотехнологий на 2018-2020 годы».

Литература

1. Молоканов Д.А., Молчан А.В., Хайруллин Р.С. Очистка сточных вод предприятий пищевой промышленности // Пищевая промышленность. - 2005. № 4. - С. 15-17.
2. Новохатко Т.Н., Михельсон А.М. Технологии биоферментной очистки сточных вод пищевых предприятий // Материалы III Международной научно-техн. конф. «Наука, образование, производство в решении экологических проблем». - Уфа.: НИИ БЖД РБ, 2006. - Т.2. - С.79-81.

Создание генетической конструкции для получения клеток *Escherichia coli*, продуцирующих человеческий сапосин С

Ладысюк В.А.², Булатовский А.Б.¹, Казловский И.С.¹, Зинченко А.И.^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова БГУ, Минск, Беларусь, электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by

Результаты исследований, проведенных учеными США [1], показали, что новое экспериментальное лекарственное средство SapC-DOPS, представляющее собой белок-липидный комплекс, сформированный из человеческого белка сапосина С и фосфолипида – диолеилфосфатидилсерина, при его применении на ранней стадии развития агрессивных опухолей головного мозга способен проникать через гематоэнцефалический барьер, уничтожать раковые клетки и блокировать рост кровеносных сосудов новообразования.

В опубликованной ранее серии сообщений было показано, что комплексы SapC-DOPS являются уникальными стабильными наноразмерными образованиями, которые селективно разрушают человеческие раковые клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [2–5]. Полученные результаты свидетельствуют в пользу перспективности проведения исследований, направленных на разработку способов применения нового лекарственного препарата для лечения пациентов с опухолями головного мозга.

Создание лекарственного препарата на основе комплекса SapC-DOPS возможно только при доступности обоих его компонентов – фосфолипида диолеилфосфатидилсерина и белка сапосина С. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось создание генетической конструкции для получения клеток *Escherichia coli*, продуцирующих человеческий сапосин С.

Ген *sapC*, кодирующий сапосин С, был химически синтезирован и клонирован в плазмиду pEX A-128 фирмой «Eurofins» (Германия). Из полученного вектора с помощью рестриктаз *NdeI* и *XhoI* был вырезан ген *sapC* и встроен в вектор pET42a(+) («Novagen», США). Созданной конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* XL-1 Blue. Из полученных трансформированных клеток выделили плазмиду и проанализировали ее в агарозном гель-электрофорезе. Полученную плазмиду подвергли рестрикционному анализу и секвенированию. Было обнаружено, что размер и нуклеотидная последовательность встроенного гена сапосина С совпадают с литературными данными.

На следующем этапе была произведена трансформация клеток *E. coli* BL21(De3) полученной рекомбинантной плазмидой. Далее провели культивирование клеток с добавлением в питательную среду индуктора

экспрессии гена. Выросшую биомассу центрифугировали при 10 000 g в течении 10 мин. Полученный клеточный осадок лизировали и выделили сапосин С путём аффинной хроматографии. На заключительном этапе работы провели анализ чистоты полученного целевого белка с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле.

В результате выполнения работы сконструирована новая экспрессионная плаزمиды рЕТ42a(+)-SapC, которая может быть использована для получения бактериальных клеток, продуцирующих человеческий сапосин С.

Полученные результаты исследования могут лечь в основу создания технологии получения фармакологически перспективного белок-липидного комплекса SapC-DOPS.

Литература

1. SapC-DOPS nanovesicles induce Smac- and Bax-dependent apoptosis through mitochondrial activation in neuroblastomas / M.K. Sulaiman [et al.] // Mol. Cancer. – 2015. – Vol. 14. – Art. 78. doi: 10.1186/s12943-015-0336-y
2. Phosphatidylserine-selective targeting and anticancer effects of SapC-DOPS nanovesicles on brain tumors / V.M. Blanco [et al.] // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5. – P. 7105–7118. doi: 10.18632/oncotarget.2214
3. Imaging of brain tumors with paramagnetic vesicles targeted to phosphatidylserine / P.M. Winter [et al.] // J. Magn. Reson. Imaging. – 2014. – Vol. 41, N 4. – P. 1079–1087. doi: 10.1002/jmri.24654
4. Systemic delivery of SapC-DOPS has antiangiogenic and antitumor effects against glioblastoma / J. Wojton [et al.] // Mol. Ther. – 2013. – Vol. 21. – P. 1517–1525. doi: 10.1038/mt.2013.114
5. Enhanced phosphatidylserine-selective cancer therapy with irradiation and SapC-DOPS nanovesicles / H.W. Davis [et al.] // Oncotarget. – 2019. – Vol. 10, N 8. – P. 856–868. doi: 10.18632/oncotarget.26615

Создание генетической конструкции для нокаута генов ДАГФ-синтаз II типа у бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162

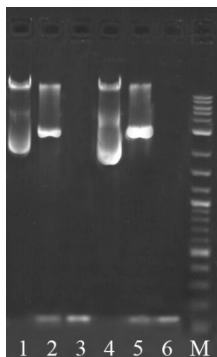
Левданская А.И., Василевская М.Е., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tassigo@gmail.com*

3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат синтаза (ДАГФ-синтаза) это фермент, катализирующий первую реакцию шикиматного пути. Известно о существовании двух типов данного фермента (I и II) [1]. ДАГФ-синтазы II типа обнаружены как в геномах бактерий, так и в геномах грибов и растений. Данный тип ДАГФ-синтаз прокариот, предположительно, влияет на синтез вторичных метаболитов в стационарной фазе роста [1, 2]. Анализ генома бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 показал наличие двух генов, кодирующих ДАГФ-синтазы II типа. Первый соответствует *phzC*-гену, входящему в состав феназинового оперона, второй находится вне оперона. Для уточнения функции ДАГФ-синтаз II типа у данных бактерий ведутся работы по получению мутантов с инактивированными генами, кодирующими эти ферменты.

Для инактивации обоих генов, кодирующих ДАГФ-синтазы II типа, были созданы генно-инженерные конструкции, состоящие из суицидальной плазмиды *pK18mob* и небольшой последовательности (~130 п.н.), соответствующей внутренней части каждого из генов, кодирующих ДАГФ-синтазы II типа. Благодаря присутствию в составе праймеров клонируемых фрагментов сайтов для рестрикции *VamHI*, наличие необходимых вставок было подтверждено с помощью ПЦР и рестрикции (рисунок).

Созданные генно-инженерные конструкции *pK18mob/phzC* и *pK18mob/DAHPII* будут использованы для нокаута обоих генов ДАГФ-синтаз II типа. Путем конъюгации данные плазмиды будут доставлены в клетки бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162. После инактивации каждого из генов можно будет сделать выводы об их роли в регуляции синтеза вторичных ароматических метаболитов, в частности феназиновых антибиотиков у бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162.



Пояснение: 1 - рК18mob/phzC, 2 – рестрикция конструкции рК18mob/phzC с помощью BamHI, 3 - ПЦР-фрагмент (130 п.н.), соответствующей внутренней части *phzC*-гена, 4-рК18mob/ДАНРІІ, 5 – рестрикция конструкции рК18mob/ДАНРІІ с помощью BamHI, 6 - ПЦР-фрагмент (130 п.н.), соответствующей внутренней части гена, кодирующую другую ДАГФ-синтазу II типа.

Рисунок – Электрофореграмма полученных генетических конструкций

Литература

1. Light, S.H. The diversity of allosteric controls at the gateway to aromatic amino acid biosynthesis / S.H. Light, W.F. Anderson // The Protein Society. – 2013. – P. 395-404.
2. Microbial origin of plant-type 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthases, exemplified by the chorismate- and tryptophan-regulated enzyme from *Xanthomonas campestris* / G. Gosset, C.A. Bonner, R.A. Jensen // J. Bacteriol. – 2001. - Vol. 183, № 13. - P. 4061-4070.

Анализ влияния *hcn*-кластера генов на антибактериальную и антифунгальную активность бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446

Муратова А.А., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: anya.muratova.93@mail.ru

В мире активно ведется поиск штаммов, эффективно стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений [1]. Бактерии *Pseudomonas brassicacearum*, продуцирующие широкий спектр метаболитов с антимикробной и ростстимулирующей активностью, являются перспективными при создании биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений [2]. Наиболее активными метаболитами, которые синтезируют данные бактерии, являются 2,4-дифлороглюцинол, пиовердин и циановодород, подавляющие рост бактериальных и грибных патогенов. Молекулярно-генетический и функциональный анализ *hcn*-кластера позволит установить роль влияния цианида водорода на рост и развитие различных патогенов.

Целью данного исследования являлся молекулярно-генетический анализ *hcn*-кластера, отвечающего за синтез циановодорода бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, стимулирующих рост и развитие растений.

Ранее нами была определена полная нуклеотидная последовательность генома бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446. Первичная обработка полученных данных позволила определить локализацию *hcn*-кластера, ответственного за синтез цианида (рисунок).

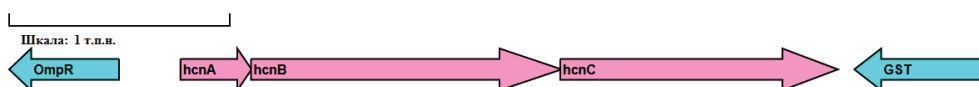


Рисунок – Строение *hcn*-кластера у бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446

Нами был оптимизирован метод безмаркерного мутагенеза бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, позволяющий направленно инактивировать гены, не внося при этом дополнительных генетических последовательностей. Были подобраны условия, время и определены оптимальные составы сред для культивирования штаммов. Была проведена направленная инактивация *hcn*-кластера, гены которого отвечают за синтез цианида водорода – одного из ключевых метаболитов, определяющих антимикробные свойства штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446.

Для этого с использованием полимеразной цепной реакции *hcn*-кластер (*hcnA*, *hcnB*, *hcnC*) был амплифицирован, маркирован конструкцией *loxP*-*Km*-*loxP* и клонирован в состав суицидного вектора рK18mob, который вводили в клетки *P. brassicacearum* БИМ В-446 методом конъюгации [3]. В силу неспособности плазмиды рK18mob наследоваться в клетках бактерий *Pseudomonas*, она встраивалась в состав хромосомы за счет гомологичной рекомбинации. Затем, за счет наличия *Cte*-рекомбиназы в составе плазмиды рLS3063, которой мы предварительно трансформировали мутантные варианты, произошло удаление канамициновой кассеты, фланкированной *loxP*-сайтами, из хромосомной ДНК бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446. В результате были отобраны мутантные безмаркерные варианты бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 с инактивированным *hcn*-кластером.

Далее мы проверяли антимикробные свойства отобранных мутантов по отношению к патогенным штаммам *Pseudomonas syringae* и *Alternaria alternata*. В результате было показано, что при направленной инактивации кластера, отвечающего за синтез цианида, антимикробные свойства штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 по отношению к *P. syringae* остаются на уровне исходного штамма, а в отношении *A. alternata* увеличиваются, что указывает на повышение продукции других метаболитов, которые являются ключевыми в отношении подавления роста *A. alternata*, на фоне инактивации *hcn*-кластера.

В дальнейшей работе планируется построить модель регуляции *hcn*-кластера на основе анализа генома бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446, расширить спектр бактериальных и грибных патогенов для установления роли *hcn*-кластера в антимикробной активности штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446.

Литература

1. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable / M. W. Silby [et al.] // FEMS Microbiol Rev. FEMS Microbiol Rev. – 2011. – Vol. 35, N 4. – P. 652.
2. Genetically modified *Pseudomonas* strains with enhanced biocontrol activity / J.M. Ligon [et al.] // Pat. 5756087. Novartis Finance Corporation. – 1999.
3. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids рK18 and рK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* / A. Schäfer [et al.] // Gene. – 1994. – Vol. 145 (1). – P. 69-73.

Конструирование векторной системы на основе репликона природной плазмиды бактерий *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8

Пилипенко Н.Н., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: nadyapilipenok@gmail.com

Род *Pseudomonas* включает большое разнообразие видов, которые широко распространены в природе. Среди представителей бактерий данного рода встречаются патогены растений, грибов, животных [1], а также свободноживущие виды, представляющие большой биотехнологический интерес благодаря способности синтезировать различные антимикробные вещества, гидролитические ферменты, фитогормоны, пигменты и элиситоры – сигнальные соединения, способные индуцировать иммунитет растений [2].

Для создания генно-инженерных микроорганизмов, обладающих заданными свойствами, часто используют векторы, которые включают плазмидные репликоны. В связи с отсутствием универсальных векторных систем для конструирования различных микроорганизмов актуальным является поиск автономно наследуемых генетических элементов среди природных штаммов различных таксономических групп микроорганизмов [3].

Целью данного исследования являлось создание на основе репликона природной плазмиды бактерий *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8 бинарной векторной системы для молекулярного клонирования ДНК в клетках бактерий рода *Pseudomonas* и *Escherichia coli*.

Ранее нами были проведены секвенирование, сборка и аннотация генома бактерий *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* 8. Первичная обработка полученных данных позволила определить наличие в данном штамме плазмиды pPAL8-1 (9 600 п.н., примерно 4-5 копий на клетку), которая несёт гены *repA* и *parA*, предположительно обеспечивающие автономную репликацию и стабильное поддержание плазмид при делении клеток.

На первом этапе работы нами была создана бирепликонная конструкция на основе вектора pK18, содержащая ColE1-репликон (обеспечивает наследование в бактериях *E. coli*) и последовательность гена *repA* плазмиды pPAL8-1 (предположительно обеспечивает наследование в бактериях рода *Pseudomonas*). Для этого природная плазида pPAL8-1 и вектор pK18 были обработаны ферментами EcoRI и HindIII, а затем лигированы по данным сайтам рестрикции. Полученная гибридная плазида pK18::repA размером 4399 п.н. была введена в клетки *E. coli* XL-1 Blue методом электропорации. Отбирали трансформантов, способных расти на среде с канамицином, и из данных

культур выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса. Наличие вставки ДНК нужного размера в вектор рК18 проверяли методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров M13F/R, далее проводили рестрикционный анализ образцов плазмидной ДНК по сайтам EcoRI и HindIII и секвенирование для точного установления первичной структуры рекомбинантной плазмиды.

В дальнейшей работе планируется проверить способность созданной векторной системы рК18::герА, содержащей минимальный репликон, воспроизводиться и поддерживаться в различных видах бактерий рода *Pseudomonas*. Также планируется сконструировать вектор, имеющий в составе последовательность гена *parA*, и изучить особенности наследования данной конструкции в бактериальных клетках.

Литература

1. Plasmid Replicons from *Pseudomonas* Are Natural Chimeras of Functional, Exchangeable Modules / L. Bardaji [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. - P. 190.
2. Генетические подходы создания штаммов-продуцентов биологически активных соединений / Н.П. Максимова [и др.] // *Труды Белорусского Государственного Университета* – 2009. – Т. 4, № 2. - С. 15-55.
3. Титок, М.А. Природные репликоны как основа векторных систем для молекулярного клонирования в клетках грамотрицательных грамположительных бактерий / М.А. Титок, А.А. Сечеников, Н.Е. Сацункевич // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* – 2013. – Т. 5 – С. 169-191.

Разработка нового метода определения точки встраивания mini-Tn5хуIЕ при транспозоновом мутагенезе бактерий

Попова И.В., Валентович Л.Н.

Биологический факультет БГУ, Минск, Беларусь,
электронный адрес: irina.popova.blr@gmail.com

Метод транспозонового мутагенеза часто применяют для изучения функций генетических детерминант, так как транспозоны, встраиваясь в различные участки геномов, могут изменять активность генов. Одним из часто используемых для этих целей транспозонов является mini-Tn5хуIЕ [1].

Для секвенирования участков хромосом с инсерцией транспозона mini-Tn5хуIЕ обычно используют метод получения целевой ДНК с помощью промежуточного клонирования в составе плазмидного вектора (например рUC19 [2]) в бактериях *E. coli*. Но данный подход является трудоёмким и продолжительным по времени, необходимы такие этапы, как выделение хромосомной ДНК, рестрикция, лигирование с вектором, трансформация компетентных клеток, выделение и очистка плазмидной ДНК.

Нами был предложен новый метод получения ДНК для секвенирования генов с инсерцией транспозона. Схема эксперимента представлена на рисунке. Сначала необходимо выделить тотальную ДНК штаммов, разрезать её рестриктазой, которая является мелкощепящей и не имеет сайтов рестрикции в пределах последовательности транспозона. Затем необходимо подтвердить с помощью электрофореза разрезание всей ДНК и инактивировать рестрикционную смесь.



Рисунок – Схема получения ДНК для секвенирования без клонирования

Затем необходимо провести лигирование рестрикционных фрагментов самих на себя (закольцевать) по липким концам. Полученные образцы далее следует амплифицировать с помощью двух праймеров к транспозону, 3'-концы которых направлены к наружи от последовательности транспозона: Tn5-OE: GCCGCACTTGTGTATAAG и Tn5-IE: TAGGCGGCCAGATCTGATC. Предполагается получить продукт, который затем можно без дополнительных манипуляций секвенировать.

Данный метод получения участков ДНК для секвенирования значительно быстрее традиционного и является перспективным для изучения мест инсерции транспозонов.

Литература

1. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria / V. de Lorenzo [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172, № 11 – P. 6568-6572.
2. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria / N.T. Keen [et al.] // Gene. – 1988. – Vol. 70, № 1 – P. 191-197.

Морфобиологическая характеристика видов рода *Alternaria* Nees из коллекции кафедры ботаники БГУ

Федюшко И.А., Поликсенова В.Д.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
электронный адрес: polyksenova@gmail.com

Микромицеты характеризуются высокой степенью генетического и метаболического разнообразия, обладают большим и далеко не полностью используемым потенциалом для применения в сельском хозяйстве, медицине, биотехнологических процессах. В этой связи неоспоримое значение имеют охарактеризованные по различным признакам коллекции грибов как фундаментальная основа для разноплановых исследований и вовлечения в биотехнологические процессы.

В настоящее время в связи с изменением климата, влиянием разнообразных мутагенных факторов, появлением не только воздушных, но и трансграничных наземных транспортных коридоров повсеместно наблюдается проникновение и распространение на новых территориях различных биологических объектов, в т.ч. и фитопатогенных грибов, отмечается влияние климатических изменений на жизненный цикл и плодоношение грибов. В связи с этим также целесообразно наличие региональной эталонной базы данных о группе организмов – в т.ч. в виде аннотированной коллекции чистых культур.

Грибы рода *Alternaria* Nees распространены по всему миру и насчитывают около 280 видов [4]. На территории Беларуси на сегодняшний день зарегистрировано 25 видов этого рода [2, 3]. Коллекция кафедры ботаники БГУ (созданная, в основном, Федорович М.Н.) включает в себя около 300 изолятов 25 видов рода *Alternaria* Nees. Коллекция хранится при 4°C в эппендорфах на агаре, а часть её законсервирована под минеральным маслом. Срок хранения основного фонда 10 лет. В течение 2018-2019 гг. была проведена ревизия, восстановлены ряд чистых культур и дана их характеристика по некоторым морфобиологическим признакам (образование репродуктивных структур, размеры конидий, влияние температуры на их прорастание и вегетативный рост мицелия, описана морфология колоний на картофельно-морковном агаре).

Показано, что короткоспоровые виды (*A. brassicicola*, *A. radicina*, *A. petroselini*, *A. mali* и др.) при продолжительном хранении (10 лет) в коллекционной культуре не потеряли способность к конидиеобразованию, а конидии характеризуются достаточно высокой энергией прорастания в диапазоне температуры от 4 до 37°C. Крайние значения температуры чаще негативно влияют на скорость и процент прорастания конидий видов альтернаний, хотя реакция на экстремальные температуры в определенной

степени индивидуальна. Оптимальной температурой для прорастания конидий разных видов является 22-28°C. Скорость вегетативного роста представлена в таблице.

Таблица – Линейная скорость роста колоний альтерналиевых грибов при 22°C

№ п/п	Виды р. <i>Alternaria</i>	Диаметр колонии, $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$, мм			Кр, мм/ч
		2 суток	4 суток	5 суток	
1	<i>A. mali</i> (A-1)	45,50±0,71	67,00±7,07	79,50±2,12	0,327
2	<i>A. mali</i> (A-2)	38,00±0,00	52,00±0,71	67,00±0,71	0,275
3	<i>A. mali</i> (A-3)	39,50±2,12	52,00±3,54	66,50±0,71	0,273
4	<i>A. mali</i> (A-4)	34,50±0,71	47,00±0,71	73,00±4,24	0,300
5	<i>A. calendulae</i> (ACI03.3)	38,00±2,83	49,50±3,54	72,50±3,54	0,298
6	<i>A. radicina</i> (16.2)	35,00±1,41	65,50±2,12	72,00±4,24	0,296
7	<i>A. solani</i> (ASI06.2)	40,00±1,41	49,50±3,54	68,00±4,24	0,279
8	<i>A. petroselini</i> (ARI12.1)	36,50±6,36	48,00±7,07	66,50±0,71	0,273
9	<i>A. japonica</i> (10.1)	36,00±1,41	46,50±2,12	67,00±1,41	0,275
10	<i>A. dauci</i> (ADaI02.3)	35,00±2,83	46,00±4,24	63,50±3,54	0,260
11	<i>A. brassicicola</i> (ABrI02.1)	15,25±2,47	32,33±1,70	39,83±1,70	0,162
12	<i>A. dianthi</i> (30.2)	24,00±0	30,50±0,71	41,00±7,07	0,167
13	<i>A. sp.</i> (AM I 02)	19,58±0,58	39,92±0,29	50,50±0,94	0,206

Как видно, при оптимальной температуре максимальной скоростью роста характеризовались 2 изолята нового инвазивного вида с яблони *A. mali*, виды *A. calendulae* и *A. radicina*. К группе медленно растущих грибов можно отнести *A. brassicicola* (ABrI02.1), *A. dianthi* (30.2) и новый вид, выделенный с листьев яблони, *A. sp.* (AM I 02). Интенсивность конидиеобразования в колониях грибов закономерно снижается в центробежном направлении. Это связано с тем, что колония гриба, в отличие от бактерии, имеет разный возраст в разных частях. Оказалось, что самым обильным конидиеобразованием (279,8 тыс. шт./см²) обладает *A. brassicicola*, паразитирующая на крестоцветных растениях. Данные подтверждают тем, что при исследовании аэромикобиоты воздуха населенных пунктов, чаще всего обнаруживаются конидии именно этого вида [1]. Значительно ниже интенсивность у патогенов зонтичных растений *A. radicina* (16.2) – 28,3 тыс. шт./см² и *A. petroselini* (ARI12.1) – 16,3 тыс. шт./см².

Таким образом, нами дана морфобиологическая характеристика 10 видов (13 изолятов) р. *Alternaria* Nees в чистой культуре, в т.ч. для *A. petroselini*, *A. calendulae* и *A. mali* – впервые.

Литература

1. Овчинникова, Т.А. Грибы рода *Alternaria* как доминанты аэропланктона городской среды / Т.А. Овчинникова // XII Съезд Русского бот. общ., Тольятти, 16-22 сентября 2013 г. – Тольятти, 2013. – С. 164–166.
2. Федорович, М.Н. Грибы р. *Alternaria* как компонент чужеродной микробиоты Беларуси / М.Н. Федорович, В.Д. Поликсенова // Вестник БГУ. – 2012. – № 1. – С. 54–57.
3. Федорович, М.Н., Поликсенова В.Д. Грибы рода *Alternaria* Nees в Беларуси / М.Н. Федорович, В.Д. Поликсенова // Вестник БГУ. – 2012. – №1. – С. 54–57.
4. Simmons, E.G. *Alternaria* an Identification Manual [Text] / E.G. Simmons. – Netherlands, 2007. – 775 p.

Влияние химического мутагенеза на рост актиномицетов и образование антибиотиков

Хасенова А.Х.¹, Акылова М.А.², Турлыбаева З.Ж.¹, Султанова А.¹

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан, электронный адрес: k.anara@mail.ru

²АО «Центральная клиническая больница», Казахстан, Алматы

В последние годы тенденция роста резистентности возбудителей болезней резко возросла. Наиболее оптимальным решением проблемы резистентности является изыскание новых биологически активных веществ среди вторичных метаболитов микробного происхождения, а также получение новых препаратов с лучшими антимикробными свойствами путем индуцированного мутагенеза [1-3].

Из образцов ризосферы лекарственных растений: гармалы (*Peganum harmala*), полыни (*Artemisia*), синеголовника (*Eryngium*) в чистую культуру выделено 203 изолята актиномицетов серии *Albus*, *Ruber*, *Chromogenes*, *Flavus*, *Violaceus*, *Aureus*, *Coerulescens*. Исследованы их антагонистические свойства в отношении лабораторных коллекционных грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) и грамотрицательных (*Comamonas terrigena* ATCC 8461) тест-микроорганизмов.

Активные актиномицеты были отобраны для проведения химического мутагенеза. В качестве химического мутагена был использован алкилирующий агент N-нитрозо-N-этилмочевина. Суспензию спор исходного штамма (титр разведения 10⁻²) обрабатывали N-нитрозо-N-этилмочевинной в фосфатном буфере (рН 8,0) в концентрации 300 мг/мл в течение 30, 60, 120, 180 минут при 30°C по стандартной методике (Миллер, 1976) [4], высевали на исходную среду и культивировали при 28°C в течение 5–6 суток. Проводили отбор мутантов по признаку повышенного биосинтеза антибиотиков методом агаровых блоков.

В результате индуцированного мутагенеза с использованием N-нитрозо-N-этилмочевины получены высокоактивные варианты, производительность которых на базовой среде существенно превышала таковую родительского штамма: мутантные штаммы ГМ2 и ГМ4 активнее родительского штамма в 2,2–2,5 раза; мутантные штаммы СМ1 и СМ3 активнее родительского штамма в 1,7 раза.

Таким образом, экспериментальное получение мутаций открывает неограниченные перспективы для создания высокопродуктивных штаммов способных к синтезу биологически активных веществ различного химического строения и биологического действия и делает их потенциальным источником новых веществ для медицинского и биотехнологического применения.

Литература

1. Беляева О.А., Кароль И.В., Крыжевский Е.Е., Балинская М.И. Причины антибиотикорезистентности, пути ее преодоления и рациональная антибиотикотерапия при перитоните //Новости медицины и фармации. - 2017. - № 5. - С. 14-18.
2. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // The Journal of Antibiotics. – 2013. – Vol. 66. – P. 571-591.
3. Яковлева М.Б., Никитина З.К. Скрининг-методы в биотехнологии. Выявление микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2016. - № 5. - С. 35-43.
4. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике /Дж. Миллер. – М.: Мир. 1976. – 440 с.

Использование рекомбинантной диаденилатциклазы для синтеза цикло-ди-АМФ

Хмелевская К.С.¹, Казловский И.С.², Зинченко А.И.^{1,2}

¹Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь, электронный адрес: xmelevskaya.karina@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by

Медицинская статистика на сегодняшний день приводит неутешительные данные относительно роста числа злокачественных опухолей у людей во всем мире. Активная иммунотерапия с применением специфических противоопухолевых вакцин нового поколения требует формирования Т-клеточного иммунитета, что невозможно без введения специальных усилителей иммунитета – адъювантов [1, 2].

Циклический 3',5'-диаденилат (цикло-ди-АМФ) – бактериальный внутриклеточный вторичный посредник, который участвует в регуляции сложных физиологических процессов клетки, а благодаря своим иммуностимулирующим свойствам, является перспективным адъювантом для вакцин.

В настоящее время одним из самых перспективных методов получения цикло-ди-АМФ является ферментативный синтез, который происходит в одну стадию путем конденсации двух молекул АТФ под действием диаденилатциклазы бактерии *Bacillus thuringiensis* [3]. Однако, вопреки всем удобствам работы с клетками *Escherichia coli*, суперпродукция в них многих бактериальных и эукариотических белков приводит к низким выходам целевых продуктов по причине формирования телец включения – неактивных водонерастворимых белковых агрегатов. Хотя, следует признать, что в некоторых случаях сами тела включения сохраняют ферментативную активность и могут в дальнейшем использоваться для биокаталитических трансформаций [4, 5].

Цель настоящего исследования – получить тела включения, содержащие рекомбинантную диаденилатциклазу, и изучить возможность их использования для синтеза цикло-ди-АМФ.

Первый этап включал наработку и очистку телец включения из ранее полученного рекомбинантного штамма *E. coli* pBtdac, являющегося продуцентом диаденилатциклазы. В отличие от предыдущей работы (где индуктором служила лактоза), индукцию синтеза целевого фермента в настоящем исследовании проводили с помощью ИПТГ. Тела включения осаждали из культуральной жидкости (КЖ) центрифугированием, промывали

1 М раствором мочевины, содержащей 2% тритона X100, и повторно центрифугировали. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl-буфере (рН 8,0).

Согласно электрофорезу в денатурирующем полиакриламидном геле, полученный препарат (15 мл) содержит 70% белка и обладает активностью, составляющей 5,3 мкмоль/мин·мл. При этом, расчетная продуцирующая способность используемого штамма составляет 330,75 мкмоль/мин·л КЖ.

Таким образом, использованный в настоящем исследовании метод получения препарата рекомбинантной диаденилатциклазы позволяет в десятки раз повысить продуцирующую способность штамма-продуцента [6] и может лечь в основу более быстрого и упрощенного метода получения фармакологически перспективного цикло-ди-АМФ.

Литература

1. Семакова, А.П. Адъювантные технологии в создании современных вакцин / А.П. Семакова, Н.И. Микшис // Пробл. особо опасных инф. – 2016. – № 2. – С. 28–35.
2. Blander, J.M. Exploiting vita-PAMPs in vaccines / J.M. Blander, G. Barbet // Curr. Opin. Pharmacol. – 2018. – Vol. 41. – P. 128–136.
3. Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis* / C. Zheng [et al.] // Enzyme Microbiol. Technol. – 2013. – Vol. 52, №6–7. – P. 319–324.
4. Nahalka, J. Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to α -D-glucose-1-phosphate / J. Nahalka [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 35. – P. 219–223.
5. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylatecyclase / A.S. Korovashkina [et al.] // J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 164, N 2. – P. 276–280.
6. Казловский, И.С. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента диаденилатциклазы и ее использование для синтеза цикло-ди-АМФ / И.С. Казловский [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 4. – С. 51–55.

Получение флуоресцентно меченных фитопатогенных бактерий *Pseudomonas corrugata* для их детекции *in vitro* и *in vivo*

Шавела Ю.В.¹, Буйницкая С.В.², Валентович Л.Н.^{1,2}

¹Биологический факультет, БГУ, Минск, Беларусь,
электронный адрес: shavela97@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бактерии рода *Pseudomonas* представлены огромным количеством видов, обитающих в различных экологических нишах. Многие представители имеют большое экономическое значение: виды, стимулирующие рост растений или используемые в качестве агентов биологического контроля. Немало видов *Pseudomonas* обладают потенциалом к деградации различных химических соединений. Однако, некоторые виды, являются фитопатогенами и способны наносить значительный ущерб сельскому хозяйству. Большое количество растений страдают от различного рода заболеваний, вызванными представителями рода *Pseudomonas* [1].

Флуоресцентное мечение патогенных бактерий в лабораторных условиях позволяет исследовать особенности колонизации растения патогенным микроорганизмом, а также устанавливать приоритетные места проникновения в ткани хозяина. Данная методика позволяет не только оценить стратегию поведения патогена по отношению к поражаемому растению, но и предоставляет возможность разработки эффективных методов защиты хозяйственно значимых сортов растений [2].

Цель работы – получение флуоресцентно меченного фитопатогенного штамма *Pseudomonas corrugata* 3' для возможности дальнейшего изучения его стратегий колонизации хозяина и механизмов, используемых для ингибирования иммунных реакций растений.

Выбор данного организма основан на изученности его физиолого-биохимических и фитопатогенных свойств и доступности информации о нуклеотидной последовательности всего генома. В ходе работы нами был сконструирован вектор (рис. 1) на основе плазмиды pUCP24/61 [3], несущей репликон pRO1614 широкого круга хозяев, со вставкой гена *sfGFP* под промотором PS1 [4].

Полученный в результате трансформации данной конструкцией штамм *P. corrugata* 3' [pUCP24/61::sfGFP] обладал умеренным флуоресцентным свечением при его облучении ультрафиолетовым светом (рис. 2). Принадлежность штамма к виду *P. corrugata* 3' была подтверждена ПЦР с видоспецифичными праймерами к гену *rflA* [5], имеющему хромосомную локализацию.

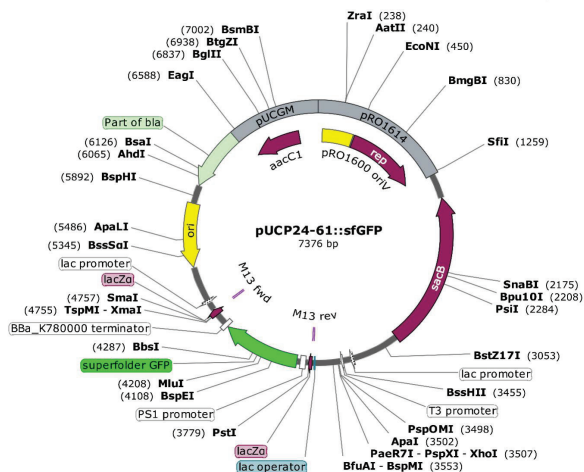
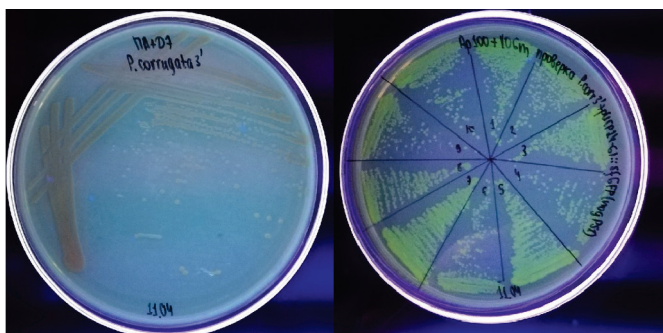


Рисунок 1 – Генетическая карта плазмиды pUCP24-61::sfGFP



Слева – исходный штамм *P. corrugata* 3'; справа – *P. corrugata* 3'[pUCP24-61::sfGFP].
Рисунок 2 – Колонии бактерий *P. corrugata* 3' при облучении УФ-светом

Таким образом, полученный флуоресцентно меченный штамм *P. corrugata* 3' может служить одним из инструментов для более детального изучения механизмов патогенеза бактерий рода *Pseudomonas* с использованием флуоресцентной микроскопии.

Литература

1. Kahlon, R.S. *Pseudomonas: molecular and applied biology*. Pseudomonas / R.S. Kahlon. – New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016.
2. *Pseudomonas*. – New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
3. Recombineering Using RecTE from *Pseudomonas syringae* / B. Swingle [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, № 15 – P. 4960-4968.
4. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis* / S. Guiziou [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016 – P. gkw624.
5. The LuxR Regulators PcoR and RfiA Co-regulate Antimicrobial Peptide and Alginate Production in *Pseudomonas corrugata* / G. Licciardello [et al.] // Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9 – P. 521.

Медико-биологические эффекты водорастворимых экстрактов высших грибов

Шамцян М.М., Соколова С.В.

*Санкт–Петербургский государственный технологический институт (технический университет). Санкт-Петербург, Россия,
электронный адрес: mark.shamtsyan@yandex.ru*

В настоящее время известно более 140 тысяч видов грибов, тогда как человек использует из них лишь небольшую часть. Грибы могут применяться не только в качестве богатых белком микроэлементами, пищевыми волокнами и витаминами продуктов, но и служить источником различных биологически-активных веществ, в том числе и малоизученных. В последние десятилетия из грибов было выделено несколько видов полисахаридов, а также гликопротеиновых комплексов, которые нашли применение в качестве терапевтических препаратов. Наиболее значительным фармакологическим эффектом этих биополимеров являются их иммуномодулирующие свойства, радиопротекторный эффект и противоопухолевые действия [1-3].

Водные экстракты из плодовых тел и мицелия ряда высших грибов были изучены нами в поисках различных биологических эффектов. Были проведены эксперименты *in vitro* и *in vivo*. Результаты показали, что водные экстракты грибов, содержащие бета-глюканы, демонстрируют различные типы выраженного иммуномодулирующего действия: повышенная продукция реактивных форм кислорода нейтрофильными клетками периферической крови человека; значительная митогенная активность в широком диапазоне концентраций; стимуляция выработки воспалительных цитокинов интерлейкина-1-бета и интерлейкина-8 клетками периферической крови. Пероральное введение экстрактов некоторых грибов приводило к уменьшению как среднего размера опухоли у мышей с трансплантированной меланомой B16, так и проявления опухолевой интоксикации, а также к значительному увеличению выживаемости таких мышей.

Содержащие водорастворимые бета-глюканы экстракты грибов при пероральном приеме значительно снижали уровень холестерина в крови животных, приводя к нормализации коэффициента атерогенности при гиперлипидемической диете, а также приводили к существенному снижению уровня глюкозы в крови у крыс со стрептозотоциновым диабетом.

Полученные экстракты обладали также антиоксидантным и выраженным антибактериальным эффектом. В то же время они действовали как пребиотики, стимулируя рост и жизнедеятельность лактобактерий и бифидобактерий. На основе полученных результатов разработаны ряд биологически активных пищевых добавок и показана возможность создания функциональных пищевых продуктов.

При добавлении экстрактов в корм для мальков форели значительно увеличивалась их выживаемость.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном, но пока еще малоизученном потенциале грибов, который можно использовать как в пищевой промышленности, так и в медицине, а также в животноводстве и рыбоводстве и который может позволить улучшить здоровье и качество жизни.

Литература

1. J. Chen and R. Seviour, “Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- glucans,” *Mycological Research*, vol. 111, no. 6, pp. 635–652, 2007.
2. V. Vetvicka, A. Vashishta, S. Saraswat-Ohri, and J. Vetvickova, “Immunological effects of yeast- and mushroom-derived β -glucans,” *Journal of Medicinal Food*, vol. 11, no. 4, pp. 615–622, 2008.
3. FS. Reis, A. Martins, MH. Vasconcelos, P. Morales, and Ferreira., “ICFR: Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 66, pp. 48–62, 2017.

Создание библиотеки генов *Cryptococcus flavescens* – продуцента β -галактозидазы

Шляхотко Е.А., Кулиш С.А., Сапунова Л.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: enzyme@mbio.bas-net.by

Фермент β -галактозидаза (лактаза, бета-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) катализирует реакции гидролиза и трансгликозилирования лактозы. В результате трансгликолитического действия β -галактозидазы синтезируются галактоолигосахариды, которые обладают пребиотическим эффектом. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что галактоолигосахариды подавляют адгезию *Escherichia coli* к эпителиальным клеткам более эффективно, чем другие олигосахариды [1, 2]. Они также стимулируют перистальтику кишечника и устраняют его дисфункции, способствуют усвоению кальция и магния, активируют специфические и неспецифические системы защиты макроорганизма, оказывая не связанное с жизнедеятельностью кишечной микробиоты иммуномодулирующее, гипохолестеринемическое и гипогликемическое действие, снижая риск развития кариеса и опухолей [3].

В лаборатории ферментов института микробиологии НАН Беларуси выделен дрожжевой грибок *Cryptococcus flavescens*, обладающий β -галактозидазной активностью. На его основе разработаны кормовые добавки КриптоЛайф-С и Полиэкт, которые, как было показано в экспериментах на сельскохозяйственных животных, обладают пребиотическими свойствами.

Целью настоящего исследования было созданию библиотеки генов *C. flavescens*.

На первом этапе работы из дрожжевых клеток выделяли тотальную ДНК (тДНК) с использованием различных методик [4, 5]. Наиболее оптимальной для выделения максимального количества тДНК *C. flavescens* оказалась методика Nagju *et al.* Ее использование позволило получить в 2-3 раза больше продукта, чем в остальных случаях. Выделенную ДНК обрабатывали РНКазой А, после чего очищали с использованием смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1). ДНК осаждали из водного раствора 3 М ацетатом натрия и 96% этанолом. В результате были получены препараты очищенной тотальной ДНК *C. flavescens*.

Для создания библиотеки генов использовали дрожжевую двугибридную систему, включающую вектор рJG4-5 и штамм SKY 473 (MATa his3 leu2 trp1 ura3 lexAop-LEU2 clop-LYS2) [6].

Вектор рJG4-5 используется для создания библиотек генов дрожжей. Он содержит: селективные сайты TRPI и Ap^R (селекция в дрожжах и *E. coli*,

соответственно). Полилинкер указанного вектора включает сайты рестрикции BamHI, XbaI, SalI, NotI, PstI.

Для создания библиотеки генов *C. flavescens* полученный препарат очищенной тДНК и вектор pJG4-5 обрабатывали рестриктазами XbaI, PstI, BamHI. Фрагменты ДНК различной молекулярной массы разделяли электрофоретически и выделяли фрагменты с молекулярной массой 5-10 т.п.н. Далее рестрицированный вектор pJG4-5 и выделенные очищенные фрагменты ДНК *C. flavescens* лигировали, в результате чего получали гибридные плазмиды, включающие в себя вектор pJG4-5 и различные фрагменты ДНК. Их совокупность составила библиотеку генов исследуемых дрожжевых грибов.

Трансформацию дрожжевого штамма SKY 473 гибридными плазмидами осуществляли по протоколу “Li acetate transformation protocol” с некоторыми модификациями [7]. Отбор рекомбинантных клонов осуществляли на синтетической селективной среде без добавления триптофана.

Трансформанты выращивали при температуре 25°C в течение 3-4 сут.

В результате работы получены дрожжевые клетки, которые в составе вектора pJG4-5 наследуют различные фрагменты тотальной ДНК *C. flavescens*.

Результаты исследований будут использованы при выделении и последующей молекулярно-генетической характеристики гена, кодирующего β-галактозидазу *C. flavescens*.

Литература

1. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics / G.R. Gibson [et al.] // Nutr. Res. Rev. – 2004. – Vol. 17. – P. 259–275.
2. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells / K. Shoaf [et al.] // Infection and Immunity. – 2006. – Vol. 74, № 12. – P. 6920–6928.
3. Macfarlane, G.T. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics / G.T. Macfarlane, H. Steed, S. Macfarlane // J. Appl. Microbiol. – 2008. Vol. 104, № 2. – P. 305–344.
4. Harju, S. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab / S. Harji, H. Fedosyuk, K. Peterson // BMC Biotechnol. – 2004. – Vol. 4. – P. 1-8.
5. Roguev, A DNA Preparation from *Schizosaccharomyces pombe* / A. Roguev, J. Xu, N.J. Krogan // Cold Spring Harb Protoc. – 2018. Doi: 10.1101/pdb.prot091959.
6. Serebriiskii, I. G. (2005). The Yeast Two-Hybrid System for Detecting Interacting Proteins / I.G. Serebriiskii, E.A. Golemis, P. Uetz, // The Proteomics Protocols Handbook. – 2005. – P. 653–682. Doi:10.1385/1-59259-890-0:653.
7. Gietz, D. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells / D. Gietz [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1992. – Vol.20(6). – P. 1425.

Секция 3

**Биотехнологии
для сельского хозяйства**

Выделение и идентификация кератиндеградирующих бактерий

Актаева С.А.^{1,2}, Балтин К.К.², Хасенов Б.Б.²

¹Кафедра общей биологии и генетики, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан, электронный адрес: aktayevasa@gmail.com

²РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

Перопуховые отходы, скапливающиеся в большом количестве на птицефабриках, могут стать источником белка и использоваться в создании высокопитательных кормовых добавок. Однако, необходимо учитывать, что около 90 % белка, содержащегося в перьях, представлено кератином, который отличается высокой механической прочностью [1]. Устойчивость кератина обусловлена плотной упаковкой белков в α -спирали или β -листы и большим количеством дисульфидных связей. Использование кератиназы в ферментативном гидролизе кератинсодержащих отходов птицеводства позволит обеспечить эффективный и экологически безопасный способ получения белковых гидролизатов [2].

Из образцов почвы, отобранных в местах скопления перьев на птицефабриках, были выделены изоляты, обладающие протеолитической активностью. В качестве минимальной питательной среды для выделения культуры микроорганизмов, продуцирующих кератиназу, использовалась среда, содержащая перемолотый перьевой порошок и соли калия, магния и натрия. Была проведена идентификация бактерий методом анализа протеомного профиля с использованием масс-спектрометра MALDI Biotyper («Bruker») и соответствующей базы данных, а также путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. По результатам проведенных анализов выделенные штаммы были идентифицированы как *Bacillus* spp. и *Staphylococcus gallinarum*.

Скрининг выделенных штаммов на казеиновом субстрате и зимографический анализ полиакриламидного геля сополимеризованного с перьевым кератином показал, что бактерии секретируют ферменты с протеолитической и кератиназной активностями.

Литература

1. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production / K. Tamreihao [et al.] // J Basic Microbiol. – 2018. – Vol.59-1 – P.10.
2. Biodegradation of Feather Waste Keratin by the Keratin-Degrading Strain *Bacillus subtilis* 8 / Zhoufeng He [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – Vol.28, №.2. – P.314–322.

Анализ ферментативной активности дрожжевых грибов рода *Saccharomyces*

Баневская К.Г.¹, Кулиш С.А.², Сапунова Л.И.²

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
banevskayak@gmail.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: leonida@mbio.bas-net.by

Одной из проблем животноводства является неполное усвоение питательных веществ кормов на основе семян зернобобовых культур и продуктов их переработки. Для элиминирования содержащихся в них антипитательных эффектов клетчатки, фитата и других трудноусвояемых полисахаридов ведутся разработки кормовых добавок комплексного действия на основе живых или инактивированных дрожжей, преимущественно рода *Saccharomyces*, ферментов и других биологически активных компонентов [1–3]. В рубце дрожжи активно потребляют кислород, расщепляют сложные полимерные субстраты, продуцируют аминокислоты, витамины, другие биологически активные метаболиты, что активизирует рост аборигенной анаэробной микрофлоры и позитивно влияет на физиологический, иммунный и репродуктивный статус животных [4, 5].

Цель настоящей работы – анализ ферментативной активности дрожжевых грибов рода *Saccharomyces* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и выбор штаммов для использования в составе кормовых добавок.

Скрининг ферментативной активности дрожжевых культур проводили чашечным методом на сусло-агаре (рН 6,0–6,5) при температуре 27–29°C в течение 96 ч. В качестве индукторов синтеза ферментов использовали их субстраты – картофельный крахмал (амилаза), лактозу (β -галактозидаза), обезжиренное молоко (протеаза), натрия альгинат (альгинатлиаза), свекловичный пектин (пектиназа), β -глюкан из овса или гриба *Claviceps fusiformis* (β -глюканаза), натрий-карбоксиметилцеллюлозу (целлюлаза), глицерилбутират (липаза), твин-80 (эстераза) и фитат натрия (фитаза). Ферментативную активность дрожжевых культур оценивали по характерным зонам просветления субстратов вокруг колоний или по окрашенным продуктам их расщепления в случае использования индикаторов. Повторность опытов трехкратная.

Согласно полученным результатам, характерным для всех исследованных дрожжевых культур оказался синтез липазы, максимум которой обнаружен у *S. cerevisiae* БИМ У-57.

В меньшей мере у дрожжевых грибов выявлялось свойство продуцировать протеазу и пектиназу: каждый из ферментов обнаружен у 19 штаммов, что составляет 79% от общего числа исследованных культур. Максимальная активность протеазы в условиях опыта обнаружена у *S. cerevisiae* БИМ Y-178. Области специфически не окрашиваемых продуктов деполимеризации пектина визуализировались у 63% исследованных культур, и только у штамма *S. cerevisiae* БИМ Y-224 они оказались максимальными.

Способность продуцировать целлюлазу выявлена у 12 (50%), амилазу – у 10 штаммов (42%). Эстеразу синтезировали всего 6 (25%) исследованных культур.

У изученных дрожжевых грибов сравнительно редко встречалась способность утилизировать альгинат натрия (12,5%, 3 штамма) и β -галактозиды (4%, 1 штамм), не выявлялась активность β -глюканазы, специфичной к β -глюкану как растительного, так и грибного происхождения.

Анализ распределения 24 дрожжевых грибов рода *Saccharomyces* по количеству синтезируемых ими ферментов показал, что около половины из них (46 %, 11 штаммов) продуцировали по меньшей мере 4 фермента и всего 4 культуры (17 %) – 6 ферментов. Из числа последних выделялись два штамма *S. cerevisiae* – БИМ Y-125 и БИМ Y-184.

Комплекс продуцируемых штаммом БИМ Y-125 ферментов представлен протеазой, пектиназой, эстеразой, липазой, целлюлазой и β -галактозидазой. В числе ферментов, синтезируемых штаммом БИМ Y-184, оказались амилаза, протеаза, пектиназа, альгинатлиаза, липаза и целлюлаза.

Таким образом, в результате проведенного скрининга из 24 дрожжевых культур по признаку синтеза максимального количества ферментов отобраны два штамма – *S. cerevisiae* БИМ Y-125 (единственный из выборки синтезирует β -галактозидазу) и *S. cerevisiae* БИМ Y-184 (проявляет максимальную альгинатлиазную активность). Указанные штаммы отобраны для дальнейшего изучения с целью создания кормовой добавки комплексного действия.

Литература

1. Feed enzyme market to exceed US\$2b by 2024 // All about feed [Electronic resource]. – 2017. – Mode of access: <https://www.allaboutfeed.net/Feed-Additives/Articles/2017/8/Feed-enzyme-market-to-exceed-US2b-by-2024-170343E/>. – Date of access: 21.04.2018.
2. Vohra, A. Probiotic yeasts in livestock sector / A. Vohra, P. Syal, A. Madan // Anim. Feed Sci. Technol. – 2016. – Vol. 219. – P. 31–47.
3. Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves (review) / Alugongo G.M. [et al.] // J. Anim. Sci. Biotechnol. – 2017. – Vol. 8. DOI: 10.1186/s40104-017-0165-5.
4. Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharide in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology // G. Diaz [et al.] // PloS One. – 2018. – Vol. 13, № 2. DOI: 10.1371/journal.pone.0193313.

5. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on intake, digestibility, rumen fermentation and milk yield in Nili-Ravi buffaloes / M. Anjum // Iran J. Vet. Res. – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 96–100.

ПЦР-диагностика грибов – возбудителей болезней огурца и томата, выращиваемых в защищенном грунте

**Барейко А.А., Пилипчук Т.А., Купцов В.Н., Валентович Л.Н.,
Сидоренко А.В., Титок М.А., Коломиец Э.И.**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: bareiko.hanna@gmail.com*

В Республике Беларусь, в силу климатических особенностей, промышленное возделывание овощных культур осуществляется преимущественно в защищенном грунте. Тепличный комплекс страны включает более 25 тепличных комбинатов общей площадью свыше 240 гектар. Ежегодно производится свыше 120 тонн овощей, причем объемы их производства постоянно возрастают.

Специфические условия выращивания в теплице – высокая температура и влажность, длительный вегетационный период, многократное использование грунта, в котором могут сохраняться фитопатогенные микроорганизмы – способствуют развитию заболеваний бактериальной и грибной этиологии. Большая скученность растений приводит к массовым поражениям, часто носящим характер эпидемий. В связи с этим особую важность приобретает своевременное выявление и идентификация возбудителя заболевания для применения эффективных средств защиты. Классические методы идентификации фитопатогенных микроорганизмов длительны по времени, трудоемки и зачастую не дают однозначного ответа. Поэтому особенную актуальность приобретает разработка быстрых и надежных способов молекулярно-генетической диагностики наиболее вредоносных и часто встречающихся в тепличных комбинатах возбудителей заболеваний овощных культур.

Цель данной работы – разработка метода ПЦР-диагностики грибов – патогенов огурца и томата, выращиваемых в защищенном грунте.

На основании литературных сведений определен перечень видов фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания овощных культур в тепличных комбинатах Республики Беларусь и ближнего зарубежья: *Cladosporium cladosporoides* (кладоспориоз или бурая оливковая пятнистость), *Alternaria* sp. (альтернариоз или сухая пятнистость листьев), *Plectosphaerella cucumerina* (пятнистость листьев) *Fusarium* sp. (фузариоз, увядание или трахеомикоз), *Botrytis cinerea* (серая гниль), *Sclerotinia sclerotiorum* (белая гниль), *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (син. *Didymella bryoniae*) (аскохитоз или черная стеблевая гниль). Проанализированы доступные в базе данных ГенБанк последовательности фрагментов геномов этих видов грибов, выявлены

высококонсервативные и специфичные генетические локусы, на основании которых сконструированы родо- и видоспецифичные праймеры для детекции и идентификации целевых патогенов. Проверка специфичности праймеров с использованием геномной ДНК 51 коллекционного штамма грибов родов *Fusarium*, *Stagonosporopsis*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Plectosphaerella*, *Cladosporium*, *Sclerotinia*, *Colletotrichum*, *Verticillium* подтвердила, что ампликоны ожидаемого размера получаются только при постановке ПЦР с нуклеиновыми кислотами грибов определенного вида (рода). Чувствительность ПЦР-детекции *Alternaria* sp. и *Fusarium* sp. составила 10^3 гэ/мл, *C. cladosporioides*, *P. cucumerina* – 10^4 гэ/мл, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* – 10^5 гэ/мл, *S. cucurbitacearum* – 10^6 гэ/мл. Результаты точно воспроизводились в 8-10 повторных постановках родо- и видоспецифичной ПЦР.

Оптимизированы условия проведения мультиплексной ПЦР со сконструированными родо- и видоспецифичными праймерами для одновременной детекции в одной реакции фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания со схожими симптомами: *Alternaria* sp., *C. cladosporioides*, *P. cucumerina* – пятнистости; *Fusarium* sp. *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *S. cucurbitacearum* – увядания и гнили растений огурца и томата. Подтверждена возможность детекции целевых патогенов в присутствии в реакционной смеси как ДНК одного, так и трех-четырех видов фитопатогенных грибов. Чувствительность мультиплексной ПЦР для *Alternaria* sp., *C. cladosporioides*, *P. cucumerina* составила 10^3 - 10^4 гэ/мл, *Fusarium* sp. *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *S. cucurbitacearum* – 10^2 - 10^6 гэ/мл в зависимости от детектируемого патогена. Результаты мультиплексной ПЦР стабильно воспроизводились в 8-10 повторных постановках анализа.

Полученные результаты свидетельствуют, что разработанные методы ПЦР-диагностики грибов – возбудителей болезней огурца и томата, выращиваемых в условиях защищенного грунта, характеризуются высокой специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью, и могут использоваться для оказания диагностических услуг производителям овощной продукции.

Влияние дробной подачи субстрата на эффективность культивирования бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д

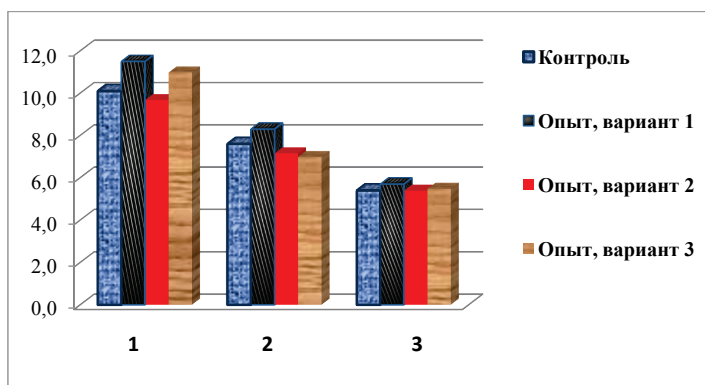
Бережная А.В., Коломиец Э.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: domilazo@bk.ru*

Дробная подача субстрата является эффективным биотехнологическим приёмом, способствующим инициации и/или пролонгации той стадии роста микроорганизмов, в которой отмечается их наибольшая биосинтетическая активность, и при этом не требующим высоких трудо- и энергозатрат [1-3].

Цель работы: оценить влияние дробной подачи источника углерода на продуктивность и эффективность процесса периодического культивирования бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д – основы биопестицида Бетапротектин.

По результатам лабораторных экспериментов было показано положительное влияние дробной подачи источника углерода (мелассы) на эффективность периодического культивирования штамма *B. velezensis* БИМ В-439Д. Подачу мелассы осуществляли в два этапа по ходу культивирования: первую часть (50% от стандартного содержания, т.е. 15 г/л) вносили в питательную среду до начала ферментации, вторую часть – в разные фазы роста бактерий. Максимальные показатели титров жидкой культуры бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д были получены при культивировании штамма с дробной подачей мелассы по следующей схеме: 50% – в начале ферментации, 50% – после окончания экспоненциальной фазы роста бактерий (на период 15-17 часов культивации): титр КОЕ в этом варианте превышал в среднем на 13,8%, а титр спор – на 9,2% аналогичные показатели в контроле (рисунок). Преимущества использования дробной подачи субстрата по разработанной схеме были подтверждены также при культивировании в опытно-промышленных условиях: в результате получен препарат Бетапротектин с более высокими, чем в контроле (стандартная ферментация), показателями титра КОЕ и спор – в 1,6 и 1,9 раза соответственно; антагонистическая активность культуры при этом была не ниже, чем в контрольном варианте. Также показано, что при использовании дробной подачи субстрата процесс спорообразования инициировался в более ранний период (с 10-12 ч.к.), а продуктивность периодического культивирования бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д повышался в 1,35 раза в сравнении с ферментацией по стандартной схеме.



- | | |
|---|--|
| <p>1- Показатель титра КОЕ, $n \cdot 10^8$/мл</p> <p>2- Показатель титра спор, $n \cdot 10^8$/мл</p> <p>3- Показатель содержания общих сахаров, г/л</p> | <p>Вариант 1- внесение второй части мелассы на 15-17 часов культивирования</p> <p>Вариант 2- внесение второй части мелассы на 8-10 часов культивирования</p> <p>Вариант 3 - внесение второй части мелассы на 5-6 часов культивирования</p> |
|---|--|

Рисунок – Влияние дробной подачи субстрата (мелассы) на титры и содержание сахаров КЖ *B. velezensis* БИМ В-439Д после 48 ч.к.

Литература

1. Виестур, У.Э. Культивирование микроорганизмов: Биоинженерные основы /У.Э.Виестур, М.Ж. Кристапсонс, Е.С. Былинкина. – Москва: Пищевая промышленность, 1980. – 232 с.
2. Евтушенков, А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию: Курс лекций / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.
3. Усовершенствование технологии получения пробиотика «Бацинил-К» для кормопроизводства /Э. И. Коломиец [и др.]. – Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты, сб. научн. трудов, 2015. - Т.7. – С. 144–159.

Термошок как фактор повышения продуктивности периодического процесса получения биопестицида Бетапротектин

Бережная А.В., Романовская Т.В., Коломиец Э.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: domilazo@bk.ru*

Известно, что при воздействии многих стресс-факторов, в частности – повышенных температур, бактерии синтезируют адаптогены с репаративными функциями, которые формируют резистентность культуры к стрессовым ситуациям и интенсифицируют метаболические процессы, что способствует повышению жизнеспособности культуры [1-4].

Целью данной работы было обоснование применения термоактивации инокулята для повышения продуктивности периодического процесса получения биопестицида Бетапротектин.

Установлено, что при воздействии теплового стресса (45-65°C) на жидкую культуру бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439Д, основу препарата Бетапротектин, жизнеспособность клеток не изменяется, при этом в образцах внутриклеточной фракции прогретой культуры снижается общее содержание белков (на 4% ниже, чем в контроле), но отмечается появление белков с молекулярной массой 40-45 кДа, что, согласно литературным данным, соответствует массе малых белков теплового шока с функцией шаперонов, экспрессия которых усиливается при стрессирующих клетку условиях [4, 5]. На основании оценки влияния умеренного термошока на активность и жизнеспособность исследуемых бактерий был установлен оптимальный режим термоактивации жидкого инокулята (60°C в течение 20 минут), обеспечивающий повышение титра КОЕ бактерий в 2 раза и антагонистической активности препарата на 10 % в сравнении с контролем (культивирование с нативным инокулятом без прогрева) (рис. 1).

При культивировании *B. velezensis* БИМ В-439Д в опытно-промышленных условиях отмечено, что интенсивность спорообразования в жидкой культуре, полученной с использованием прогретого инокулята, превосходит контроль почти в 2 раза, а продуктивность периодической ферментации по биомассе – в 1,5 раза, что обосновывает применение термоактивации инокулята *B. velezensis* БИМ В-439Д в качестве эффективного биотехнологического приёма совершенствования технологии получения биопестицида Бетапротектин.

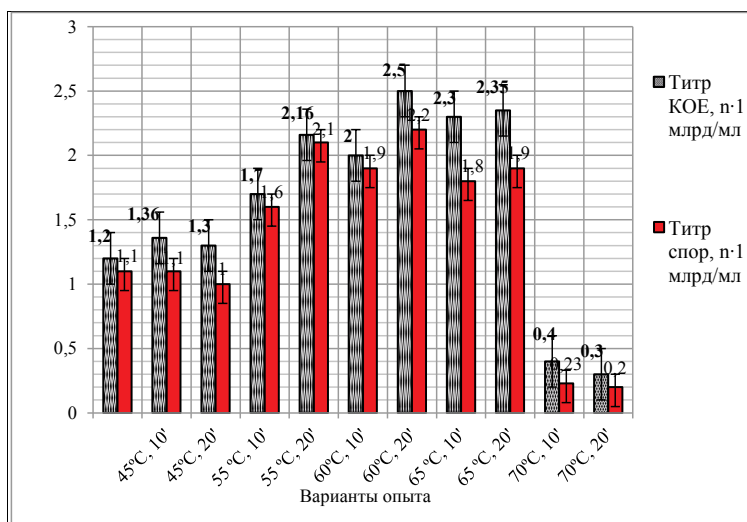


Рисунок 1 – Влияние режимов термоактивации инокулята (1-сут. культур *B. velezensis* БИМ В-439Д) на показатели титра КОЕ и спор бактерий в препарате

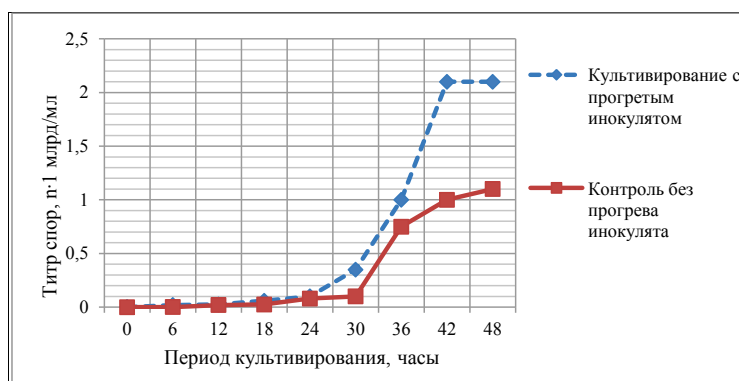


Рисунок 2 – Динамика спорообразования при культивировании спорообразующих бактерий *B. velezensis* БИМ В-439Д

Литература

1. Николаев, Ю.А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов: автореф. дисс. ... д-ра биол.наук : 03.02.03 / Ю.А. Николаев ; Ин-т микробиологии им.Виноградского РАН. – Москва, 2011. – 51 с.
2. Petersohn, A. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*/ A. Petersohn [et al.] // *Jorn. of Bacteriology.* – 2001 – Vol.183 , №19. – P.5617-5631.
3. New family of regulation in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor σ B of *Bacillus subtilis* / Samina Akbar [et al.] // *Jorn. of Bacteriology.*- 2001 – Vol.183, №4. – P.1329-1338.
4. Hecker, M. Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis* / M. Hecker, W. Schumann, U. Volker // *Molecular Microbiology.* – 1996. – Vol.19 , №3. – P. 417–428.

Идентификация гетероферментативных бактерий рода *Lactobacillus* с помощью видоспецифичной ПЦР

Бирюк Е.Н., Тарашкевич Ю.С., Фурик Н.Н.

РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск, Республика Беларусь,
электронный адрес: biohimbel@rambler.ru

Проблема идентификации лактобацилл является особенно актуальной в связи с их широким применением в промышленности в качестве пробиотических и лечебно-профилактических средств, в производстве ферментированных продуктов традиционного и функционального питания, а так же для производства биоконсервантов [1]. Традиционные методы идентификации бактерий с использованием культурально-морфологических характеристик, а также биохимических тестов имеют ряд недостатков, поэтому в настоящее время для установления таксономического положения бактерий становится обязательным применение молекулярно-генетических методов [2]. Методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются альтернативой классическим микробиологическим методам. Доступность баз данных, хранящих информацию о структуре генов различных организмов, дает возможность при разработке видоспецифичных праймеров наиболее полно учитывать и использовать вариабельность анализируемых последовательностей [3]. Для дизайна видоспецифичных праймеров чаще всего используют генетические детерминанты 16S рРНК, 23S рРНК и гипервариабельный интерспейсерный регион (ITS).

Цель исследований – создание видоспецифичных праймеров для идентификации гетероферментативных бактерий рода *Lactobacillus*.

Объектами исследования являлись нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК четырех видов лактобацилл: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*. Был проведен поиск нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых бактерий, депонированных в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США [4]. Для конструирования видоспецифичных праймеров проведен сравнительный анализ 17 нуклеотидных последовательностей (табл. 1) в программе MEGA6 с помощью алгоритма ClustalW.

Локусы, обладающие наибольшей гетерогенностью проверяли на специфичность с помощью онлайн-сервиса BLAST [5]. Было выявлено несколько участков, обладающих наибольшей гетерогенностью: 70–114, 198–362, 469–526, 1025–1070, 1293–1299, 1476–1520 п.н. Данные области являются перспективными для конструирования видоспецифичных праймеров для бактерий *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*.

Таблица 1 – Номера последовательностей гена 16S рРНК представителей рода *Lactobacillus*, депонированных в базе данных GenBank

Код доступа	Видовая принадлежность
NC_008497.1, NC_020819.1, NZ_CP015338.1, NZ_CP024635.1, NZ_CP033885.1	<i>Lb. brevis</i>
NC_015428.1, NC_018610.1	<i>Lb. buchneri</i>
NC_010610.1, NC_017465.1, NC_021235.1, NZ_AP017973.1, NZ_CP011536.1	<i>Lb. fermentum</i>
NC_009513.1, NC_010609.1, NC_015697.1, NC_021494.1, NZ_LN906634.1	<i>Lb. reuteri</i>

В результате исследований были сконструированы видоспецифичные праймеры для ПЦР-детекции бактерий *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri* (табл. 2). Для определения расчетной температуры отжига использовали функции анализа олигонуклеотидов и дизайна праймеров на сайте <https://eu.idtdna.com>.

Таблица 2 – Последовательности праймеров

Праймер	Последовательность 5'→3'	Температура отжига, °С	Вид бактерий
Lbre-F	CGTTGAATGACGTGCTTGCAC	57,5	<i>Lb. brevis</i>
Uni1-R	CCTGGTAAGGTTCTTCGCGT	57,2	
Lbuc-F	TTGAAAGATTTAACATTGAGACG	50,0	<i>Lb. buchneri</i>
Lbuc-R	TTGGATACCGTCAAGATGTC	52,0	
Lfer-F	AACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTC	56,1	<i>Lb. fermentum</i>
Uni1-R	CCTGGTAAGGTTCTTCGCGT	57,2	
Lreu-F	GACGATGGATCACCAGT	51,2	<i>Lb. reuteri</i>
Lreu-R	ACCTTCCTCCGGTTTGT	53,5	

Специфичность сконструированных праймеров подтверждена экспериментально с использованием образцов ДНК чистых культур бактерий рода *Lactobacillus* из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

Литература

1. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health / S. Parvez [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 1171–1182.
2. Соловьева, И.В. и др. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы // Медиаль. - 2014. - № 2(12). - С. 29–44.

3. Евдокимова О.В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР / О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Молекулярная и прикладная генетика. - Том 21 – 2016. – С. 53–63.
4. База данных [Электронный ресурс]. - URL: // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения : 04.03.2019).
5. Онлайн-сервис [Электронный ресурс]. - URL: // <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 04.03.2019).

Стимуляция роста растений ячменя под влиянием штамма микромицета *Talaromyces* sp. T 14

Бражникова Е.В., Мукашева Т.Д., Игнатова Л.В.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,
электронный адрес: PoLB_4@mail.ru

Для современной системы растениеводства важную роль играют микроорганизмы, применение которых дает возможность существенно повысить степень реализации генетического потенциала культурных растений и почвенное плодородие. Перспективным объектом агробиотехнологии являются PGPM (Plant Growth-Promotion Microorganisms), стимулирующие рост и повышающие продуктивность растений. Применение PGPM представляется привлекательной альтернативой химическим удобрениям [1-3].

Для изучения влияния штамма микромицета *Talaromyces* sp. T14 на рост и развитие растений проведены модельные эксперименты в лабораторных условиях на растениях ярового ячменя (*Hordeum vulgare*) сорта *Байшешек*. Штамм выращивали в жидкой питательной среде Сабуро при 25°C в течение 7 суток, после чего культуральную жидкость отфильтровывали. Полученный фильтрат использовали для предпосевной обработки семян путем их замачивания на 6 ч. В качестве контроля использовали семена, замоченные в водопроводной воде.

Стимулирующее действие штамма *Talaromyces* sp. T14 отмечено уже на ранних стадиях развития ячменя, начиная с прорастания семян. Предпосевная обработка семян ячменя фильтратом штамма *Talaromyces* sp. T14 привела к увеличению длины стеблей проростков в 1,2 раза, длины корней в 1,4 раза, массы стеблей в 1,2 раза, массы корней в 1,3 раза по сравнению с контрольным вариантом (таб. 1).

Таблица 1 – Влияние штамма *Talaromyces* sp. T14 на ростовые параметры и биомассу проростков ярового ячменя сорта *Байшешек*

Вариант обработки	Количество проросших семян, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Масса стебля, г	Масса корня, г
Контроль (вода)	95	20,2±0,5	6,7±0,2	0,21±0,01	0,09±0,004
<i>Talaromyces</i> sp. T14	99	24,1±0,5	9,5±0,3	0,26±0,01	0,13±0,004

Применение фильтрата штамма *Talaromyces* sp. T14 для обработки семян оказало стимулирующий эффект на фотосинтетическую деятельность растений

за счет увеличения содержания хлорофилла в листьях проростков. Отмечено увеличение количества хлорофилла *a* на 16%, хлорофилла *b* – на 9,3% (таб. 2).

Таблица 2 – Влияние штамма *Talaromyces sp.* T14 на содержание хлорофилла в листьях проростков ярового ячменя сорта *Байшешек*

Вариант обработки	Количество хлорофилла <i>a</i> , мг/г	Количество хлорофилла <i>b</i> , мг/г	Содержание общего хлорофилла, мг/г	Отношение хлорофилла <i>a/b</i>
Контроль (вода)	0,75±0,02	0,43±0,01	1,18±0,04	1,74
Штамм <i>Talaromyces sp.</i> T14	0,87±0,03	0,47±0,01	1,34±0,05	1,85

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о перспективности штамма микромицета *Talaromyces sp.* T14 и возможности его применения для стимуляции роста и развития сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Тихонович И.А. Микробиологические аспекты плодородия почвы и проблемы устойчивого земледелия / И.А. Тихонович, Ю.В. Круглов // Плодородие. – 2006. – №5(32). – С. 9–12.
2. Pérez-Montaño F. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production / F. Pérez-Montaño, C. Alías-Villegas, R.A. Bellogin, P. del Cerro, M.R. Espuny // Microbiol Res. – 2014. - Vol.169(5-6). – P. 325–336.
3. Моргун В.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В.В. Моргун, С.Я. Коць, Е.В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, №3. – С. 187–207.

Молекулярно-генетический анализ агробиотехнологически значимых признаков штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2

Бурыгин Г.Л.^{1,2}, Каргаполова К.Ю.¹, Ткаченко О.В.¹

¹Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов, Россия, электронный адрес: buryingl@gmail.com

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Одной из актуальных задач органического растениеводства является поиск и внедрение в практику природных штаммов микроорганизмов, проявляющих биотехнологически важные свойства, в том числе стимуляция роста растений и повышение урожайности сельскохозяйственных культур. Бактерии рода *Ochrobactrum* (порядок *Rhizobiales*) являются природными симбионтами многих растений и часто выделяются из корней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в разных регионах планеты [1]. В данной работе приведены результаты анализа полногеномных данных штамма *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, выделенного нами ранее из корней картофеля сорта Невский в Саратовской области [2], в сопоставлении с экспериментальными наблюдениями рост-стимулирующих свойств этих бактерий.

Рост-стимулирующую активность бактерий штамма *O. cytisi* IPA7.2 по отношению к растениям картофеля сортов Невский и Кондор изучали в экспериментах *in vitro*, оранжерее и в грунтовых условиях. Для биоинформатического анализа использовали полногеномные данные штамма, депонированные в GenBank. Подтверждение предполагаемой функции генов проводили путём сравнения с помощью программы BLAST с гомологичными генами, функции которых ранее были описаны.

Инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (10^6 кл/мл) микрорастений картофеля в середине стадии *in vitro* приводила к увеличению длины побега, числа узлов и корней микроклонов, более быстрому развитию их листовой поверхности в условиях *ex vitro* [3], а также повышению приживаемости растений в почве, в том числе в открытом грунте. В геноме штамма *O. cytisi* IPA7.2 выявлены гены, кодирующие белки биосинтеза и функционирования бактериального жгутика и системы хемотаксиса, а также генный кластер биосинтеза липополисахарида, в совокупности обеспечивающие успешность микробной колонизации корней растений. Увеличение числа корней предположительно связано с бактериальным биосинтезом ауксина (ИУК) из корневых экссудатов. В геноме *O. cytisi* IPA7.2 выявлены гены триптофан-зависимого биосинтеза ИУК (*iaaH*, *nit1*, *nit2*), и экспериментально установлено содержание $8,1 \pm 0,5$ мкг/мл ИУК в культуральной жидкости этих бактерий.

Повышение приживаемости инокулированных микрорастений в почве по сравнению с контролем может быть объяснено, во-первых, способностью бактерий продуцировать хитиназу, феназин и другие компоненты биоконтроля фитопатогенов, гены которых были обнаружены в геноме штамма *O. cytisi* IPA7.2, во-вторых, запуском фитоиммунных реакций под действием бактериальных биомакромолекул.

Важным аспектом использования микробных препаратов в условиях Нижнего Поволжья является присутствие у бактерий рост-стимулирующей активности при засухе и повышенной температуре почвы и воздуха. Культура штамма *O. cytisi* IPA7.2 была способна к росту при +45°C и сохраняла жизнеспособность при +50°C в широком диапазоне значений pH (от 4 до 10) и содержании в среде до 10% NaCl [1, 2]. В геноме *O. cytisi* IPA7.2 аннотированы гены теплового и холодового шоков, биосинтеза глицин-бетаина, трегалозы, пролина и метаболитов, обеспечивающих устойчивость к абиотическим факторам среды. Инокулированные микрорастения в условиях, моделирующих засуху (2,5% полиэтиленгликоля 6000), накапливали в листьях пролин и в большей целостности сохраняли фотосинтетическую систему относительно контрольных растений. При репарации бактеризованные растения быстрее контрольных восстанавливали ростовые процессы, коррелирующие с нормализацией биохимических характеристик.

В результате проведенной работы выявлены молекулярно-генетические основы рост-стимулирующей активности штамма *O. cytisi* IPA7.2 в оптимальных и стрессовых для микрорастений условиях. Анализ агробиотехнологически значимых признаков рост-стимулирующих штаммов бактерий в модельных экспериментах с последующим изучением созданных ассоциативных сообществ в полевых или оранжерейных условиях позволит решать фундаментальные проблемы, связанные с особенностями взаимодействия макро- и микросимбионтов в данных условиях, вести целенаправленный подбор штаммов для совместной коинокуляции растений, а также развивать перспективные экологически чистые агробиотехнологии.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №19-016-00116.

Литература

1. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress / G. Burygin [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 35, № 4. – P. 55.
2. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 / Г.Л. Бурьгин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Vol. 52, № 1. – P. 105–115.
3. Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микрোকлонального размножения картофеля / Г.Л. Бурьгин [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2018. – Vol. 14, № 2. – P. 12-16.

Подбор питательной среды для культивирования бактерий *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 и наработки фага PсN1

Волотович О.А., Пилипчук Т.А., Гирилович Н.И., Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: olga.volotovich@mail.ru

В настоящее время бактерии *Pseudomonas syringae* являются одними из широко распространенных в мире видов фитопатогенов [1]. На сегодняшний день хорошо изучены бактериозы, вызванные данным видом на культурных растениях, а также разработаны профилактические мероприятия и химические средства для борьбы с этим возбудителем. Одним из биологических методов защиты растений является использование биопрепаратов на основе бактериофагов. Важным этапом их создания служит подбор питательной среды для культивирования бактерии-хозяина фага и наработки бактериофага путем лизиса бактериального штамма.

Целью работы явился подбор питательной среды для культивирования индикаторного штамма бактерии *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 и наработки бактериофага PсN1.

Бактериофаг PсN1 выделили из почвы (Минская область) и протестировали на литическую активность в отношении бактериальных фитопатогенов. Фаг дал зоны лизиса на бактериях рода *Pseudomonas*, а в качестве индикаторной культуры выбрали штамм *P. syringae* БИМ В-268 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, так как на нем наблюдался наибольший титр фага.

Культивирование бактерии-хозяина фага и наработку бактериофага осуществляли на шейкере-инкубаторе Biosan ES-20 (Латвия) при 180 об/мин и температуре 28°C. В качестве сред, исходя из литературных данных, использовали: бульон на основ гидролизата рыбной муки или ГРМ-бульон (гидролизат рыбной муки – 8 г/л; пептон – 8 г/л; NaCl – 4 г/л), мясо-пептонный бульон или МПБ (бульон МПБ – 200 г/л; NaCl – 4 г/л), глицериновую среду (глицерин – 11 г/л; дрожжевой автолизат – 0,15 г/л; Na₂HPO₄×12H₂O – 6,5 г/л; K₂HPO₄×2H₂O – 1,6 г/л; MgSO₄×7H₂O – 1,5 г/л; FeCl₃ – 0,01 г/л), среду Мейнелла с использованием 2% сахарозы в качестве источника углерода (K₂HPO₄ – 7 г/л; KH₂PO₄ – 3 г/л; MgSO₄ – 0,1 г/л; (NH₄)₂SO₄ – 1,5 г/л; Na-цитрат – 0,5 г/л; сахароза – 10 г/л) [2].

Для получения подроста, в колбы со стерильными питательными средами различного состава добавляли 18-часовую культуру *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 в количестве 1/10 от конечного объема. Культивирование штамма

P. syringae БИМ В-268 осуществляли до достижения значения оптической плотности 0,6 (при длине волны $\lambda=600$ нм), что соответствовало показателю экспоненциальной фазы роста (рисунок, а). Бактериофаг PcN1 добавляли в соотношении 1:100. Лизис бактерий *P. syringae* БИМ В-268 фагом PcN1 считали завершенным при снижении показателя оптической плотности с 0,6 до 0,2 (рисунок, б). Результаты фиксировали при помощи спектрофотометра Shimadzu UV-2401PC (Япония).

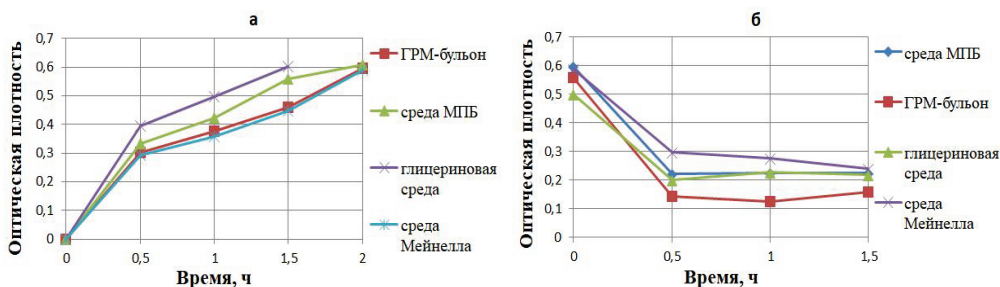


Рисунок – а) динамика роста бактерий *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 на различных питательных средах; б) динамика лизиса бактерий *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 фагом PcN1

Как видно из графиков, необходимую оптическую плотность (ОП=0,6) культура бактериального штамма *P. syringae* БИМ В-268 достигала за 1,5 ч на глицериновой среде, за 1,75 ч – на МПБ, а на среде ГРМ и Мейнелла – за 2 ч. Наиболее быстрый лизис бактерий *P. syringae* БИМ В-268 наблюдалась после 1 ч культивирования с фагом PcN1 на среде ГРМ.

Количество вирусных частиц PcN1 или титр фага в конечном объеме сред различного состава устанавливали методом двойных агаровых слоев. Наиболее высокий титр фага – 2×10^9 БОЕ/мл наблюдался на среде ГРМ. На средах МПБ, глицериновой и Мейнелла титр был следующий: $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл, 1×10^8 БОЕ/мл, 1×10^7 БОЕ/мл, соответственно.

Таким образом, исходя из времени лизиса бактерии-хозяина *Pseudomonas syringae* БИМ В-268 фагом PcN1, а также титра бактериофага, выявлено, что оптимальной средой для наработки фага является бульон на основе гидролизата рыбной муки.

Литература

1. Желдакова, Р.А. Фитопатогенные микроорганизмы: учеб.-метод. комплекс для студентов биол. фак. спец. G - 31 01 01 «Биология» / Р.А. Желдакова, В.Е. Мямин. – Мн.: БГУ, 2006. – 116 с.
2. Асабина, Е.А. Исследование оптимальных условий культивирования бактерий рода *Pseudomonas* - продуцентов биологически активных веществ: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.00.23 / Е.А. Асабина ; Рос. акад. наук, Ин-т биологии. – М., 2009. – 24.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальному препарату «Рецеф 4,0»

Гласкович А.А., Одинцов Д.В., Нестеров А.Г.

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь, электронный адрес: aleftinaglaskovic@gmail.com

Препарат «Порошок «Рецеф 4,0» для инъекций» – порошок белого кремового цвета, однородный по окраске, без посторонних примесей. Во флаконе вместимостью 100,0 см³ содержится 4,0 г цефтиофура натрия.

Цефтиофур натрия относится к третьему поколению антибиотиков из группы цефалоспоринов, обладающих широким спектром действия. Препарат высокоэффективен против грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (пастереллы, стрептококки, стафилококки, бордетеллы и др.), включая микроорганизмов, продуцирующих β-лактамазу. Не активен против микоплазм, хламидий, риккетсий, эймерий, актиномицетов и вирусов.

Механизм антимикробного действия препарата заключается в ингибировании синтеза клеточной стенки микроорганизмов. После парентерального применения препарата в терапевтической дозе максимальная концентрация активноедействующего вещества создается в крови в первые 2-3 ч и удерживается на терапевтическом уровне 24 ч. Препарат малотоксичен.

Препарат применяют для лечения при инфекционных заболеваниях, вызванных возбудителями, чувствительными к препарату, а также для профилактики бактериальных инфекций цыплят и индюшат, вызываемых микроорганизмами, чувствительными к цефтиофуру.

Определение чувствительности тест-микроорганизмов и микроорганизмов, выделенных от птиц из птицеводств северо-восточного региона Витебской области и Республики Беларусь к препарату «Порошок «РЕЦЕФ 4,0» для инъекций» и препаратам сравнения - «ЦефтиВЕТ», «Цефтиофур натрия для инъекций» и «Цефтифур-50» – суспензия для инъекций» проводилось по общепринятой методике – методом «бумажных дисков».

При оценке чувствительности микроорганизмов – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella pullorum-gallinarum*, *Salmonella branderup*, *Salmonella derby*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens* установлено следующее: все микроорганизмы были высокочувствительны как к изучаемому препарату «Порошок «Рецеф 4,0» для инъекций», так и к его антимикробным препаратам-аналогам – «ЦефтиВЕТ», «Цефтиофур натрия для инъекций», «Цефтифур-50» и

«Цефтиофур 5%, суспензия для инъекций», что свидетельствует о потенциальной способности вышеуказанных лечебных средств предотвращать развитие сальмонеллезной и других бактериальных инфекций.

Симбиотическое действие биологически активных препаратов «Апистимулин-А» и пробиотика «Биофлор» на продуктивность и микробиоценоз желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров

Гласкович М.А.

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь, электронный адрес: mglaskovich@mail.ru

Значительный интерес как источник биологически активных веществ и стимулятор роста молодняка птицы представляют собой продукты пчеловодства и полученные на их основе кормовые добавки, в частности «Апистимулин-А». «Апистимулин-А» представляет собой препарат, изготовленный из пчелиной перги и содержит в своем составе комплекс биологически активных веществ, входящих в пергу. Лечебно-профилактический препарат «Биофлор» представляет собой взвесь живых кишечных палочек (штамм «М-17») и биологически активных веществ из среды культивирования и экстракты из сои и овощей. Препарат обладает антагонистической активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая эшерихии, сальмонеллы, протей, стафилококки, клебсиеллы и другие виды, и тем самым нормализующим микрофлору кишечника. Для опыта были взяты 4000 цыплят, которых разделили на 4 группы по 1000 голов в каждой. Первая (контрольная) группа цыплят никаких иммуностимуляторов и пробиотиков не получала. Цыплята 2-й опытной группы получали «Апистимулин-А» в дозе 1,0 мг/гол. начиная с 2-суточного возраста 1 раз в день в течение 7 дней подряд в 3 цикла с интервалом 6–10 дней до конца выращивания и препарат «Биофлор» в дозе 0,2 мл/гол. (20,0 млн. микробных тел) на голову начиная с суточного возраста 1 раз в день в течение 5 дней подряд в 4 цикла с интервалом 7 дней до конца периода выращивания. Цыплята 3-й опытной группы получали «Апистимулин-А» с питьевой водой в дозах 0,5 мг/гол. начиная с 2-суточного возраста 1 раз в день в течение 7 дней подряд в 3 цикла с интервалом 6 – 10 дней до конца выращивания и препарат «Биофлор» в дозе 0,1 мл/гол. (10,0 млн. микробных тел) на голову начиная с суточного возраста 1 раз в день в течение 5 дней подряд в 4 цикла с интервалом 7 дней до конца периода выращивания. Цыплята 4-й опытной группы получали «Апистимулин-А» в дозе 2,0 мг/гол. массы 1 раз в день в течение 7 дней подряд в 3 цикла с интервалом 6 – 10 дней до конца выращивания и препарат «Биофлор» в дозе 0,4 мл/гол. (40,0 млн. микробных тел) на голову начиная с суточного возраста 1 раз в день в течение 5 дней подряд в 4 цикла с интервалом 7 дней до конца периода выращивания.

Совместное применение препаратов позволило увеличить интенсивность роста птиц на 5,6%. Совместное применение препаратов «Апистимулин-А» и «Биофлор» стимулировало более высокую жизнеспособность цыплят-бройлеров в сравнении с применением препаратов по отдельности. Так, у цыплят-бройлеров опытной группы, которой выпаивали «Апистимулин-А» в оптимальной дозе 1,0 мг/гол., сохранность составила 99,1%; у цыплят-бройлеров опытной группы, получавшей пробиотик «Биофлор» в оптимальной дозе 0,1 мл/гол., сохранность составила 99,3%. При совместном применении иммуностимулирующего препарата «Апистимулин-А» в дозе 1,0 мг/гол. и пробиотика «Биофлор» в дозе 0,2 мл/гол. (2-я опытная группа) сохранность была выше, чем при раздельном применении препаратов, и составила 99,8%, что на 7% выше, чем в контроле (93,2%). Аналогичная тенденция наблюдалась в снижении затрат комбикормов на 1 кг прироста живой массы, так как затраты комбикорма при использовании «Апистимулина-А» и «Биофлора» по отдельности снизились на 4,4 и 4,6% соответственно, а совместное применение изучаемых препаратов приводило к снижению затрат кормов в расчете на 1 кг прироста живой массы на 5,4%. Также, пробиотик «Биофлор» и иммуностимулятор «Апистимулин-А» оказывают существенное влияние на содержание лакто- и бифидобактерий ($48,1 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^8$ против $23,22 \times 10^8 \pm 5,4 \times 10^8$ в контроле). Изучаемые препараты оказывают существенное влияние на содержание аэробных бактерий в фекалиях, к которым относятся эшерихии, сальмонеллы, протей, стафилококки, бациллы и т.д. Биологически активные вещества существенно снижают (на 2–3 порядка) их содержание по сравнению с контрольными цыплятами. При этом у цыплят контрольной группы, которые получали только один корм без биологически активных препаратов до 40-го дня отмечалось постоянное увеличение аэробов.

Литература

1. Гласкович, М.А. Нанобиокорректоры в кормлении птицы / М.А. Гласкович // Ученые записки УО «ВГАВМ»: науч.-практ. журнал. Витебск, 2009. Т. 45. № 1–2. С. 12–15.
2. Гласкович, М.А. Экологически чистые препараты и их применение в кормлении сельскохозяйственной птицы / М.А. Гласкович // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2009. Т. 75. С. 152–156.
3. Гласкович, М.А. Влияние «Апистимулина-А» на естественную резистентность, мясную продуктивность и сохранность цыплят-бройлеров / М.А. Гласкович [и др.] // Ученые записки УО «ВГАВМ»: науч.-практ. журнал. Витебск, 2005. Т. 41. № 2-3. С. 47–49.
4. Гласкович, М. А. Фагоцитарная активность псевдоэозинофилов крови у цыплят-бройлеров при введении в рацион «Апистимулина-А» / М. А. Гласкович, В. А. Медведский, П. А. Красочко // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы III международной научно-практической конференции (г. Витебск, 30 мая 2003 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2003. – С. 53–54.

Разработка и внедрение в ветеринарную практику различных композиционных форм препаратов с продуктами пчеловодства

Гласкович С.А.

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь, электронный адрес: mglaskovich@mail.ru

Проведенными различными группами ученых исследования показали, что использование биологически активных соединений природного происхождения позволяет существенно снизить отрицательное воздействие лечебных средств на организм.

Было изучено 4 препарата, где основная композиция – продукты пчеловодства. Препарат «АпиБиоМикс» состоит из 5% водного экстракта прополиса – прополетина, 5% субстанции апимикса (водных экстрактов мервы, трутневого гомогената, воска, перги), не менее 200 мкг/мл коллоидного серебра. В состав препарата «Аргобифилак» входят продукты метаболизма лакто-, бифидобактерий, водорастворимый экстракт прополиса и нано- и коллоидные частицы серебра, меди. Ветеринарный препарат «Флавоидин» состоит из прополетина, апимикса (водных экстрактов мервы, трутневого гомогената, воска, перги), йодополимерного комплекса. «Экодиар» состоит из прополетина – 5%, апимикса (водных экстрактов мервы, трутневого гомогената, воска, перги) – 5%, водного экстракта живицы – 5%.

Для изучения лечебно-профилактической эффективности препаратов на цыплятах-бройлерах при энтеритах инфекционной этиологии были сформированы группы аналогов, с дачей исследуемых препаратов в различных дозировках. Многочисленные лабораторные исследования выявили наиболее приемлемую схему дачи препаратов: для профилактики и терапии энтеритов цыплят-бройлеров инфекционной этиологии препараты задавать с питьевой водой 1 раз в день из расчета 0,1 мл / 0,5 л питьевой воды в 3 цикла по 7 дней с интервалом вы 7 дней по следующей схеме:

- 1 цикл: - с 3 по 7 день – выпаивание препарата
- С 8 по 14 дней – выпаивание не производят;
- 2 цикл: - с 15 по 19 день – выпаивание препарата
- С 20 по 26 день – выпаивание не производят;
- 3 цикл: - с 27 по 30 день – выпаивание препарата

Из данных опытов очевидно, что препараты «АпиБиоМикс», «Аргобифилак», «Флавоидин» и «Экодиар» следует применять для профилактики и для лечения молодняка цыплят-бройлеров при различной

патологии желудочно-кишечного тракта на фоне нарушений естественного микробиоценоза: дисбактериозе, диарее бактериальной природы, колибактериозе, энтеритах вирусно-бактериальной этиологии, отравлениях. Изученные препараты так же повышают сохранность птицы, среднюю живую массу, среднесуточный прирост и европейский показатель эффективности выращивания. Комплекс биологически активных соединений из продуктов пчеловодства исследуемых препаратов «АпиБиоМикс», «АргобиФилак», «Флавойдин» и «Экодиар» обладают иммуностимулирующими свойствами, оказывает общестимулирующее действие на организм животных, активизирует Т-систему лимфоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови, стимулирует неспецифический гуморальный иммунитет, способствует восстановлению угнетенных звеньев клеточного, гуморального иммунитета и обмена веществ у больной птицы до уровня здоровых, обладает пребиотическими, гепатопротекторными и адаптогенными свойствами.

Литература

1. Гласкович, М. А. Влияние совместного использования пробиотика «Биофлор» и продуктов пчеловодства на продуктивность и иммунную систему цыплят-бройлеров / М. А. Гласкович, П. А. Красочко // Ветеринарная наука-производству : научные труды / РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси». – Минск, 2005. – Вып. 38. – С. 167–169.
2. Гласкович, М. А. Экологически безопасные биологически активные препараты в кормлении сельскохозяйственной птицы / М. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2013. – 241 с.
3. Гласкович, М.А. Экологически чистые препараты и их применение в кормлении сельскохозяйственной птицы / М.А. Гласкович // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. 2009. Т. 75. С. 152–156.
4. Гласкович, М. А. Иммуностимуляторы природного происхождения в птицеводстве / М. А. Гласкович // Научно-практический журнал: Наше сельское хозяйство. – 2010. – № 10. – С. 57–61.
5. Гласкович, М.А. Ветеринарная технология защиты и комплекс зоогигиенических мероприятий по повышению продуктивности сельскохозяйственных птицы / М.А. Гласкович // Материалы Научно-практической конференции КФ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева с международным участием. – Калуга: ИП Якунин А.В., 2018. – 124 с. С. 42–46.
6. Гласкович, М.А. Опыт корректировки рационов цыплят-бройлеров в условиях птицефабрик республики Беларусь / М.А. Гласкович [и др.] // Международный вестник ветеринарии - International Bulletin of Veterinary Medicine. – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (СПбГАВМ), 2018. – № 1 – С. 33–40.
7. Гласкович, М.А. Использование «Апистимулина-А» для повышения продуктивности цыплят-бройлеров / М. А. Гласкович, П. А. Красочко // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства : материалы III международной научно-практической конференции (г. Витебск, 30 мая 2003 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2003. – С. 51–52.

Отработка технологии получения пробиотической кормовой добавки для пчел Апипро

Гапонова И.И., Макаревич О.В., Болотник Е.В., Романова Л.В., Щетко В.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by*

В последние годы внимание ученых и практиков все больше привлекают биологические кормовые добавки, применяемые для стимулирования жизнедеятельности, повышения иммунитета, устойчивости к стрессовым факторам, а также профилактики и лечения заболеваний пчел [1]. Особый интерес представляет включение в состав стимулирующих подкормок пробиотиков.

Пробиотические препараты для пчеловодства выпускают как в жидкой [2], так и в сухой товарной форме [3-5]. Тенденция производства сухих пробиотиков вызвана удобством использования и более длительным сроком хранения, что особенно важно в отрасли пчеловодства, где для достижения положительного эффекта достаточно применить микродозы препарата с большой периодичностью [6]. Так же показано, что использование в пчеловодстве сухих товарных форм пробиотических препаратов имеет ряд преимуществ по сравнению с жидкими, что связано с менее жесткими требованиями к условиям хранения и транспортировки.

В ходе работы в лабораторных условиях оптимизированы технологические параметры получения сухой пробиотической кормовой добавки для пчел Апипро. В качестве объекта исследований служил штамм спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*. Бактерии для кормовой добавки выращивали глубинно в шейкере-инкубаторе при температуре $30 \pm 2^\circ\text{C}$, частоте вращения 200 ± 20 об./мин в течение 48 ± 2 ч. Концентрирование биомассы проводили на центрифуге, затем смешивали с криозащитной средой. В качестве криозащитной среды использовали 10% сахарозу с биологически активными добавками (дрожжевой экстракт и сульфат кобальта). Полученную смесь замораживали и лиофильно высушивали. Полученный препарат имел следующие качественные показатели КОЕ/г, споры/г $7,0 \times 10^{10}$ и $6,0 \times 10^{10}$ соответственно.

Изучена стабильность сухой кормовой добавки Апипро для пчел в течение 9 месяцев хранения при различных температурных режимах ($4 \pm 2^\circ\text{C}$, $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

В результате проведенных исследований установлено, что жизнеспособность бактерий *B. subtilis* в составе сухой пробиотической добавки Апипро остается стабильно высокой (титр КОЕ/г и спор/г не менее $1,0 \times 10^{10}$) в течение 9 месяцев хранения вне зависимости от температурных условий.

Таким образом, в ходе проведенной работы отработана лабораторная технология получения сухой кормовой добавки Апипро. Показано, что титр бактерий *B. subtilis* в составе кормовой добавки остается стабильно высоким в течение 9 месяцев хранения.

Литература

1. Пашаян, С.А. Экологические и морфофизиологические основы, определяющие резистентность пчел к заболеваниям: автореф. ...д-ра биол. наук: 03.02.14/ С. А. Пашаян; ФГБОУ ВПО «Тюменская государственная сельскохозяйственная академия» – Екатеринбург, 2012 – 40 с.
2. Средство для стимуляции физиологических функций у пчел и защиты их от инфекционных заболеваний: пат. RU 2007130428 РФ А, С 12 N 1/20; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «БИОФОРТ»; заявл. 08.08.2007; опубл. 20.02.2009.
3. Биопрепарат для повышения продуктивности пчел: пат. RU 2166322 РФ С2, А 61 К 35/74, А 23 К 1/18, С 12 N 1/20/ А.Н. Панин, Н.И. Малик и др.; заявитель Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. - № 99112456/13; заявл. 21.06.1999; опубл. 10.05.2001.
4. Способ стабилизации жизнедеятельности пчелиных семей в закрытом грунте: пат. RU 2008100115 РФ А, А 01 К 47/00/ заявитель В.И Масленникова; заявл. 11.01.2008; опубл. 20.07.2009.
5. Биотрилакт - биопрепарат для повышения жизнедеятельности и активности пчел в закрытом грунте: пат. RU 2579266 РФ С1, А 23 К 10/18, А 23 К 10/28, А 23 К 10/30, А 23 К 50/90/ Н.Д. Скичко, А.Я. Самуйленко и др.; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности". - № RU2015110068А; заявл. 23.03.2015; опубл. 10.04.2016.
6. Методы профилактики борьбы с патогенами пчел и состав для этих целей: пат. US 2013064796 А1, А 61 К 35/74, А 61 К 31/04, С 12 N 1/20/ Hamdi Chadlia, Daffonchio Daniele; заявитель Univ Degli Studi Milano. — № 13/695479; заявл. 03.05.2011; опубл. 14.03.2013.

Обоснование параметров применения закваски замороженной концентрированной поливидовой термофильных микроорганизмов для сыров с чеддеризацией и плавлением сырной массы

Головач О.С., Бабицкая М.А., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.

*РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Беларусь,
электронный адрес: meat-dairy@tut.by*

В Республике Беларусь создана технология производства закваски замороженной концентрированной поливидовой термофильных микроорганизмов для полутвердых сыров с чеддеризацией и плавлением сырной массы ТЛББн/в на основе отечественных заквасочных культур (*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). Определены: доза внесения и технологические параметры применения, обеспечивающие получение оптимального сочетания органолептических свойств и микробиологических показателей готового продукта [1].

С помощью системы контроля сквашивающей активности молочных культур путем постоянного измерения рН (СрН), iCinac, (АМС France) проведены исследования процесса ферментации молочного сырья разработанной закваской ТЛББн/в с учетом допуска на количество заквашиваемого сырья $\pm 20\%$ от рекомендуемой дозы внесения. Исследования проведены при двух комбинированных температурных режимах, имитирующих изменение температуры во время технологического процесса изготовления сыра. Полученные в ходе экспериментов графические зависимости представлены на рисунках 1-2.

На основании анализа результатов проведенных исследований установлено, что при температурах культивирования $(33\pm 1)^\circ\text{C}$ закваска ТЛББн/в с расчетной дозой внесения позволяет достичь необходимого значения активной кислотности (4,64-4,75) ед. рН за 5 часов и обеспечивает направленность технологического процесса. Полученные результаты предоставляют возможность обосновать допуск на количество заквашиваемого сырья $\pm 20\%$ от рекомендуемой дозы внесения 1 Е.А на 100 дм^3 молочного сырья с учетом технологических особенностей производства.

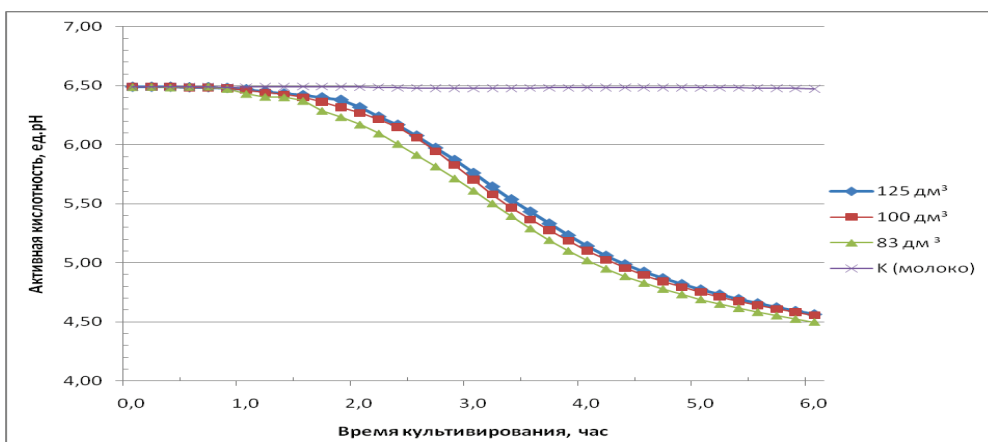


Рисунок 1 – Изменение активной кислотности при ферментации молока закусочной ТЛББн/в при комбинированном температурном режиме культивирования (32°C в течение 2,0 ч, второе нагревание - 38°C).

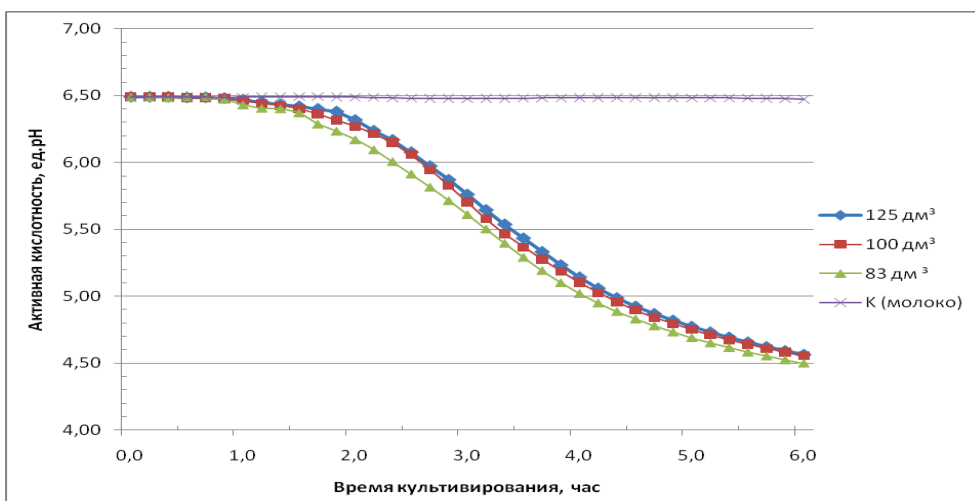


Рисунок 2 – Изменение активной кислотности при ферментации молока закусочной ТЛББн/в при комбинированном температурном режиме культивирования (34°C в течение 2,0 ч, второе нагревание - 38°C).

Литература

1. Головач О.С., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н. «Влияние температурных режимов ферментации на изменение активной кислотности при изготовлении йогурта»// Инновационные технологии в пищевой промышленности: материалы XVII Международной научн.- практ. конф., (Минск, 4-5 октября 2018.) / РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»: редкол.: З.В. Ловкис [и др.] – Минск: Беларуская навука, 2018. – С. 176–177 .

Влияние углеводов на способность к синтезу экзополисахаридов у штаммов термофильного стрептококка и болгарской палочки

Головач О.С., Бабицкая М.А., Иванько М.В., Жабанос Н.К., Смоляк Т.М., Фурик Н.Н.

*РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Беларусь,
электронный адрес: meat-dairy@tut.by*

В последние годы повысился интерес к закваскам, продуцирующим экзополисахариды (ЭПС), улучшая органолептические и реологические характеристики продукта, а также выступая в роли факторов адгезии полезных микроорганизмов на стенках кишечника [1].

В литературных источниках отмечено, что выбор источника углерода оказывает большое влияние на биосинтез экзополисахаридов. Таким образом, изучение влияния источника углевода на способность продуцирования ЭПС является актуальной задачей.

Исследовано влияние углеводов: глюкозы, фруктозы, лактозы, сахарозы на способность продуцирования ЭПС для штаммов *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Культивирование штаммов осуществляли в питательных средах (без агара) с различными источниками углеводов при оптимальных для каждого вида температуре. Доза внесения составляла 1%, инкубировали (16±2) часов. Далее осуществляли количественное определение ЭПС фенол-серным методом. Измерение проводили в трех повторностях. Результаты исследований представлены на рисунках 1-2.

На основании анализа данных, (рис. 1, 2) установлено влияние углеводов в составе питательной среды на способность к синтезу ЭПС:

- для штамма *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (1141 ST-AV) минимальная концентрация ЭПС определена с сахарозой (191,5 мкг/мл), максимальная с лактозой (770,9 мкг/мл);

- для штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (2674 TL-AV) минимальная концентрация ЭПС определена с глюкозой (118,3 мкг/мл), максимальная с фруктозой (430,9 мкг/мл) и лактозой (420,6 мкг/мл).

Таким образом, для исследуемых штаммов установлены углеводы при утилизации которых микроорганизмами продуцируется наибольшее количество ЭПС:

- лактоза для *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*;
- фруктоза и лактоза для *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

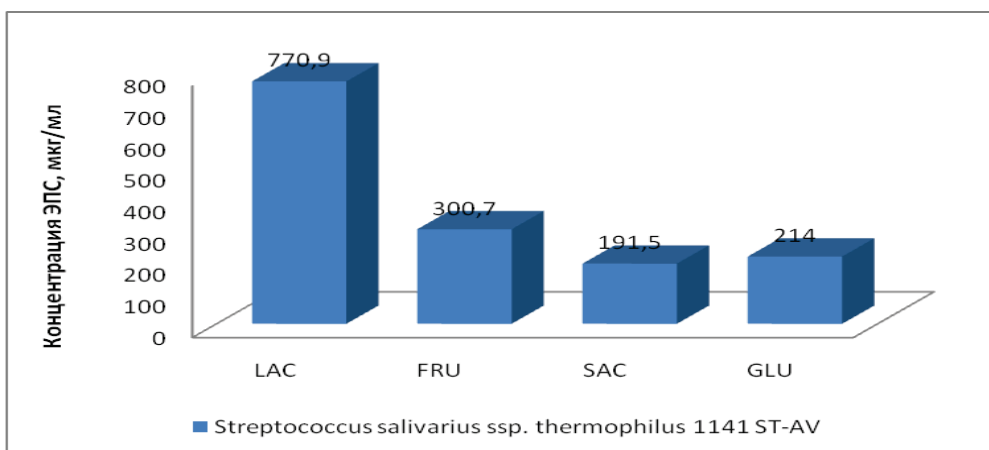


Рисунок 1 – Влияние углеводов на синтез ЭПС у культуры *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (1141 ST-AV)

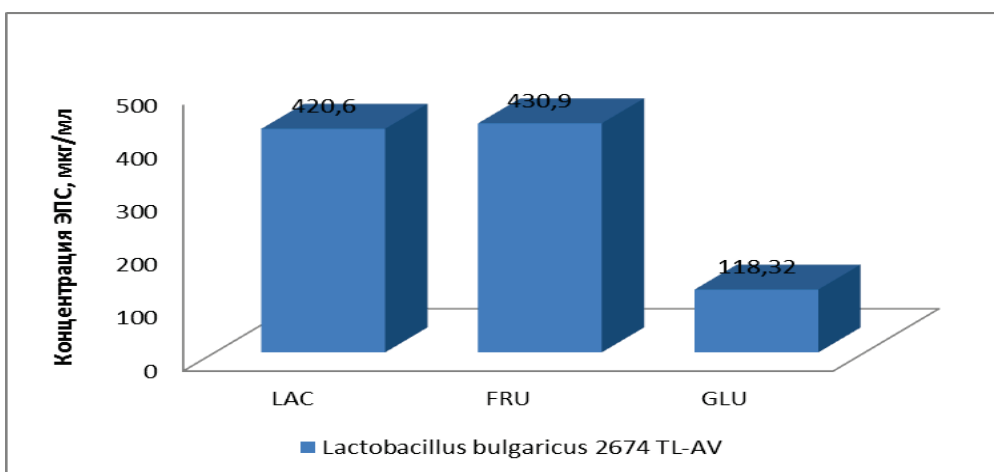


Рисунок 2 – Влияние углеводов на синтез ЭПС у культуры *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (2674 TL-AV)

Литература

1. Маркелова В.В., Красникова Л. В. Использование штаммов *Lactobacillus acidophilus*, продуцирующих экзополисахариды, для приготовления функциональных десертов из молочной сыворотки // Сборник материалов IV Международной научно-технической конференции «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке». – СПб.: СПбГУНиПТ, 2009.– С. 420–422.

Эффективность использования пробиотической кормовой добавки для пушных зверей

Головнева Н.А.¹, Романова Л.В.¹, Андрусевич А.С.², Мистейко М.М.², Стрельчяня И.И.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: biochem_lab@mbio.bas-net.by

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», Минск, Беларусь

В настоящее время пробиотики широко используются в технологиях выращивания разных видов животных [1]. Данные литературы свидетельствуют о том, что регулярное введение живых бактерий – представителей нормальной кишечной микрофлоры, – для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней животных, направленное на восстановление кишечного биоценоза, экономически обосновано, позволяет снизить потребление антибиотиков, повысить качество продукции [2]. Готовые для перорального применения пробиотики должны содержать в своем составе живые микробные клетки, способные к выживанию и размножению в условиях кишечного микроокружения, устойчивые к низким значениям рН и органическим кислотам, к физиологической концентрации желчи и солей натрия [3, 4].

Для использования в качестве пробиотического компонента при кормлении пушных зверей с целью повышения сохранности и продуктивности животных разработана технология получения кормовой добавки «ФутраБИМ». Добавка представляет собой порошок, содержит лиофильно высушенные жизнеспособные клетки бифидобактерий в количестве не менее 1×10^9 и молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus casei* – не менее 2×10^{10} . Добавка быстро растворяется в водных средах (физиологический раствор, фосфатный буфер) без осадка. Изготовлен экспериментальный образец добавки, проведены испытания эффективности пробиотика в условиях звероводческого хозяйства.

Показано, что применение пробиотической кормовой добавки не оказывало отрицательного влияния на гематологические показатели норок. Уровень гемоглобина, гематокрита и количество эритроцитов находился в пределах физиологической нормы и достоверно не отличался от показателей контрольной группы норок. Содержание эритроцитов в опытной группе составляло $8,18 \pm 0,18 - 8,42 \pm 0,24 \times 10^{12}/л$, при применении базового варианта – $7,96 \pm 1,20 - 8,69 \pm 0,16 \times 10^{12}/л$, в контрольной группе – $8,23 \pm 0,21 - 8,65 \pm 0,42 \times 10^{12}/л$. Уровень гемоглобина в опытной группе колебался в пределах $170,6 \pm 3,33 -$

172,0±3,11 г/л, при применении базового варианта – 169,4±5,16-172,4±3,44 г/л, в контрольной группе – 169,4±4,46-171,2±6,12 г/л. Уровень гематокрита изменялся от 50,2±1,23 до 51,2±1,35% в опытной группе, от 50,3±1,27 до 51,5±1,48% – при применении базового варианта, от 49,7±1,34 до 50,6±1,21% – в контрольной группе.

Начиная с четырнадцатого дня после применения пробиотической кормовой добавки в динамике лейкоцитов периферической крови норок установлена тенденция к увеличению их уровня на 14,1% ($p < 0,05$). На 21-ый день количество лейкоцитов увеличилось до $8,4 \pm 0,14 \times 10^9$ /л ($p < 0,05$) и оставалось на высоком уровне через 45 дней. Аналогичная тенденция отмечена в группе с базовым вариантом при сравнении с показателями крови норок контрольной группы.

Анализируя биохимические показатели сыворотки крови, следует отметить, что применение пробиотической добавки привело к последовательному увеличению содержания общего белка в сыворотке крови норок: на 3,15 % через 14 дней после иммунизации, на 21-ый и 45-ый дни исследования белок оставался на высоком уровне, составляя, соответственно, 69,6±2,12 и 70,5±2,45 г/л. В группе с базовым вариантом установлена сходная динамика – увеличение этого показателя составило от 68,2±2,53 г/л на 14-ый день после применения до 69,7±2,45 г/л на 45-ый день. В контрольной группе содержание общего белка в сыворотке крови норок находилось в пределах 67,6±3,54 – 68,7±2,31 г/л.

В сыворотке крови норок, где применялась пробиотическая кормовая добавка, отмечали незначительное снижение уровня альбуминов до 31,4±0,38 г/л на 21 день, что является компенсаторным в связи с увеличением уровня глобулинов. Достоверное их увеличение отмечали на 14-ый и 21-ый дни, соответственно на 7,62% и 23,57%. На 45-ый день глобулины оставались на высоком уровне и составляли 32,1±0,26 г/л. Схожая динамика уровня альбуминов и глобулинов отмечалась в группе с базовым вариантом по сравнению с контрольной группой.

Изучено влияние пробиотической кормовой добавки на уровень глюкозы, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы и общего билирубина. Данные показатели не имели достоверных отличий от таковых у животных контрольной группы и находились в пределах физиологической нормы или имели тенденцию к увеличению в большинстве случаев, что говорит об активации обменных процессов в организме опытных животных.

Литература

1. Бондаренко, В.М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В.М. Бондаренко, А.А. Воробьев // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
2. Chaucheyras-Durand, F. Probiotics in animal nutrition and health / F. Chaucheyras-Durand, H. Durand // Benef. Microbes. – 2010. – Vol.1, N 1. – P. 3–9.
3. Yeoman, C.J. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals / C.J. Yeoman, B.A. White // Annu. Rev. Anim. Biosci. –2014. – N 2. – P. 469–486.
4. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts / C.N. de Almada [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99, N 10. – P. 4175–4199.

Поиск значимых компонентов питательной среды по плану Плакетта-Бермана для культивирования *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai*

Калмыкова Г.В., Акулова Н.И., Чешкова А.Ф.

Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, Новосибирск,
Россия, электронный адрес: gvkalmuk@mail.ru

Препараты на основе бактерий *Bacillus thuringiensis* признаны самыми безопасными и успешными биоинсектицидами последнего столетия [1]. Инсектицидное действие этих бактерий обусловлено наличием Cry, Cyt и Vip белков. В зависимости от состава *cry*, *cyt* и *vip*- генов в штамме он специфически действует на насекомых отрядов Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera и даже на клещей и нематод [1]. Несмотря на широкое разнообразие бактерий *B. thuringiensis* (в настоящее время известно более 80 подвидов *B. thuringiensis*, имеющих около 1000 различных *cry*-генов) в контроле насекомых-вредителей сельского хозяйства в России применяют споро-кристаллические препараты на основе *Bt* ssp. *thuringiensis* и *Bt* ssp. *kurstaki*. Длительное применение одних и тех же Cry-токсинов, синтезируемых этими штаммами, создает угрозу появления устойчивых к ним насекомых [2]. В связи с этим огромное значение приобретает поиск новых штаммов, инсектицидные белки которых отличаются от применяемых в настоящее время [3]. Скрининг споро-кристаллических смесей 87 штаммов *B. thuringiensis*, проведенный ранее на гусеницах чешуекрылых вредителей, позволил нам выделить штамм с широким спектром действия и высокой инсектицидностью против насекомых отряда Lepidoptera, превышающей активность коммерческого препарата Лепидоцид. Этот штамм был идентифицирован на основе серологических и физиолого-биохимических свойств как *Bt* ssp. *aizawai*, несущий *cry1*, *cry2*, *cry7/8* и *cry9* гены [4].

Известно, что синтез вторичных метаболитов, в том числе и инсектицидных белков *B. thuringiensis*, зависит от состава питательной среды и условий культивирования штамма-продуцента. Питательные потребности варьируют от штамма к штамму, и для максимальной продукции метаболитов следует оптимизировать среду культивирования. В классической технике однофакторного эксперимента для оптимизации среды требуется большое количество опытов, что делает этот процесс трудоемким, длительным и неэкономичным. Современные статистические методы дают мощные инструменты для оценки воздействия компонентов на выход целевого продукта. Двухуровневый дизайн многофакторного эксперимента, предложенный Плакеттом и Берманом [5], широко используется для

оптимизации сред культивирования микроорганизмов, т.к. не только уменьшает общее количество экспериментов, но позволяет выявить значимые компоненты сред и не рассматривать компоненты, которые незначительно влияют на синтез целевого продукта.

Для выбора значимых компонентов питательной среды культивирования выбранного штамма *Bt ssp. aizawai* по плану Плакетта-Бермана в качестве независимых факторов были включены семь компонентов. В результате были сформированы 12 различных сред. По окончании культивирования штамма *Bt ssp. aizawai* на этих средах был проведен анализ по микроскопии, продуктивности, концентрации белка, биотесты на насекомых, белковый электрофорез в SDS-PAGE.

При анализе коэффициентов регрессии и *t* значений установлено значимое влияние K_2HPO_4 и KH_2PO_4 на инсектицидную активность в отношении гусениц капустной совки и капустной моли. Гидролизат картофельного крахмала значительно влиял на титр спор и активность против гусениц капустной совки, пептон – на гибель тестируемых насекомых.

В результате исследования нами определены четыре значимых компонента (пептон, гидролизат картофельного крахмала, K_2HPO_4 и KH_2PO_4) в составе питательной среды культивирования штамма *Bt ssp. aizawai*, которые одновременно влияют как на титр спор, так и на инсектицидную активность.

Полученные данные являются основой для дальнейшего дизайна ферментационной среды, которая является важным этапом пилотного производства инсектицидного белка на основе штамма *Bt ssp. aizawai*.

Литература

1. Jouzani, G. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings / G. Jouzani, E. Valijanian, R. Sharafi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 101. – P.2691–2711. – doi: 10/1007/s00253-017-8175-y.
2. Van Rie, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins / J. Van Rie, J. Ferre // Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application / ed. J.F. Charles, Armelle Delécluse, C. Nielsen-le Roux. – Springer Science & Business Media, 2000. – P. 219-236.
3. Sayyed, A. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in field population of the diamondback moth / A. Sayyed, R. Haward, S. Herrero, J. Ferre, D.J. Wright // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P.1509-1516. – doi: 10.1128/AEM.66.4.1509-1516.2000.
4. Мокеева, А.В. Молекулярное типирование штаммов бактерий *Bacillus thuringiensis* с помощью RAPD-анализа / А.В. Мокеева, С.Ф. Орешкова, Г.В. Калмыкова, Л.И. Бурцева, И.С. Андреева, В.Е. Репин // Биотехнология. – 2008. – №3. – С.40-47.
5. Singh, V. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review / V. Singh, Sh. Haque, R. Niwas, A. Srivastava, M. Pasupuleti, C. Tripathi // Frontiers in Microbiology. – 2017. – 7:2087. – doi.10.3389/fmicb.2016.02087

Производство бактериальной фитазы с помощью периодической ферментации с подпиткой

Кириллов С.О.^{1,2}, Силаев Д.В.¹, Ли П.К.¹, Хасенов Б.Б.¹, Раманкулов Е.М.¹, Муканов К.К.¹, Абельденов С.К.¹.

¹Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан.

²Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан, электронный адрес: kirillovsaveliy@gmail.com

Одной из приоритетных задач для развития животноводства и птицеводства Республики Казахстан является повышение биологической эффективности и биодоступности сельскохозяйственных кормов. Желудочно-кишечный тракт моногастральных животных не способен разрушать межклеточные стенки зерновых компонентов и усваивать достаточное количество фосфатов из органических компонентов корма из-за отсутствия в их организме соответствующих ферментов [1]. Эти органические компоненты – соли фитиновой кислоты – фитаты, являются преобладающей формой накопления фосфора в зерне, семенах масличных и бобовых [2]. Неусвоенные фитаты, попадая в почву и водоемы, вызывают загрязнение окружающей среды [3]. В связи с этим появилась необходимость внедрения в практику и применение экзогенных препаратов на основе фермента фитазы. Фитазы катализируют гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты с образованием легко усваиваемого свободного фосфата, что приводит к увеличению коэффициента использования фосфора из растительного сырья и, как следствие, снижению количества использования неорганического фосфора в корме [4-5].

В результате проведенной работы была разработана технологическая платформа по получению сухого ферментного препарата фитаза AppA. Платформа базируется на использовании метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, в которые был клонирован ген бактериальной фитазы *appA* под контроль конститутивного глицеральдегид-3-фоосфат дегидрогеназного промотора. Для наработки рекомбинантного ферментного препарата был использован метод периодического культивирования с подпиткой. Оптимальной питательной средой для культивирования дрожжей *Pichia pastoris* является комплексная солевая среда FM22. Для подпитки в качестве источника углерода была использована 50% глюкоза с добавлением солей металлов РТМ (*Pichia trace metals*). Ферментация была осуществлена при следующих параметрах: температура +29°C; рН среды 5,0 путем добавления 28% гидроокиси аммония; процентное содержание растворенного кислорода в питательной среде поддерживалось на уровне 30% регулированием перемешивания (350-600 об/мин) и аэрации, количество подаваемого воздуха 1-

1,25 (объем кислорода (литров) на объем ферментационной культуры (литров) в минуту).

Культивирование осуществляли периодическим методом до тех пор, пока в питательной среде не заканчивалось потребление исходной глюкозы, индикатором чего служил скачок растворенного кислорода. Затем при помощи перистальтического насоса непрерывно подавалась подпитка, содержащая 50% глюкозу и 12 мл/л раствор солей металлов РТМ. Скорость потока глюкозы была отрегулирована в зависимости от её концентрации в питательной среде. Время культивирования составляло 72 часа, после чего культуральную жидкость отделяли от клеток проточным центрифугированием при 19 500 об/мин.

Полученную культуральную жидкость концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации на мембранных кассетных модулях из полиэфирсульфона с размерами пор 10 кДа и высушивали в распылительной сушилке в потоке воздуха при температуре не выше +80°C.

Полученный ферментный препарат характеризуется следующими признаками: мелкодисперсный порошок желтоватого или кремового цвета с характерным запахом дрожжей. Фитазная активность препарата составляет 5000 ед/г. Определение активности проводили по ГОСТ Р 53360-2009. За единицу фитазной активности принимают количество фермента, катализирующее гидролиз фитата натрия с образованием 1 мкмоль неорганического фосфата за одну минуту. Биохимические изучения сухого рекомбинантного фермента показали, что фермент активен в диапазоне температур от 40 до 60°C и значений pH 3-6.

Таким образом технологические решения, реализованные в данной платформе позволили получить препарат, готовый для применения в промышленном птицеводстве в качестве ферментной добавки в корма птиц.

Литература

1. Phytase, a new life for an "old" enzyme / X.G. Lei [et al.] // Annual Review of Animal Bioscience. – 2013. – Vol.1. – P. 283-309.
2. Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe D.K. Phytates in legumes and cereals // Advanced in Food Research. – 1982. – Vol.28. – P.1-92.
3. Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications / M.Z.Yao [et al.] // Journal Applied Microbiology. – 2012.– Vol.112. – P.1-14.
4. Mullaney E.J, Ullah A.H. The term phytase comprises several different classes of enzymes // Biochemical Biophysical Research Communications. –2003.–Vol.312. – P.179-184.
5. Selinger L.B. A protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* has specificity for the 5-phosphate of myo-inositol hexakisphosphate // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. –2008. – Vol.40. – P.2053-2064.

Картофельный сок – субстрат для микробиологического синтеза протеина

Кудряшов В.Л.

ВНИИ пищевой биотехнологии – филиал ФГБНУ «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия, электронный адрес: vera_vikir@mail.ru

Основные затраты в производстве продуктов микробиологического синтеза приходится на стоимость субстрата, а в случае аэробных процессов дополняются расходами на электроэнергию, необходимую для сжатия и подачи воздуха. Снижение себестоимости процесса достигается за счет использования быстрорастущих штаммов-продуцентов, недорогого вторичного сырья, оптимизации состава питательных сред и технологических параметров культивирования.

Вторичным сырьем картофеле-крахмальных заводов являются картофельный сок (КС) и мезга, которые содержат, в зависимости от технологии, соответственно 3,5–6,5 % и до 10 % сухих веществ (СВ) и после дополнительной переработки находят применение в качестве кормовой добавки. Доказана целесообразность использования КС и мезги в различных биотехнологических процессах, прежде всего в производстве кормовых дрожжей (КД) [1, 2]. Последние содержат витамины группы В, эргостерин, белок (до 45 %), перевариваемость которого у КРС составляет 85%, у свиней – 89%, что на 25–29 % превышает перевариваемость протеина КС (35 %). Сухие КД (СКД) востребованы на рынке, особенно в птицеводстве.

КД – скоропортящийся продукт, сохранность которого обеспечивается сушкой при значительных энергозатратах. Для их сокращения разработана технологическая схема линии производства КД и других продуктов микробного синтеза с использованием в качестве субстрата мезги и КС, которые предварительно глубоко концентрируют на ультрафильтрационной (УФ) и обратноосмотической (ОО) мембранных установках (см. рисунок).

Исходный (нативный) КС освобождается от микроорганизмов, коллоидов, взвешенных и высокомолекулярных веществ с одновременной холодной стерилизацией в УФ установке (поз. 1). Прозрачный УФ пермеат, содержащий в растворенном состоянии только легко усваиваемые биологически активные вещества (БАВ), концентрируют в 5–7 и более раз в ОО установке (поз. 2). При ее использовании энергозатраты снижаются более чем в 5 раз по сравнению с вакуум-выпариванием. Учитывая высокую селективность УФ и ОО мембран [3], качество ОО пермеата соответствует качеству воды, что позволяет использовать его в рецикле в основном производстве картофеле-крахмальных заводов.

средах на основе мезги и ОО концентрата КС в зависимости от степени его концентрирования.

Исследования выполнены в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (тема № 0529-2019-0066).

Литература

1. Стахеев, И.В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И.В. Стахеев, Э.И. Коломиец, Н.А. Здор. – Мн.: Навука і тэхніка, 1991. – 264 с.
2. Ягофаров, Д.Ш. Получение биопродуктов из вторичных ресурсов переработки картофеля / Д.Ш. Ягофаров // Вестн. Казанского технол. ун-та. – 2015. – № 9. – С. 257–260.
3. Кудряшов, В.Л. Применение мембранных и биотехнологических процессов в крахмалопаточной промышленности // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2014. – № 4. – С. 34–39.
4. Храпова, А.В. Скрининг новых штаммов дрожжей для получения кормового белка / А.В. Храпова // Изв. Самарского науч. центра РАН. – 2011. – № 5. – С. 210–212.

Выделение и характеристика микромицетов с гербицидной активностью в отношении одуванчика лекарственного

Купцов В.Н.¹, Мандрик-Литвинкович М.Н.¹, Волоханович А.А.²,
Коломиец Э.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kuptsov@hotmail.com

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В последние годы, в результате повышения устойчивости растений одуванчика лекарственного к химическим гербицидам, отмечено существенное засорение городских газонов, снижение их декоративных качеств и насыщение воздуха пылью, которая может вызвать ряд сильных аллергических реакций дыхательных путей и кожных покровов человека. Поэтому снижение количества одуванчика лекарственного является необходимым и, несомненно, будет иметь практическое значение для создания экологически чистых зеленых зон в условиях урбанизированной среды. Использование биопрепаратов на основе микромицетов в качестве альтернативного химическому методу борьбы с сорной растительностью является перспективным и уже имеет место в мировой практике [1, 2]. В связи с этим актуальным является выделение, селекция и изучение новых агентов биологического контроля сорной растительности с целью разработки экологически безопасных средств защиты растений.

В результате проведенного скрининга, из пораженных корней, стеблей и листьев одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*) выделено восемь изолятов грибов. С целью поиска оптимальной среды, обеспечивающей быстрый рост выделенных культур, было проведено измерение линейного роста колоний на трех питательных средах: картофельно-глюкозном агаре (КГА), агаре Чапека и на сусло-агаре (СА) (таблица).

Для большинства штаммов на всех средах характерен более активный рост в период 3-7 сутки. Исключением является изолят 0-6, колонии которого достигают своего максимального размера уже на третьи сутки.

Средняя линейная скорость роста колоний для большинства грибов (0-1, 0-2, 0-9, СН 1, СН 2, СН 3) выше на среде СА. На КГА быстрее растет только изолят 0-3, а на агаре Чапека – 0-6. На картофельно-глюкозном агаре отмечено более активное спороношение грибов по сравнению с другими средами.

Основываясь на данных культурально-морфологических признаков и результатах молекулярно-генетического анализа, изученные изоляты были отнесены к следующим родам: *Fusarium* sp. (0-1, 0-2, 0-3), *Epicoccum* sp. (СН 1, СН 2, СН 3), *Alternaria* sp. (0-9), *Mucor* sp. (0-6).

Таблица – Линейная скорость роста грибов на различных питательных средах

Изолят гриба	Скорость роста на питательных средах, мм/сут.											
	КГА				СА				Агар Чапека			
	3 сут.	5 сут.	7 сут.	Хср.	3 сут.	5 сут.	7 сут.	Хср.	3 сут.	5 сут.	7 сут.	Хср.
0-1	5,83	2,30	3,07	3,73	6,33	2,40	3,57	4,10	5,50	1,00	1,57	2,69
0-2	4,33	2,20	3,71	3,41	6,67	3,80	3,43	4,63	3,00	3,00	4,29	3,43
0-3	2,33	4,40	4,71	3,81	4,67	3,00	4,29	3,99	7,17	0,10	3,21	3,49
0-6	13,33	0,80	0,57	4,90	13,83	0,50	0,36	4,90	11,33	2,00	1,43	4,92
0-9	4,67	1,50	1,43	2,53	4,67	4,00	4,29	4,32	5,00	3,80	3,43	4,08
СН 1	2,50	0,00	0,00	0,83	6,33	2,20	3,21	3,91	4,17	1,10	2,00	2,42
СН 2	3,00	1,00	1,07	1,69	5,17	1,70	2,14	3,00	3,17	0,90	1,00	1,69
СН 3	3,33	1,80	2,00	2,38	6,83	2,70	3,36	4,30	3,00	2,00	2,86	2,62

В модельных опытах по искусственному заражению одуванчика лекарственного установлено, что наибольшей гербицидной активностью обладает штамм *Mucor* sp. 0-6, обработка которым приводит к увяданию более 50% листьев и последующей гибели растений в течение 2 недель после инфицирования. Штаммы *Epicoccum* sp. СН 1, СН 2, СН 3 и *Fusarium* sp. 0-1, 0-2, 0-3 приводят к средней степени поражения растений, при которой увядает менее 50% листьев. Штамм *Alternaria* sp. 0-9 вызывает незначительные некрозы листьев, что существенно не влияет на рост растений.

С целью изучения фитотоксичности грибов изучено их влияние на культурные растения: люпин узколистный, овес, бархатцы, огурец и салат. Согласно полученным данным, штаммы грибов не проявляют фитотоксического эффекта в отношении изученных культурных растений. Выявлено ростстимулирующее действие гриба *Mucor* sp. 0-6, проявляющееся в увеличении длины корня и надземной части растений до 30%.

Таким образом, выделенные штаммы грибов, проявляющие гербицидную активность в отношении сорной растительности при отсутствии фитотоксического эффекта на культурных растениях, представляют интерес в качестве перспективных агентов биологического контроля одуванчика лекарственного на газонах.

Литература

1. T.M. Butt. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential / T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan // – CABI. – 2001. P. 1–11.
2. Bioherbicides for weed control / M.A. Weaver [et al.] // Non-chemical weed management. – 2007. – P. 93–110.

Влияние бензоата натрия и пиросульфита натрия на развитие консорциумов молочнокислых бактерий

Липень В.А., Прищепа Л.И., Василенко С.Л., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.

*РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Беларусь,
электронный адрес: meat-dairy@tut.by*

Интенсификация производства продукции животноводства требует разработки новых и совершенствования существующих технологий заготовки высококачественных кормов. В качестве консервирующих веществ для получения высококачественного силоса помимо биологических препаратов используют и химические соединения. Процессы силосования с использованием любого вида консерванта характеризуются сложным сочетанием большого числа факторов (развитие микроорганизмов в зависимости от дозы компонентов, кислотности и температуры силоса). Учитывая, что консерванты обладают специфическим действием в отношении различных видов микроорганизмов, а порча кормов обуславливается большим видовым разнообразием бактерий, грибов, дрожжей, то создание комбинированных составов, содержащих как живые микроорганизмы, так и химические компоненты, несомненно, имеет преимущества [1].

Эффективность комплексных консервантов для силосования растительной массы зависит от используемых молочнокислых микроорганизмов, так как именно они и определяют направленность процесса силосования. Рациональным является использование культур молочнокислых бактерий, для которых показана возможность совместного использования с химическими веществами: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* и лактококки [2, 3].

В работе использовали культуры из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов, на основании которых сконструировано по четыре консорциума, включающих штаммы лактококков и по одному штамму *Lactobacillus plantarum* – консорциумы №1, 2, 5, 6, а также штаммы лактококков и по одному штамму *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei* – консорциумы № 3, 4, 7, 8.

Исследование консорциумов молочнокислых бактерий на совместимость с химическими соединениями (пиросульфит натрия или бензоат натрия в концентрациях 0,01 и 0,001%) проводили путем изучения способности развиваться в питательной среде МРС в присутствии исследуемых химических веществ. Определяли изменение активной кислотности среды, оптической плотности и количества клеток за 24 ч культивирования.

Через 24 часа культивирования консорциумов штаммов на питательной среде МРС с бензоатом натрия (в обеих исследуемых концентрациях) или

пиросульфитом натрия (в обеих исследуемых концентрациях) разница в снижении активной кислотности среды составила $\Delta=2,57-2,96$ ед. рН для всех восьми исследованных консорциумов, в контрольных вариантах $\Delta=2,72-2,83$ ед. рН (таблица).

Таблица – Изменение активной кислотности среды с и без добавления химических компонентов в процессе роста бактериальных консорциумов

Номер консорциума	Контроль		0,001% пиросульфит натрия		0,01% пиросульфит натрия		0,001% бензоат натрия		0,01% бензоат натрия	
	рН после внесения культуры	рН через 24 ч инкубирования	рН после внесения культуры	рН через 24 ч инкубирования	рН после внесения культуры	рН через 24 ч инкубирования	рН после внесения культуры	рН через 24 ч инкубирования	рН после внесения культуры	рН через 24 ч инкубирования
1	6,62	3,82	6,50	3,69	6,41	3,78	6,31	3,47	6,28	3,66
2	6,60	3,77	6,55	3,59	6,42	3,75	6,30	3,55	6,29	3,64
3	6,61	3,80	6,48	3,71	6,38	3,69	6,32	3,52	6,28	3,64
4	6,62	3,88	6,49	3,66	6,40	3,72	6,32	3,62	6,27	3,57
5	6,61	3,84	6,52	3,59	6,43	3,73	6,31	3,57	6,28	3,65
6	6,62	3,90	6,54	3,58	6,42	3,69	6,30	3,68	6,28	3,68
7	6,60	3,85	6,53	3,64	6,42	3,75	6,31	3,70	6,27	3,70
8	6,62	3,81	6,51	3,67	6,43	3,68	6,31	3,66	6,30	3,66

Изучение изменения оптической плотности среды культивирования не выявило значительных различий при добавлении пиросульфита натрия или бензоата натрия в указанных концентрациях: показатель оптической плотности при культивировании бактериальных консорциумов через 24 ч возрастал с 0,01-0,02 до 2,42-2,58 ед. ОП в зависимости от используемого консорциума, и не отличался от контроля (без химических консервантов).

Изучение количества клеток через 24 ч культивирования также не выявило различий при развитии всех консорциумов в средах, содержащих бензоат натрия или пиросульфит натрия, по сравнению со средой без химических консервантов: во всех исследуемых образцах количество клеток молочнокислых бактерий достигло $(2,2 - 3,6) \times 10^9$ КОЕ/г.

Таким образом, установлено, что добавление пиросульфита натрия или бензоата натрия в концентрациях 0,01 и 0,001% в питательную среду не оказывает ингибирующего действия на рост и развитие консорциумов молочнокислых бактерий.

Литература

1. Победнов, Ю.А. Биологические основы силосования и сенажирования трав (обзор) / Ю.А. Победнов, В.М. Косолапов // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 2. – С. 31–41.
2. Jatkauskas J., Vrotniakienė V. The effects of silage inoculants on the fermentation and aerobic stability of legume -grass silage / J. Jatkauskas, V. Vrotniakienė // Zemdirbyste-Agriculture. – 2011. – V. 98 № 4 – P. 367-374.
3. Косолапова, Е.В. Силосование козлятника восточного с комбинированным составом препаратов / Е.В. Косолапова, В.В. Косолапов, Н.Н. Кучин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2015. – № 1 – С. 6–10.

Оценка перспективности использования изолятов *Bacillus* sp. в качестве основы пробиотической кормовой добавки

Лобан Е.Н., Проскурнина И.А., Романовская Т.В., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

Интенсивность развития современного животноводства напрямую зависит от качества и состава кормов. Необходимо, чтобы рацион животных был сбалансированным и обеспечивал гармоничный рост и развитие за максимально короткий промежуток времени. Это вызывает острую необходимость применения в кормлении сельскохозяйственных животных пробиотических кормовых добавок на основе высокоактивных штаммов полезных бактерий, которые обладают высокой ферментативной и антагонистической активностью, устойчивостью к действию желчи, повышенному содержанию солей, колебаниям рН и другим условиям, возникающим при прохождении через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [1]. Включение их в рационы животных обеспечивает интенсификацию обменных процессов в организме, вытеснение патогенной и условно-патогенной микрофлоры из ЖКТ, повышение доступности кормов [2].

Целью данной работы является изучение пробиотических свойств выделенных бактерий рода *Bacillus* и определение возможности их использования в качестве основы кормовой добавки.

Из почвенных образцов выделены спорообразующие бактерии из которых методом точечного тестирования на агаризованных средах [3] отобраны изоляты 19, 36, 45, характеризующиеся антагонистическим действием в отношении условно-патогенной микрофлоры. На основании данных, полученных при изучении физиолого-биохимических свойств (грамположительные палочки, образующие эндоспоры, подвижные, каталазоположительные, аэробы и др.), установлена их принадлежность к роду *Bacillus*.

На следующем этапе скрининга культуры выращивали глубинным способом и исследовали антимикробные свойства культуральной жидкости (КЖ) бактерий и бесклеточного фильтрата КЖ методом лунок [3]. Показано, что антимикробное действие КЖ бактерий в отношении *E. coli* выражается как в образовании зон лизиса тест-объекта, так и зон нарастания бактерий на патоген, что свидетельствует о проявлении антагонизма в двух формах – в форме антибиоза и гиперпаразитизма.

При внесении в лунки бесклеточных фильтратов образуется зона лизиса *E. coli*, причем диаметр ее меньше, чем при использовании КЖ, что

обусловлено суммарным действием клеток и метаболитов бактерий-антагонистов. Антагонистическая активность КЖ изолятов в отношении патогенных бактерий *Staphylococcus sp.* проявляется в виде зон нарастания диаметром 31-36 мм, бесклеточные фильтраты образуют зоны лизиса размером 12-17 мм. Наибольшую антимикробную активность в отношении проверенных тест-объектов проявляет изолят *Bacillus sp. 45*.

Исследуемые изоляты тестировали на наличие протеолитической и амилолитической активностей по образованию зон гидролиза казеината натрия и крахмала, соответственно [4]. Установлено, что протеолитическая активность наиболее выражена у изолята *Bacillus sp. 45* (диаметр зоны гидролиза казеината натрия 45,4 мм), амилолитическая – у *Bacillus sp. 36* (диаметр зоны гидролиза крахмала 23,0 мм).

Для оценки устойчивости к желчи, колебаниям рН среды и высокой концентрации солей определяли титр КОЕ бактерий до и после 6-часового инкубирования под воздействием вышеуказанных факторов [5]. Установлено, что все исследуемые изоляты способны развиваться в широком диапазоне рН (4,0-9,0), проявляют толерантность к желчи в концентрации 10% и жизнеспособность в присутствии 6,5% NaCl.

Основываясь на результатах исследования, можно сделать вывод о перспективности использования изученных бактерий в качестве основы пробиотических кормовых добавок для животных.

Литература

1. Богатырев, И. Н. Использование биопрепаратов в кормлении животных для получения экологически чистого сырья / И. Н. Богатырев // Современное комбикормовое производство и перспективы его развития. – М.: МПА, 2003. – С. 84–88.
2. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–192.
3. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – С. 164–169.
4. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы: Учебно-метод. комплекс для студентов биол.фак.спец. G-31 01 01 «Биология» / Р.А.Желдакова, В.Г.Мямин.- Мн.– БГУ, 2006.– 116 с.
5. Фармакопея [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/>. – Дата доступа: 01.04.2019.

Биоконтроль фузариозной корневой гнили ризосферными штаммами рода *Pseudomonas*

Масленникова С.Н.^{1,2}

¹Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, Россия;

²АО «Шелково Агрохим», г. Шелково, Россия,
электронный адрес: maslennikova@betaren.ru

Известно, что ризосферная микрофлора оказывает существенный вклад в развитие растений, реализуя целый комплекс полезных свойств, таких как стимуляция роста, антагонизм фитопатогенных грибов и бактерий, улучшение минерального питания и др. Такие бактерии получили название PGPR (от англ. Plant Growth Promoting Rhizobacteria) и являются в настоящее время наиболее перспективными агентами для решения агробиотехнологических задач.

Цель и объекты исследования

Целью исследования явился анализ биоконтрольной активности штаммов, выделенных из ризосферы озимой пшеницы (Краснодарский край), *Pseudomonas asplenii* 11RW, *Pseudomonas umsongensis* 12RW, *Pseudomonas migulae* 18RW, *Pseudomonas vancouverensis* 37RW против фузариозной корневой гнили.

Методы исследования

Инокулом фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* MFG 159811 готовили с использованием стерильного зерна ячменя [1], которое заражали блоком агара, вырезанного из посева 7-суточного гриба на среде КСА, и инкубировали в течение 21 суток при комнатной температуре. Анализируемые бактерии выращивали на жидкой среде King's B в шейкере-инкубаторе (220 об/мин, 30°C) в течение 24 часов. После чего клетки трижды отмывали путем центрифугирования (3 мин при 13000 об/мин) и суспендирования в стерильном физиологическом растворе. Полученной суспензией обрабатывали семена яровой пшеницы «Дарья» с нормой расхода суспензии 1 л/т и нормой рабочего раствора – 10 л/т. Контрольные семена обрабатывали стерильной дистиллированной водой.

Биоконтрольную активность штаммов оценивали в опыте с использованием стерильного торфогрунта, который смешивали с инокуломом фитопатогена (1%, в/в) [2]. Пластиковые стаканы объёмом 200 мл заполняли слоем стерильного вермикулита (5 см высотой), затем вносили 10 г инфицированной почвы, на поверхность которой раскладывали по 5 обработанных семян, которые покрывали слоем стерильного увлажненного вермикулита (2 см). Повторность 10-кратная. Посевы инкубировали в течение 15 суток при 24±2°C и 16/8-часовом световом периоде. По окончании

выращивания проростки извлекали из стаканов, отмывали от субстрата и фиксировали всхожесть, наличие/отсутствие признаков заболевания и измеряли длину надземной и подземной частей растений.

Результаты исследования

Некоторые штаммы р. *Pseudomonas* были проверены на способность ингибировать развитие фузариозной гнили в опыте с искусственным заражением *F. graminearum* MFG 159811, которое характеризовалось побурением coleoptily и загниванием корней.

Показано, что все проанализированные бактерии в разной степени снижают развитие заболевания, при этом штаммы *P. umsongensis* 12RW и *P. asplenii* 11RW проявляют наибольшую антагонистическую активность: зараженность в этих вариантах ниже на 36,9 и 31,7% относительно инфицированного контроля. При этом отмечается и ростстимулирующее действие, особенно штамма 11RW, что проявляется в увеличении длины как надземной части растения, так и корневой системы по сравнению с незараженным и инфицированным контролем (таблица).

Таблица – Результаты анализа биоконтрольной и ростстимулирующей активности ризобактерий

Вариант	Всхожесть, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Зараженность, %
Контроль	96	22,9±0,9	24,3±1,3	-
Контроль + <i>F. graminearum</i>	92	23,6±0,9	25,1±1,5	60,9
<i>P. asplenii</i> 11RW + <i>F. graminearum</i>	96	27,0±0,8	26,8±1,0	29,2
<i>P. umsongensis</i> 12RW + <i>F. graminearum</i>	100	25,2±0,8	26,7±1,5	24,0
<i>P. migulae</i> 18RW + <i>F. graminearum</i>	96	24,5±0,8	26,6±1,5	37,5
<i>P. vancouverensis</i> 37RW + <i>F. graminearum</i>	96	24,8±0,6	25,2±1,1	41,7

Таким образом, результаты проведенного опыта демонстрируют перспективность штаммов *P. asplenii* 11RW и *P. umsongensis* 12RW для защиты растений против почвенных грибных фитопатогенов, а также в качестве регуляторов роста.

Литература

1. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields / Yang M. [et al.] // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101, iss. 12. – P. 1481-1491.
2. Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from Chinese fields with contaminated soils / Wang X. [et al.] // *Microb Biotechnol*. – 2015. – Vol. 8, iss. 3. – P. 404-418.

Особенности развития *Trifolium pratense* L. с арбускулярными микоризными грибами на луговых фитоценозах при демутации

Мазурек Б.Г., Жебрак И.С.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,
электронный адрес: bozhena.mazurek@mail.ru

Клевер луговой обладает универсальными хозяйственно-полезными свойствами, является одним из основных источников производства высококачественных кормов. Кроме того, данная культура обладает ценнейшими биологическими особенностями, главной из которых является высокое содержание протеина. Незаменима его роль в сохранении и восстановлении плодородия почв. Этим обстоятельством вызван интерес к изучению клевера лугового на луговых фитоценозах на разных стадиях сукцессии, как модели развития растения в симбиозе [1].

Цель работы: изучить особенности развития клевера лугового (*Trifolium pratense*) с арбускулярными микоризными грибами при демутации луговых фитоценозов.

Нами были отобраны четыре луговых фитоценоза, находящиеся на разных стадиях сукцессии, в которых выкапывали по 25 растений клевера лугового. У растений измеряли массу и высоту надземной части и корней. Учет степени микоризации арбускулярными микоризными грибами (АМГ) клевера лугового проводили методом Травло. После мацерации корни окрашивали анилиновым синим, готовили препараты, микроскопировали и проводили оценку частоты встречаемости АМГ, интенсивность микоризации и обилие арбускул [2].

Для определения концентрации флаваноидов готовили спиртовую вытяжку из листьев клевера лугового, прибавляли раствор алюминия хлорида, измеряли оптическую плотность полученного раствора на фотоколориметре при длине волны 410 нм. Вычисляли процентное содержание суммы флаваноидов [3]. Определение концентрации хлорофилла в листьях клевера проводили по следующей методике. Готовили вытяжку листьев клевера лугового в этаноле. Измеряли оптическую плотность вытяжки на фотоколориметре при длине волны 665 нм и 649 нм. Рассчитывали процентное содержание хлорофилла а и б [4]. Содержание белка в образцах клевера лугового определяли по методу Брэдфорда [5].

Отмечали увеличение высоты надземной части *Trifolium pratense* произрастающих на луговых фитоценозах более поздних стадиях сукцессии (таблица). Однако наибольшая масса надземной части, длина главного корня и масса корня растений была на первой стадии сукцессии. При проведении учета

степени микоризации было выявлено увеличение интенсивности микоризации (9,01-64,69%), обилия арбускул (7,47-56,72%), частоты встречаемости арбускулярных микоризных грибов (69,14-96,37%) в корнях растений клевера лугового, произрастающего на более поздних стадиях развития. Наибольшее содержание белка (0,09 мг) и хлорофилла (0,35%) было отмечено на третьей стадии сукцессии, однако при этом у клевера лугового на третьей стадии сукцессии отмечали наименьшее содержание флаваноидов (1,6%).

Таблица – Биометрические и фитохимические показатели *Trifolium pratense* в луговых фитоценозах на разных стадиях сукцессии

Стадия сукцессии лугового фитоценоза	Флаваноиды, %	Хлорофилл, %	Содержание белка, мг	Ф, %	А, %	М, %	Высота надземной части, см	Длина главного корня, см	Масса надземной части, г	Масса корня, г
Первая	1,8	0,31	0,07	69,1	7,5	9,0	40,2	13,9	72,7	7,9
Вторая	1,9	0,31	0,06	71,9	28,2	28,8	37,9	9,9	23,6	3,8
Третья	1,6	0,35	0,09	93,6	30,8	33,3	44,3	10,8	43,8	3,6
Естественный луг	2,8	0,22	0,05	96,4	56,7	64,7	53,8	11,7	53,2	4,4

Таким образом, в ходе сукцессий происходит постепенное увеличение плотности популяции *Trifolium pratense*, направленная смена преимущественных способов почвенного питания, усиление тесноты связи клевера лугового с арбускулярными микоризными грибами, что, по-видимому, влияет на его биометрические и фитохимические параметры.

Литература

1. Новоселов, М.Ю. Современные подходы к селекции клевера лугового для кормопроизводства России // М.Ю. Новоселов, Л.В. Дробышева и др. // Сорта и семена. – 2014. – 65 с.
2. Trouvelot A. Mesure du taux de mycorhization VA d, un systeme racinaire. Recherche de methods d, estimation ayant une signification fonctionnelle / A. Trouvelot, J.L. Kough, V. Gianinazzi-Pearson // Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. – Paris. – 1986. – P. 217-221.
3. Биохимические методы анализа. Под ред. М.Н. Запрометова, – Москва: Издательство иностранной литературы, 1960. – 592 с.
4. Туманов, В.Н. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза: практикум / В.Н. Туманов, С.Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.
5. Jones, C.G. Measuring plant protein with the Bradford assay / Clive G. Jones, J. Daniel Hare, Steve J. Compton // Journal of Chemical Ecology. – Vol. 15. – No. 3. – 1989. – P. 979-992.

Выделение и характеристика бактериофагов *Pseudomonas syringae*

**Орловская П.И., Гирилович Н.И., Пилипчук Т.А.,
Мандрик-Литвинкович М.Н., Коломиец Э.И.**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: orlovskapi@gmail.com*

Фитопатогенные бактерии вызывают заболевания практически всех культурных растений, чем наносят значительный ущерб растениеводству. Одними из опасных возбудителей болезней сельскохозяйственных культур являются бактерии *Pseudomonas syringae*. Представители данного вида практически повсюду и поражают примерно 180 видов как культурных, так и дикорастущих растений. Симптоматика заболеваний различна: опухоли, некрозы, хлороз листьев, гниение, прекращение роста и гибель частей растения без загнивания и др. [1].

К распространенным методам борьбы с бактериозами, вызываемыми *P. syringae*, относятся использование устойчивых сортов, соблюдение севооборота, предпосевная обработка семян стрептомицином, а также обработка растений на ранних стадиях вегетации химическими соединениями на основе меди [2, 3]. К биологическим методам контроля относится использование бактериофагов. Плюсы их применения в том, что фаги высокоспецифичны в отношении фитопатогенных бактерий и не оказывают негативного воздействия на растения и животных [4].

Целью работы являлось выделение и характеристика бактериофагов *P. syringae*.

В период с марта по апрель 2019 г. было выделено 5 бактериофагов. В качестве индикаторного штамма использовали фитопатогенные бактерии *P. syringae* БИМ В-268 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Бактериофаги PsP1 и PsP2 были выделены из плодов и листьев растений томата с признаками бактериального заражения, бактериофаг PsP3 – из образца минеральной ваты (субстрата для выращивания томата), отобранного на территории теплицы с гидропонной технологией выращивания овощных культур (Гродненская область, РБ), а фаги PsP4 и PsP5 – из образцов почвы (Гродненская и Минская области, РБ). На газоне индикаторного штамма фаги PsP1 и PsP2 образовывали прозрачные негативные колонии диаметром 5-7 мм. Фаги PsP3, PsP4, PsP5 формировали прозрачные мелкие зоны диаметром 1-2 мм с четко очерченным краем.

Было установлено, что бактериофаги обладают различным спектром литического действия по отношению к 4 штаммам вида *P. syringae*

(*P. syringae* БИМ В-239, *P. syringae* БИМ В-266, *P. syringae* БИМ В-267, *P. syringae* БИМ В-268). Так, фаги PsP1, PsP2 и PsP5 проявляли активность только в отношении бактерии-хозяина *P. syringae* БИМ В-268, а фаги PsP3 и PsP4 формировали зоны лизиса на всех 4 исследованных штаммах. Также была изучена литическая активность выделенных фагов в отношении фитопатогенных бактерий родов *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Dickeya*, *Pectobacterium*. Однако ни один из фагов не дал зоны лизиса на представителях вышеперечисленных родов бактерий, что свидетельствует об их родоспецифичности.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было выделено 5 штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий *P. syringae*, изучена морфология их негативных колоний и спектр литической активности на штаммах вида *P. syringae* (БИМ В-239, БИМ В-266, БИМ В-267, БИМ В-268), а также на представителях родов *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Dickeya*, *Pectobacterium*. Выделенные штаммы бактериофагов в дальнейшем могут быть использованы в качестве агентов для борьбы с бактериозами сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Атлас болезней сельскохозяйственных культур в 5 томах / Й. Станчева. – Москва: София, 2003-2005. – 5 т.
2. Центр по борьбе с трудноискоренимыми болезнями растений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://karantin.net/>. – Дата доступа: 08.04.2019.
3. Русских, И.А. Болезни фасоли в Белоруссии / И.А. Русских // Защита и карантин растений. – 2008. – № 1. – С. 17–18.
4. Frampton R. A., Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens / R.A. Frampton, A. R. Pitman, P. C. Fineran // International Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 2012. – 11 p.

Скрининг спорообразующих бактерий, перспективных для создания кормовой добавки на основе крахмалсодержащего сырья

Проскурнина И.А.¹, Сверчкова Н.В.¹, Романовская Т.В.¹, Кантор К.В.¹, Коломиец Э.И.¹, Михалюк А.Н.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by

²УО «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь, электронный адрес: alex-vet@mail.ru

В связи с необходимостью экологизации животноводческой отрасли в Республике Беларусь возникает потребность введения в состав рационов сельскохозяйственных животных и птицы микробных кормовых добавок [1–3]. Особого внимания заслуживает разработка пробиотических кормовых добавок, обладающих комплексным действием – ферментативной активностью и способностью подавлять развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры. В качестве основы пробиотиков наиболее перспективны спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Способность споровых пробиотиков к синтезу гидролитических ферментов позволяет получать в результате биоконверсии углеводных растительных субстратов ценные кормовые продукты с повышенным содержанием белка, биологически активных соединений и жизнеспособных в течение длительного времени клеток пробиотических культур. Экзогенные ферменты бацилл улучшают использование трудноперевариваемых компонентов корма и, наряду с пробиотическим эффектом, способствуют поддержанию микробного гомеостаза кишечника [4–6].

С целью поиска штаммов, перспективных для создания кормовой добавки на основе крахмалсодержащего сырья, из образцов, отобранных на территории животноводческой фермы и птичника, выделено 50 изолятов, способных к росту на минимальной агаризованной среде с 1% растворимым крахмалом в качестве единственного источника углерода. Около 30% из них проявляло избирательную антагонистическую активность против *E. coli* 39А и *S. aureus* В 107, 50% обладало амилалитической активностью, 66% – КМЦ-азной и β-глюканазной, 68% – ксиланазной. При этом только 10% (5 изолятов) характеризовались способностью продуцировать комплекс гидролитических ферментов и антимикробных метаболитов одновременно, из них 3 изолята (К9, 19, 40) проявляли наибольшую активность.

При тестировании изолятов К9, 19 и 40 в отношении тест-объектов, выделенных от животных с клиническими признаками колибактериоза и

маститы, установлена способность отобранных культур подавлять рост патогенных микроорганизмов с эффективностью 50–70%.

Изучены физиолого-биохимические свойства и генетические особенности выделенных изолятов, в соответствии с которыми они отнесены к виду *Bacillus velezensis*.

Испытания токсигенности и патогенности штаммов К9, 19 и 40 показали, что они являются непатогенными и безвредными для лабораторных животных, не обладают токсичностью, аллергенностью и токсигенными свойствами и могут использоваться в микробиологической промышленности.

Среди коллекционных культур, которые тестировали по тем же параметрам, что и выделенные изоляты, требуемым критериям отбора (способностью продуцировать комплекс ферментов и антимикробных метаболитов) соответствовал штамм *B. amyloliquefaciens* БИМ В-497Д.

При глубинном выращивании отобранных культур на крахмалосодержащей среде наиболее высокие показатели (титр КОЕ и спор, утилизация сахаров, α -амилазная активность) установлены для бактерий *B. velezensis* К9 и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-497Д.

При оценке совместимости исследуемых штаммов показано отсутствие перекрестного антагонизма, что свидетельствует о возможности их совместного использования.

Литература

1. Механизмы влияния пробиотических препаратов кормового назначения на кишечное микробное сообщество и стратегия повышения их эффективности / Н.А. Ушакова, Р.В. Некрасов, Н.В. Сверчкова, Э.И. Коломиец // Известия РАН. Серия биологическая. - 2015, № 5. – С. 1–9.
2. Пышманцева, Н.А. Научное обоснование практического применения отечественных пробиотиков в птицеводстве и животноводстве : дис. ... д-ра с.-х. наук / Н.А. Пышманцева. – Краснодар, 2012. – 350 с.
3. Лев, И.О. Антимикробные свойства низкомолекулярных пептидов, биосурфактантов и метаболитов из некоторых видов энтерококков и бацилл / И.О. Лев, И.А. Дунайцев, В.Д. Похиленко // Актуальные вопросы развития современного общества: материалы I Междунар. науч.-практ. конф., Пермь, 15 мая 2016 г. / ФБУН Гос. научн. центр прикл. микр. и биотехн. ; редкол.: Т.М. Сигитов [и др.]. – Пермь: ФБУН, 2016. – 106 с.
4. Грязнева, Т.Н. Биологически активные вещества, продуцируемые бактериями рода *Bacillus* / Т.Н. Грязнева // Лечащий врач. – 2013. – № 4. – С. 54–63.
5. Berkold, Y. Effect of probiotic preparations on the basis of *Bacillus subtilis* on physiological growth indices of chicken broilers / Y.I. Berkold, A.B. Ivanova // Siberian Herald of Agricultural Science. 2006. – № 6. – P. 45–48.
6. Соколенко, Г.Г. Пробиотики в рациональном кормлении животных / Г.Г. Соколенко, Б.П. Лазарев, С.В. Миньченко // Технологии пищ. и перерабатыв. пром. АПК – продукты здорового питания / Воронеж, 2015. – №1. – С. 72–78.

Эффективность выделения штаммов *Lactobacillus* ssp. из пресноводной и морской рыбы

Романович Н.С., Кравченко Н.С., Крученок Т.В., Василенко С.Л.,
Жабанос Н.К., Фурик Н.Н.

РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Беларусь,
электронный адрес: meat-dairy@tut.by

В последнее время возрастает интерес исследователей к выделению культур молочнокислых бактерий из источников водного происхождения: рыбы, моллюсков, креветок и т.д. Так, 335 штаммов, обладающих высокой антагонистической активностью, выделены из радужной форели [1]. Штаммы трех видов лактобацилл (*Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*) выделены из лосося холодного копчения, упакованного под вакуумом [2]. Как в период питания, так и в период зимовки, в микрофлоре кишечника карпов обнаружены культуры *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum* [3]. Таким образом, выделение лактобацилл, обладающих производственно-ценными свойствами, из рыбы, морепродуктов и т.д. является актуальной задачей.

Для исследования использовано 26 образцов пресноводной и 28 образцов морской рыбы и морепродуктов. Получено 30 накопительных культур, содержащих клетки, являющиеся слабыми кислотообразователями при развитии на молочных средах. Из исследованных накопительных культур выделено 19 каталазоотрицательных изолятов, ферментирующих молочное сырье. Клетки изолятов представлены неспорообразующими, грамположительными палочками, расположенными в микроскопическом препарате поодиночке, в парах и коротких цепочках.

Проведена идентификация изолятов с использованием физиолого-биохимических тестов (рост при различных температурах, способность ферментировать различные углеводы с использованием стрип-систем API 50 CH, способность развиваться в среде с различным содержанием NaCl и др.). В ходе изучения устойчивости исследованных изолятов к условиям консервации путем лиофильного высушивания установлено, что только семь изолятов из 19 сохраняют удовлетворительные характеристики жизнеспособности после лиофилизации и хранения в течение двух месяцев. Для остальных изолятов регистрировали снижение количества клеток в 1 000 – 1 000 000 раз.

Пять изолятов лактобацилл идентифицированы с использованием молекулярно-генетических методов как *Lactobacillus paracasei* (1 штамм), *Lactobacillus curvatus* (2 штамма), *Lactobacillus sakei* (2 штамма). Установлено, что скорость снижения активной кислотности в процессе культивирования в MRS-среде у штаммов, полученных из рыбных ресурсов, сходна с таковой у

лактобацилл из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов.

Все выделенные штаммы лактобацилл обладали антагонистической активностью к *E. coli* (зона задержки роста составила 7 мм и более).

Проведен сравнительный анализ эффективности выделения штаммов лактобацилл при использовании в качестве объектов выделения различных природных источников (образцы доставлены в лабораторию в 2016 – 2018 гг). Результаты представлены на рисунке.

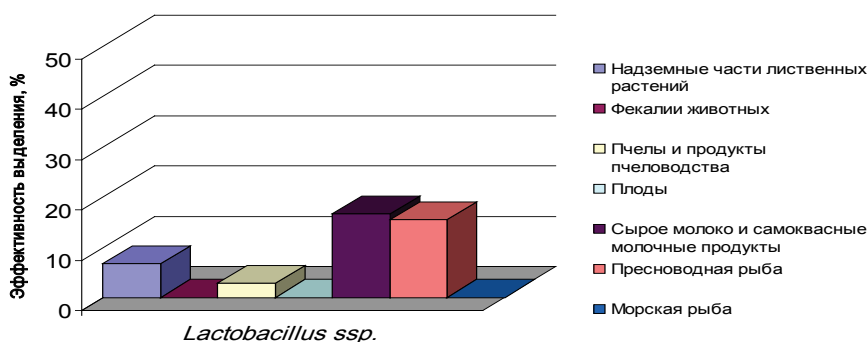


Рисунок – Эффективность выделения производственных штаммов *Lactobacillus spp.* из различных природных источников

Как видно из рисунка, эффективность выделения штаммов лактобацилл выше из сырого молока и самоквасных молочных продуктов (16,7%), а также из пресноводной рыбы (15,4%). Из надземных частей лиственных растений и продуктов пчеловодства штаммы лактобацилл выделяли с меньшей эффективностью (6,7% и 2,8% соответственно). Из плодов, фекалий животных и из морской рыбы штаммы лактобацилл выделить не удалось (за указанный период).

Таким образом, пресноводная рыба является перспективным источником выделения различных видов лактобацилл.

Литература

1. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. / T. Perez-Sanchez [et al.] // J. Fish Dis. – 2011 – Vol. 34, № 7. – P. 499–507.
2. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. / E. Tome [et al.] // Food Biotechnol. – 2009. – Vol. 23, N 1. – P. 50–73.
3. Jankauskiene, R. Defense mechanisms in fish: *Lactobacillus* genus bacteria of intestinal wall in feeding and hibernating carps / R. Jankauskiene // Ekologija. – 2000. – N 1. – P. 3–6.

Изучение влияния ЭМ-ассоциации на микрофлору деградированных сельскохозяйственных почв

Смирнова И.Э., Саданов А.К.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан, электронный адрес: iesmirnova@mail.ru

Проблема деградации сельскохозяйственных земель остро стоит во многих странах мира, ежегодно из практического использования выбывает до 10 млн. га земель. Одной из основных причин деградации сельскохозяйственных почв являются их нерациональное использование [1, 2]. Сахарная свекла является важной технической культурой и занимает в мире значительную площадь (7,913 млн. га). В наибольшем количестве она производится в России, Франции и Соединенных Штатах [3]. В тоже время, выращивание сахарной свеклы наносит существенный урон почвам, так как с урожаем из почвы выносятся большое количество азота, фосфора и калия [4]. В результате этого, нарушается баланс питательных элементов, уменьшается численность и биоразнообразие микробного сообщества, что приводит к снижению плодородия и деградации почв [5]. В этой связи, проблема рекультивации деградированных почв под культурой сахарной свеклы почв является весьма актуальной. Одним из перспективных направлений восстановления плодородия почв является интродукция ЭМ-ассоциаций, в состав которых включаются основные группы почвенных микроорганизмов, отвечающие за ее плодородие (азотфиксирующие, фосфатмобилизующие, целлюлолитические и силикатные). Эти микроорганизмы стимулируют развитие представителей полезной микрофлоры, обогащают почву легкодоступными элементами питания и синтезируют биологически активные вещества, положительно влияющие на развитие агрокультур [6]. Нами создана ЭМ-ассоциация, состоящая из азотфиксирующих *Azotobacter chroococcum*, фосфатмобилизующих *Bacillus megatherium* и целлюлолитических бактерий *Bacillus cytaseus* [7]. Целью данного исследования была изучение влияния ЭМ-ассоциации на микрофлору деградированных почв.

Для изучения влияния ЭМ-ассоциации на микрофлору почв были проведены модельные опыты. В опытах использовали деградированную почву, собранную в Жамбылском районе Казахстана на полях, где свеклу выращивали в течение 7 лет без ротации культур и применения минеральных удобрений. В вегетационные сосуды объемом 5,0 л помещали 3000 г почвы, в которую вносили 150 мл клеточной суспензии с титром 10^8 кл/мл. Длительность опытов составляла 30 суток. Изучение микрофлоры почв проводили по общепринятым методикам: определяли общее микробное число (ОМЧ) и численность

систематических групп (бактерий, актиномицетов, дрожжей и грибов). Полученные данные представлены на рисунке.

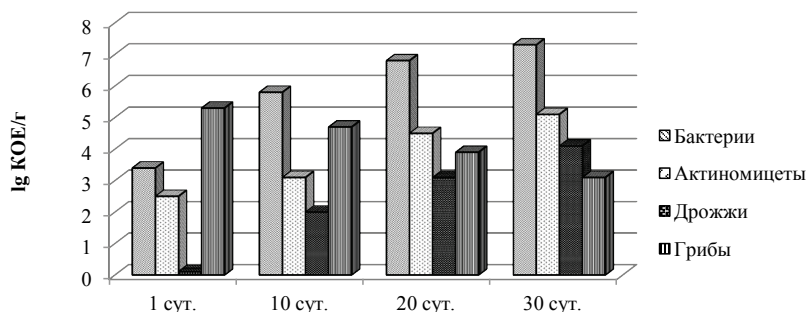


Рисунок – Динамика изменения качественного и количественного состава микрофлоры под влиянием интродукции ЭМ-ассоциации

На рисунке видно, что ОМЧ деградированных почв было невысоким (10^5 КОЕ/г почвы), численность бактерий составляла 2×10^3 КОЕ/г почвы, актиномицетов – $3,4 \times 10^2$ КОЕ/г почвы, грибов – $2,1 \times 10^5$ КОЕ/г почвы. Дрожжи представлены единичными колониями. Такое состояние микробной популяции свидетельствует о высокой степени деградации почв. Интродукция ЭМ-ассоциации существенно повлияла на микрофлору почв. Через 30 суток после внесения ЭМ-ассоциации ОМЧ возросло до 10^7 КОЕ/г почвы, численность бактерий увеличилось на пять порядков, актиномицетов – на два порядка, количество дрожжей – до 10^4 КОЕ/г почвы. В тоже время, отмечено значительное снижение численности грибов по сравнению с их численностью в деградированной почве.

Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии ЭМ-ассоциации на микрофлору деградированных почв, что подтверждается изменением количественного и качественного состава микрофлоры, повышением численности основных систематических групп (бактерии, актиномицеты, дрожжи) на фоне снижения общей численности грибов, а также существенным изменением структуры микробного сообщества почвы.

Литература

1. Деградация земельных ресурсов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://kommunika.wordpress.com/2018/11/30/> // – Дата доступа: 30.11.2018.
2. FAO's State of Food and Agriculture 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.fao.org/3/a-i4373r.pdf?utm_source=flyer&utm_medium=qr&utm_campaign= – Дата доступа: 30.03.2019.
3. Statistics Portal. Sugar beet production worldwide 1965-2016. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.statista.com/statistics/249609/sugar-beet-production-worldwide>. – Дата доступа: 25.06.2018.

4. Вильдфлуш, И.Р. Рациональное применение удобрений / Вильдфлуш И.Р., Цыганов А.Р., Лапа В.В., Персикова Т.Ф. – Горки: БГСХА, 2002. – 324 с.
5. Стогниенко, О.И. Влияние агротехники на почвенную и ризосферную биоту и распространенность микозов сахарной свеклы / Стогниенко О.И., Шамин А.А. // Защита и карантин растений_– 2014. – №8. – С. 12–15.
6. The impact of effective microorganisms (EM) and organic and mineral fertilizers on the growth and mycorrhizal colonization of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur* seedlings in a bare-root nursery experiment / R.M. Bzdyk [et al.]// – Forests. –2018. – Vol. 9. – P. 597–610.
7. Смирнова, И.Э. Влияние ассоциации агрономически ценных микроорганизмов на микрофлору деградированных почв / Смирнова И.Э., Саданов А.К., Нурмуханбетова А.М., Султанова А.Ж. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – №1. – С. 92–96.

Изучение влияния биопрепарата «Фосфобацирин» в полевых условиях

Смирнова И.Э., Саданов А.К., Шорабаев Е.Ж.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан, электронный адрес: iesmirnova@mail.ru

Проблема обеспеченности растений фосфором является одной из самых острых в сельском хозяйстве, так как фосфор находится в почве, в основном, в труднорастворимой форме, в виде минеральных соединений кальция, железа и алюминия. Также, большая группа почвенных фосфатов, представлена органическими соединениями, которые являются труднодоступными для растений [1, 2]. При выращивании сельскохозяйственных культур с урожаем выносятся до 25-40 кг фосфорных соединений на гектар почвы, что требует систематического внесения удобрений. Однако усвояемость фосфорных удобрений культурами не превышает 25%, так как подавляющее его количество фиксируется почвой, превращаясь в недоступные для растений фосфаты [3, 4]. В этой связи, разработка альтернативных путей улучшения минерального питания растений становится весьма актуальной.

Одним из направлений является использование биопрепаратов, созданных на основе микроорганизмов, которые способны к мобилизации фосфатов почвы, переводе их в водорастворимые и легкодоступные для растений формы, что способствует улучшению фосфорного питания растений.

Из почв Алматинской области Республики Казахстан были выделены бактерии рода *Pseudomonas*, проведена идентификация и изучены их основные свойства. Показана способность этих бактерии стимулировать прорастание семян, положительно влиять на развитие растений, трансформировать труднодоступные фосфаты и повышать подвижность фосфора в почве на 25-30% [5, 6]. На основе этих бактерий был создан биопрепарат «Фосфобацирин» для улучшения фосфорного питания растений. Испытания биопрепарата на посевах сои в хозяйствах Алматинской области Казахстана 2015-2018 годах показали высокую перспективность его применения. Биопрепарат положительно влиял на развитие растений сои и повышал ее урожайность. Так, урожайность сои возросла на 15-20%, зеленая масса увеличивалась в 2,0 раза, длина стеблей - на 20-25%, а количество бобов на одно растение – на 25-30%. Также установлено, что фосфатмобилизующие бактерии, входящие в состав биопрепарата, стимулируют процесс образования клубеньков на корнях сои и их количество на корнях возрастало на 15-20% по сравнению с контролем.

Испытания «Фосфобацирина» на посевах яровой пшеницы сорта «Казахстан 10» и риса сорта «Анаит», проведенные в Кызылординской области

Казахстана в 2015-2018 годах, показали высокую перспективность его применения. Так, урожайность яровой пшеницы повысилась до 17,1 ц/га, в контроле этот показатель составлял 14 ц/га, урожайность риса сорта «Анаит» до 50 ц/га, в контрольном варианте – 44 ц/га (таблица 1, 2).

Таблица 1 – Биометрические показатели и урожайность яровой пшеницы сорта «Казахстан 10»

Варианты	Кустистость, шт.	Высота стебля, см	Площадь листьев, см ²	Колос		Урожайность, ц/га	Прибавка, ц/га
				Длина, см	Кол-во зерен, шт.		
Контроль	4,3	78,38	40,57	9,3	27,23	14,0	-
Фосфобацирин	5,3	92,25	81,58	10,47	31,38	17,1	3,1
Эталон	4,5	83,31	48,87	9,9	29,43	16,2	2,2

Таблица 2 – Биометрические показатели и урожайность риса сорта «Анаит»

Варианты	Кустистость, шт.	Высота стебля, см	Площадь листьев, см ²	Метелка		Урожайность, ц/га	Прибавка, ц/га
				Длина, см	Кол-во зерен, шт.		
Контроль	3,6	88,4	110,0	13,5	49,4	44,0	-
Фосфобацирин	5,3	110,8	61,3	17,6	94,0	50,0	6,0
Эталон	4,3	99,0	96,2	14,1	80,5	46,0	2,0

Таким образом, показано, что биопрепарат «Фосфобацирин» положительно влияет на развитие агрокультур, повышает их продуктивность и его можно рекомендовать для применения в хозяйствах. Кроме того, использование биопрепарата экологически безопасно и соответствует требованиям охраны окружающей среды, поскольку основано на естественном взаимодействии организмов в природе, не приводит к загрязнению почвы и нарушению биологического равновесия, так как фосфатмобилизующие бактерии являются полезными представителями микрофлоры почвы.

Литература

1. Минеев В.Г. Агрохимия. М.: МГУ, 2004. – 720 с.
2. Шафран С.А. Влияние типа почв и содержания в них подвижных фосфатов на эффективность фосфорных удобрений // Агрохимия. – 2015. – № 3. – С. 26–33.
3. Богдевич И. М. Фосфорные удобрения в сельском хозяйстве важны и незаменимы // Земляробства і ахова раслін. – 2004. – №2. – С. 24–25.
4. Алешенкова З.М. Микробные удобрения для стимуляции роста и развития растений // Наука и инновации. – 2015. – №150. – С. 66–67.
5. Выделение и отбор новых активных штаммов фосфатмобилизующих микроорганизмов из ризосферы культурных растений Юга и Юго-востока Казахстана / И.Э. Смирнова [и др.] // Микробиология және вирусология. – 2014. – №4. – С. 3–14.
6. Влияние фосфатмобилизующих бактерий на биологическую активность почв / И.Э. Смирнова [и др.] // Известия НАН РК. Сер. биол. и мед. – 2014. – №6. – С. 96–100.

Биотехнологический подход оптимизации процесса развития отдельных представителей микроценоза кишечника с использованием пчелиного подмора

**Тимошко М.А., Струтинский Ф.А., Богдан В.К., Велчу А.И.,
Мантоптин А., Строкова В.Н., Чокинэ М.**

*Институт Физиологии и Санокреатологии Министерства Культуры, Образования и Исследований Республики Молдова, Кишинэу, Молдова,
электронный адрес: timosco42maria@gmail.com*

Существующая информация показала, что микроценоз кишечника выполняет полифункциональную роль в жизнедеятельности организма. На примере широкого применения различных пищевых добавок доказано, что пищевой фактор является детерминирующим в процессе оптимизации количественного и качественного состава кишечной микрофлоры. По этому, количественные показатели её отдельных представителей рекомендованы к использованию для оценки состояния здоровья организма [1-6].

Сказанное обосновывает цель настоящих исследований, которая была выявить биотехнологический подход оптимизации процесса развития отдельных представителей микроценоза кишечника при использовании пчелиного подмора.

Поставленная цель была реализована в двух сериях опытов. Первую серию опытов проводили в условиях *«in vitro»*, испытывая осенний пчелиный подмор, который добавлялся к элективным полужидким питательным средам в следующих концентрациях: 0,032; 0,064; 0,096; 0,128; 0,160; 0,192; 0,224; 0,256; 0,288 и 0,320%. В дальнейшем на них осуществляли посев бактерий родов: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* и *Enterococcus*. Через 72 часа, после выдерживания их при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ определяли численность, представителей микроценоза пищеварительного тракта, указанных родов.

В результате осуществлён экспериментальный отбор оптимальных доз, подмора (в концентрациях: 0,128; 0,160 и 0,192%), которые в дальнейшем испытывались в опытах *«in vivo»*. на лабораторных животных (белых мышах), разделённых на 6 равноценных групп (вторая серия). Все подопытные животные получали одинаковый пищевой рацион, а в опытных группах (I, III V) был дополнительно введён подмор в указанных соответствующих дозах. Количественные показатели указанных микробных представителей выражены в десятичные логарифмы на 1 г содержимого прямой кишки и определены в начале и в конце опытного периода.

В результате подтверждена целесообразность применения всех трёх концентраций пчелиного подмора для направленного сохранения саногенного

состояния микроценоза кишечника, на примере указанных родов микроорганизмов, однако относительно бактерий рода *Escherichia* следует отметить, что лучшие результаты получены в пятой группе, т.е. где испытывался подмор в концентрации 0,192%.

Таким образом, доказано, что одним из биотехнологических подходов оптимизации процесса развития основных представителей микроценоза кишечника может быть рекомендован осенний пчелиный подмор в отобранных дозах, особенно в концентрации 0,192%.

Литература

1. Martinez R.C., Bedani R., Saad S.M.. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. In: Br J Nutr., 2015, 7, p. 1–23.
2. Strutinschi Tudor, Timoșco Maria. Acțiunea adaosurilor alimentare asupra macroorganismului și componenței florei microbiene intestinale. În: CEP USM. Studia Universitatis Moldaviae. S. Științe reale și ale naturii, 2014, nr.1, p. 52–56.
3. Timoșco Maria, Florea Natalia. Aprecierea rapidă a prezenței dereglărilor sănătății sistemului digestiv prin determinarea nivelului cantitativ al unor reprezentanți ai microflorei intestinale. În: Sănătate Publică și Management în Medicină, 2013, 3 (48), p. 233–234.
4. Тимошко М.А., Струтинский Ф.А, Богдан В.К., Федаш В.В. Микробиота кишечника и ее роль в поддержании оптимального уровня здоровья организма. В: ВЕЛЕС. Электронный сборник научных публикаций. Материалы международной конференции. Киев, 2016, с. 33–37.
5. Timoșco Maria, Velciu Aliona, Bogdan Victoria. Reprezentanți ai microbiocenozei intestinale și starea sănătății organismului. În: Buletin de perinatologie, 2014, nr.4, p.25–28.
6. Timoșco Maria, Velciu Aliona, Bogdan Victoria. Starea bacteriocenozei intestinale ca factor de semnalizare a dereglărilor în sănătate. În: Buletin de perinatologie, 2015, nr3, p.54–59.

Изменение активной кислотности молока при ферментации замороженными концентрированными заквасками на различных сроках хранения

Титова О.А., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н., Савельева Т.А.

*РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Беларусь,
электронный адрес: meat-dairy@tut.by*

В настоящее время производители ферментируемых молочных продуктов имеют возможность широкого выбора бактериальных средств как отечественного, так и зарубежного производства [1]. Гарантированное качество и надежность заквасок в течение срока годности являются факторами их конкурентоспособности [2]. Исследования и выявление закономерностей изменения активной кислотности сырья при ферментации сухими концентрированными заквасками на различных сроках хранения не теряют актуальности.

Объектами исследований являлись замороженные концентрированные закваски для изготовления творога вида ТВ-М, содержащие мезофильные микроорганизмы из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов (ТУ ВУ 10037914.552), изготовленные РУП «Институт мясо-молочной промышленности». Определение активной кислотности восстановленного обезжиренного пастеризованного молока проводили с помощью системы для контроля ферментации iCinac (АМС, France). Ферментирование молочного сырья осуществляли при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Проведены исследования процесса ферментации молочного сырья замороженными концентрированными заквасками, хранившимися в течение 7 месяцев. Полученные в ходе экспериментов графические зависимости представлены на рисунке.

На основании анализа экспериментальных данных установлено, что период адаптации микрофлоры заквасок, хранившихся в течение 7 месяцев при температуре минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$, в молочном сырье (изменение значения активной кислотности сырья на 0,1 ед. рН после внесения концентрированных заквасок) не изменяется и составляет $(4,1 \pm 0,1)$ ч. Для всех исследуемых образцов наблюдается интенсивное снижение активной кислотности молочного сырья при ферментации. Активная кислотность сквашенных образцов составляет $(4,9 \pm 0,1)$ ед. рН. После образования сгустка наблюдается медленное снижение активной кислотности до $(4,4 \pm 0,1)$ ед. рН.

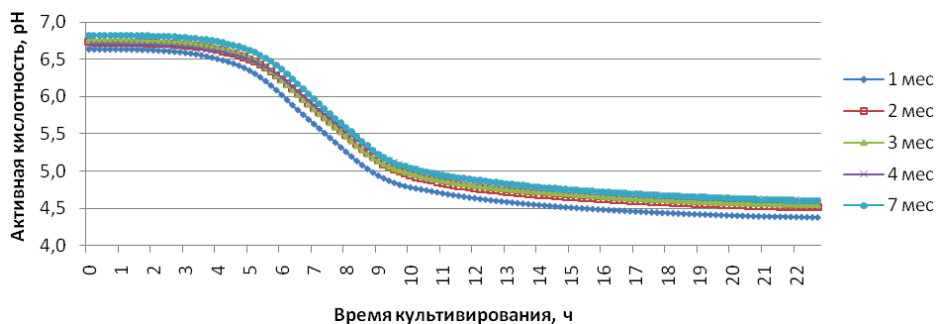


Рисунок – Изменение активной кислотности при ферментации молока замороженными концентрированными заквасками вида ТВ-М на различных сроках хранения

Таким образом, хранение замороженных концентрированных заквасок в течение 7 месяцев при температуре не выше минус $(40\pm 1)^\circ\text{C}$ не оказывает влияния на характер изменения активной кислотности при ферментации молока исследуемыми заквасками и не требует дополнительной корректировки технологической документации по их применению.

Литература

1. Фурик, Н.Н. Сухие и замороженные концентрированные закваски / Н.Н. Фурик, Н.К. Жабанос, С.Л. Василенко // Молочная промышленность. – 2016. – №3. – С. 54–56.
2. Производство сметаны [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17346> – Дата доступа: 02.10.2017.

Феромониторинг совки озимой — основа экономического и экологического совершенствования системы мероприятий защиты озимых зерновых культур

Трепашко Л.И., Бойко С.В.

*РУП «Институт защиты растений» аг. Прилуки, Республика Беларусь,
электронный адрес: entom@tut.by*

Потепление климата в Беларуси существенно повлияло на фитосанитарную ситуацию агроценозов, в том числе и в посевах зерновых культур. Изменения погодно-климатических условий, технологии возделывания озимых зерновых культур вызвало массовое развитие вредителей, повреждающие всходы растений. Высокая численность совки озимой (*Agrotis segetum* Schiff., Lepidoptera, Noctuidae) была зарегистрирована на юге Беларуси. Эти насекомые при массовом размножении способны вызывать большие потери урожая. Гусеницы совки озимой второго поколения наносят серьезный ущерб всходам озимого тритикале, пшеницы, ячменя и ржи. Наиболее сильно (до 67%) пострадали посеы в Брестской области и Гомельской областях. В очагах при численности гусениц 10-624 ос./м² было повреждено до 95% растений.

На основании полученных данных о высокой численности и вредоносности гусениц совки озимой в агроценозах озимых культур возникла необходимость эколого-биологического совершенствования системы мероприятий по их защите, основанной на прогнозе по результатам феромонного мониторинга фитофага. В 2016–2018 гг. проведены исследования по изучению сезонной динамики численности бабочек I и II поколения в агроценозах сельскохозяйственных культур на основании мониторинга половыми феромонами совки озимой, синтезированными в АО «Щёлково Агрохим».

Ловушки устанавливались с учетом биологии вредителя. В результате мониторинга начало лета бабочек совки озимой перезимовавшего поколения на всех исследуемых полях отмечали в III-й декаде мая – I-й декаде июня при температуре воздуха +17,5–20,3°C, относительной влажности воздуха 60–76%. В зависимости от фазы развития растений в среднем за сезон было отловлено 19,9–27,5 ос./ловушку — на кукурузе, 24,4–59,0 — на свекле сахарной, 17,5–67,0 — на картофеле, 4,2–47,0 ос./ловушку — на подсолнечнике. Лёт имаго I поколения продолжался до конца июня.

Нарастание активности лета озимой совки II поколения в Брестской области в 2016–2018 гг. отмечено во II-й декаде августа при температуре воздуха +17,2–20,6°C и относительной влажности воздуха 73–77%, количество

выпавших осадков составило 58,1–117,2 мм. На опытных полях сахарной свеклы отловлено бабочек в среднем 16,0–24,5 ос./ловушку; с падалицей рапса — 21,0–54,5, на стерне зерновых культур — 15,0–31,4 ос./ловушку. Понижение температур в сентябре и дожди резко снизили активность лета *A. segetum*.

На основании полученных данных по количеству отловленных бабочек составляется заблаговременно прогноз численности и вредоносности гусениц в посевах озимых культур. При установлении пороговой численности бабочек, гусеницы могут существенно повредить растения, тем самым вызвать экономически ощутимые потери урожая зерна. Используя прогнозируемые показатели можно экономически обоснованно рекомендовать защитные мероприятия.

Одним из приемов, дающих максимальный эффект при минимальном отрицательном влиянии на окружающую среду является предпосевная обработка семян против вредных насекомых на начальных стадиях развития растений. Принятие обоснованного решения о экономической целесообразности обработки семян озимых культур препаратами инсектицидного действия для защиты растений от гусениц возможно только по данным прогноза вредоносности, подготовленного по результатам феромономониторинга имаго совки.

Вторым приемом защиты озимых от фитофага является применение инсектицидов, когда отродившиеся гусеницы достигают I–II возраста, при пороговой численности — 2–3 ос/м², установленных при проведении почвенных раскопок в дневное время или наложения рамок в вечернее время. Защита всходов озимых зерновых культур от гусениц вредителя более эффективна при внесении инсектицидов в вечернее время. Обработка посевов препаратами в фазе всходов – начало кущения от гусениц V–VI возраста менее эффективна и более затратная. Требуется дополнительный мониторинг с использованием ручного труда (почвенные раскопки), техника для внесения инсектицидов и приобретение средств защиты. При протравливании семян существенно снижаются энергозатраты, повышается уровень экологической безопасности в сравнении с опрыскиванием посевов.

Выделение, идентификация и скрининг пробиотических бактерий, выделенных из слепой кишки *Gallus domesticus*

Тургимбаева А.М.¹, Кириллов С.О.¹, Абуталипов Д.Б.¹, Еримханқызы Г.², Мурат А.Ү.², Мусахметов А.С.¹, Хасенов Б.Б.¹, Абельденов С.К.¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан, электронный адрес: turgimbayeva@gmail.com

²АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина», Нур-Султан, Казахстан

Широкое использование антибиотиков в животноводстве приводит к изменению микрофлоры кишечника, что, в свою очередь, может вызывать появление патогенных антибиотикорезистентных бактерий. Это угрожает животноводству и здоровью человека [1]. Одним из решений данной проблемы является применение пробиотиков. FAO/WHO определяют пробиотики как «живые микроорганизмы, которые при приеме в достаточном количестве приносят пользу здоровью организма-хозяина». Пробиотики представляют собой живые микроорганизмы, которые улучшают и восстанавливают кишечную микрофлору животного или человека. Пробиотики применяются и в птицеводческой промышленности, так как они влияют на ростовые показатели цыплят [2] и на качество их мяса (рН, цвет, влагоудерживающая способность, профиль жирных кислот, окислительная стабильность) [3]. В бройлерном питании к пробиотическим видам относят таких представителей родов как *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* и *Saccharomyces* [4-6].

Целью работы являлось выделение и идентификация бактерий, выделенных из слепой кишки *Gallus domesticus* и определение их пробиотических свойств.

Был проведен сбор биоматериала из бройлеров местной птицефабрики и домашнего хозяйства (10 шт.) для выделения культур микроорганизмов с потенциальными пробиотическими свойствами. Биомассу выделяли из слепой кишки в стерильных условиях. Полученную биомассу культивировали на агаризованной МРС (Ман, Рогоза, Шарп) среде в анаэробных условиях. Выделенные культуры были идентифицированы с помощью методов морфологии колонии, масс-спектрометрии MALDI Biotyper и секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. Все методы подтвердили принадлежность полученных чистых культур к видам с потенциально пробиотическими свойствами: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus reuteri*.

Были проведены эксперименты по определению чувствительности выделенных бактерий к антибиотикам методом диффузии в агар [7] (тетрацилин, рифампицин, амоксициллин, стрептомицин, ампициллин, хлорамфеникол, эритромицин, канамицин, гентамицин). О чувствительности бактерий к антибиотикам свидетельствовало наличие зоны задержки роста в местах агаризованной питательной среды, где были расположены диски с антибиотиками. Были проведены исследования устойчивости пробиотических штаммов к действию солей желчных кислот и кислых значений pH. Установлено, что полученные штаммы молочнокислых бактерий обладают высокой выживаемостью в условиях аналогичных в желудочно-кишечном тракте птиц. Антагонистические свойства выделенных бактерий в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры птиц (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*) были определены методом среза агара [8].

По итогам работы были отобраны молочнокислые бактерии *L. salivarius*, *L. johnsonii* и *L. reuteri*, обладающие достаточной антагонистической активностью с пробиотическим потенциалом, представляющие интерес для применения в качестве пробиотиков в промышленном птицеводстве.

Литература

1. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data / I. Phillips [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2004. – Vol. 53, № 1. – P. 28–52.
2. Ignatova, M. Effect of dietary inclusion of probiotic on chicken performance and some blood indices / M. Ignatova, V. Sredkova, V. Marasheva // Biotechnol. Anim. Husb. – 2009. – Vol. 25. – P. 1079–1085.
3. Growth performance, meat yield, oxidative stability, and Fatty Acid composition of meat from broilers fed diets supplemented with a medicinal plant and probiotics / M.E. Hossain [et al.] // Asian-Australas. J. Anim. Sci. – 2012. – Vol. 25, № 8. – P. 1159–1168.
4. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities / K.C. Mountzouris [et al.] // Poult. Sci. – 2007. – Vol. 86, №2. – P. 309–317.
5. Gil de los Santos, J.R. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis* / J.R. Gil de los Santos, O.B. Storch, C. Gil-Turnes // Br. Poult. Sci. – 2005. – Vol. 46, №4. – P.494–497.
6. Khaksefidi, A. Effect of probiotic inclusion in the diet of broiler chickens on performance, feed efficiency and carcass quality / A. Khaksefidi, S. Rahimi // Asian-Australas J. Anim. Sci. – 2005. – Vol. 18, №8. – P. 1153–1156.
7. Brown, D.F. Comparison of antibiotic discs from different sources / D.F. Brown, D. Kothari // J. Clin. Pathol. – 1975. – Vol. 28, №10. – P. 779–783.
8. Strus, M. A new method for evaluation of the antagonistic action of bacterial lactic acid (LAB) on selected pathogenic indicator bacteria / M. Strus // Med. Dosw. Mikrobiol. – 1998. – Vol.50, №1-2. – P. 123–130.

Оптимизация параметров культивирования новых штаммов бактерий рода *Bacillus* – основы биофунгицидов для защиты растений

Хомяк А.И., Асатурова А.М., Сидорова Т.М.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия,
электронный адрес: biocontrol-vniibzr@yandex.ru

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений индустрии биотехнологии является производство биофунгицидов для защиты растений на основе биоагентов микробного происхождения [1]. Таким образом, целью исследования было подобрать оптимальные условия культивирования для штаммов бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* BZR 517, являющихся основой новых биопрепаратов для защиты растений [2, 3].

Подбор оптимальных условий культивирования штаммов проводили на жидкой питательной среде. Исследуемые потенциальные оптимальные температурные режимы: 20,0, 25,0, 30,0 и 35,0°C. Тестируемые уровни pH: 3,0, 6,0, 8,0 и 10,0. В ходе исследований сахароза, глюкоза, меласса и глицерин были протестированы как источники углеродного питания; пептон, NaNO₃, дрожжевой и кукурузный экстракты – как источники азотного питания. При установлении оптимального времени культивирования образцы брали через 8, 16, 24, 36, 48 и 72 ч. после начала культивирования. Метод Коха применялся для определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) [4]. Антагонистическая активность определялась методом двойных (встречных) культур на агаризованной питательной среде. Гриб *Fusarium graminearum* Schwabe был использован в качестве тест-культуры патогена [4]. Наличие метаболитов, способных оказывать фунгитоксичный эффект, осуществляли методом биоавтографии, тест-культура гриба – *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* App. et Wr. Анализ тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили на кизельгелевых пластинах, толщина слоя 2,5 мм. Система растворителей этилацетат-этанол-вода 40:15:15 и этанол-вода 4:1.

Для исследуемых культур установлен температурный оптимум: для штамма *B. subtilis* BZR 336g 25,0°C, для штамма *B. subtilis* BZR 517 – 30,0°C. Оптимальная кислотность среды для обоих штаммов определена в пределах 6,0 – 8,0. Меласса и кукурузный экстракт оказались наиболее предпочтительны для исследуемых штаммов как источник углерода и азота соответственно.

В ходе исследований был подобран состав оптимизированных питательных сред. Установлено, что количество КОЕ в ЖК исследуемых

штаммов, выращенных на оптимизированных питательных средах оказалось на два и три порядка выше, чем на картофельно-глюкозном агаре и среде Кинга В.

Изучение кинетики роста штаммов в процессе периодического культивирования показало, что оптимальные сроки культивирования для штамма *B. subtilis* 336g 48 ч., для штамма *B. subtilis* 517 36 ч. В этот период обнаружена максимальная антибиотическая активность в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* в сочетании с высоким содержанием в ЖК колониеобразующих единиц.

При исследовании антифунгальной активности биологически активных метаболитов обнаружено, что наибольшее подавление тест-гриба происходило в зоне с $Rf=0,86-0,88$. Анализируемые соединения, вероятно, содержат в своей структуре фенольные кольца (синее свечение при 366 нм), а также имеют циклическое строение (зеленое свечение в УФ366). Окрашивание хроматограмм специфическими детектирующими реагентами позволяет выявить наличие свободных аминогрупп и первичных аминов, фенолов, фенол-карбоновых кислот, ароматических аминов.

Полученные данные позволяют в дальнейшем разработать технологию производства новых биофунгицидов для защиты растений.

Литература

1. Ефремов Н.А. Индустрия органики: мировой опыт и российские перспективы / Н.А. Ефремов, М.П. Чердакова // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 5. – С. 405–409.
2. Патент на изобретение №2553518 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов» 20.05.2015.
3. Патент на изобретение №2552146 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 517 для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов» 29.04.2015.
4. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.

Консорциум микроорганизмов – основа комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур

Шмыга Е.Ю., Мандрик-Литвинкович М.Н., Купцов В.Н., Сидоренко А.В., Коломиец Э.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: kozich.katyusha@mail.ru*

Глобальными проблемами возделывания зерновых культур, приводящими к значительным потерям урожая и ухудшению качества зерна, являются истощение плодородия почв (снижение содержания гумуса, азота, фосфора, калия, других микро- и макроэлементов), загрязнение агрохимикатами, изменение структуры и снижение биологической активности почвенной микробиоты, накопление в почве специфических для злаков бактериальных и грибных патогенов.

Использование для улучшения фитосанитарной ситуации и повышения почвенного плодородия различных агротехнических приемов, минеральных удобрений и химических пестицидов часто не оказывает желаемого эффекта. Поэтому в последние годы все больший интерес привлекает применение биологических методов защиты от болезней и увеличения продуктивности зерновых культур.

На сегодняшний день востребованными являются комплексные микробные препараты, сочетающие свойства биоудобрений (улучшение фосфорного и азотного питания растений, обогащение почвы доступными источниками углерода, ростстимулирующее действие) и биопестицидов (защита от болезней бактериальной и грибной этиологии).

С целью разработки комплексного микробного препарата для зерновых культур выделены и охарактеризованы 4 штамма бактерий с взаимодополняющими агрономически ценными свойствами – *Bacillus amyloliquefaciens* 1 (антагонистическая и целлюлолитическая активности), *Bacillus mojavensis* 61 (антимикробное действие, продукция фитогормонов), *Bacillus megaterium* A-145 (фиксация атмосферного азота, продукция фитогормонов), *B. megaterium* 7 (солюбилизация фосфатов).

Показано, что раздельное культивирование бацилл с последующим их смешиванием в соотношении 1:1:1:1 позволяет получить консорциум с высоким титром вегетативных клеток и спор ($2-4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), стабильным в течение длительного хранения (6 месяцев при 4°C).

В модельных опытах установлено, что микробный консорциум, при использовании в виде 2-5% рабочего раствора, не оказывает фитотоксичного

действия на овес, а стимулирует всхожесть и развитие проростков данного злака. Так, вес проростков в опытных вариантах в среднем на 20,0% превышает данный показатель в контроле (обработка водой), а длина надземной части и корней овса увеличивается на 13,5–15,0% и 58–60,0% соответственно.

С использованием тест-культур фитопатогенных микроорганизмов выявлено, что созданный консорциум подавляет рост и развитие широкого спектра бактериальных и грибных возбудителей болезней зерновых культур: *Fusarium culmorum* БИМ F-459, БИМ F-600 Г (зона задержки роста 24–25 мм); *Fusarium graminearum* БИМ F-601 Г (22–23 мм); *Fusarium avenaceum* БИМ F-458 (23–25 мм); *Fusarium moniliforme* БИМ F-418 Г (23–24 мм); *Fusarium proliferatum* БИМ F-602 Г (20–21 мм); *Fusarium oxysporum* 381 (22–24 мм); *Athrinium* sp. 2.1 (24–26 мм); *Alternaria alternata* 6.3 (22–23 мм); *Pectobacterium carotovorum* 2.16, 25.1, 2.18 (15–18 мм); *Pseudomonas syringae* БИМ В–239, БИМ В–266, БИМ В–268, БИМ В–267 (18–23 мм), *Xanthomonas campestris* БИМ В–829, БИМ В–259 (15–16 мм), *Pantoea agglomerans* БИМ В–281, БИМ В–562 (17 мм). В условиях модельного инфицирования фитопатогенным грибом *F. oxysporum* 381 (10^4 спор/г почвы) показано, что предварительная обработка семян овса 10% рабочим раствором исследуемого консорциума снижает их поражаемость корневыми гнилями в среднем на 15%.

Установлено, что созданный микробный консорциум обладает азотфиксирующей активностью, солибилизирует ортофосфат кальция с образованием зон гидролиза диаметром 3,0–8,0 мм (через 3–6 сут).

Высокая антибактериальная и антифунгальная активность в отношении патогенов злаков, способность к фиксации молекулярного азота и фосфатмобилизации стабильно сохраняются в течение 6 месяцев хранения микробного консорциума при 4°C.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования консорциума штаммов *B. amyloliquefaciens* 1, *B. mojavensis* 61, *B. megaterium* А-145, *B. megaterium* 7 как основы комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур.

Влияние лиофилизации на жизнеспособность дрожжевых грибов *Cryptococcus flavescens* и *Rhodotorula species*, выращенных в средах различного состава

Щетко В.А., Гапонова И.И., Кулиш С.А., Сапунова Л.И., Романова Л.В., Ерхова Л.В., Макаревич О.В.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: microbio@mbio.bas-net.by*

Одной из основных задач биотехнологии является обеспечение стабильности генетических и физиологических свойств производственных штаммов микроорганизмов, что реализуется в результате подбора соответствующих методов длительного хранения [1]. Эффективным способом консервации, поддерживающим культуры микроорганизмов без изменения их жизнеспособности и практически значимых свойств на протяжении длительного периода времени, является лиофилизация [2]. Существенное влияние на процесс лиофильной сушки оказывают способ культивирования культур, состав и активная кислотность питательной среды, физиологическое состояние и количество микробных клеток, использование криопротекторов [3].

Цель исследования – оценка жизнеспособности лиофилизированных культур дрожжевых грибов *Cryptococcus flavescens* и *Rhodotorula species*, выращенных в средах на основе молока и молочной сыворотки.

В работе использовали дрожжи *Cryptococcus flavescens* 1-АЛ-3 и *Rhodotorula species* ФПСК-17 (далее *C. flavescens* и *Rhodotorula sp.*), депонированные в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Культуру дрожжей *C. flavescens* поддерживали при 25–27°C на пептонно-дрожжевом агаре, *Rhodotorula sp.* – на сусло-агаре (рН 7,2–7,4).

Глубинное культивирование дрожжевых грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 2 л в следующих условиях: коэффициент заполнения колб питательной средой – 0,5; скорость вращения качалки – 180–200 об/мин; температура культивирования – 25–27°C; длительность культивирования – 48 ч. Питательные среды содержали в качестве источников углеводного питания сухое обезжиренное молоко (8%), сухую молочную сыворотку (5%) или смесь молока и молочной сыворотки (4% + 2,5%). Исходная величина активной кислотности среды соответствовала рН 6,4–6,6. Посевной материал – 6 об. % суспензии культур *Rhodotorula sp.* и *C. flavescens* при их отдельном культивировании, соответственно 1 и 5 об. % – при их совместном выращивании.

Ллиофилизацию отдельных дрожжевых культур или их консорциума в составе культуральных сред проводили без криопротекторов с использованием

лиофильной сушилки Pshin FD5512 (Южная Корея) при соблюдении следующих условий: температура замораживания – -70°C; температура сушки – от -60 до +18°C; вакуум – 6 mTorr; длительность – 48 ч.

Количество жизнеспособных дрожжевых клеток до и после лиофилизации оценивали общепринятым методом и выражали числом колоний в десятичных логарифмах колониеобразующих единиц (КОЕ), содержащихся в 1 мл или 1 г продукта ($\log_{\text{КОЕ/мл}}$ или $\log_{\text{КОЕ/г}}$).

Приведенные результаты – среднее значение данных опытов, выполненных в трех повторностях.

Согласно полученным данным, углеводный состав питательных сред не оказывал существенного влияния на выход жизнеспособных клеток *C. flaveszens* и *Rhodotorula* sp. как при их раздельном, так и при совместном культивировании. Их титр в культуральной жидкости варьировался у *C. flaveszens* в пределах (8,3–8,6) $\log_{\text{КОЕ/мл}}$, у *Rhodotorula* sp. – в диапазоне (6,3–7,9) $\log_{\text{КОЕ/мл}}$.

Суммарный выход жизнеспособных клеток, полученный в результате лиофилизации обеих дрожжевых культур в составе их культуральных сред, снижался более чем на порядок по сравнению с их содержанием в культуральной жидкости. По-видимому, содержащиеся в культуральных жидкостях остаточный молочный белок и полисахариды *C. flaveszens* и *Rhodotorula* sp. не обеспечивают им необходимую защиту в процессе лиофильной сушки. Дальнейшие исследования будут направлены на подбор состава криозащитных сред, условий сушки и оценку жизнеспособности *C. flaveszens* и *Rhodotorula* sp. при длительном хранении в лиофильно высушенном состоянии.

Литература

1. Борисенко, О.А. Хранение промышленных рас дрожжей в коллекциях / О.А. Борисенко // Актуальные вопросы индустрии напитков. – Москва: ВНИИПБиВП, 2018. – 25 с.
2. Yeast preservation: alternatives for lyophilisation / L.K. Nyanga [at al.] // World J. Biotechnol. – 2012. – Vol. 28. – P. 3239–3244.
3. Куплетская, М.Б. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения / М.Б. Куплетская, А.И. Нетрусов // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 6. – С. 842–846.

Секция 4

Биотехнологии для медицины и промышленности

Production and antimicrobial properties of peptides derived from recombinant human lactoferrin-containing whey protein concentrate of transgenic goat origin

Hubchik K., Kastsianeovich A.

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: gubchikk@gmail.com*

Background

Keen interest of food and pharmaceutical companies is focused now on antimicrobial properties of peptides. Whey protein concentrate comprising recombinant human lactoferrin (LFWPC) derived from milk of transgenic goats may serve as a suitable substrate for production of antimicrobial peptides (AMP) [1-6].

To optimize peptide production simulation of proteolysis was conducted *in silico* for protein components of LFWPC. It demonstrated possibility of producing peptides with antimicrobial activity; It was found *in vitro* that LFWPC-derived peptide complex displayed higher bacteriostatic and fungistatic activities in comparison with native proteins constituting LFWPC [7]. AMP may be released *in vitro* by enzymatic hydrolysis of LFWPC [8].

Objectives

Production of peptide fraction showing antibacterial and antifungal activities from LFWPC substrate.

Methods

Spectrometry, SDS-PAGE, *in silico* proteolysis modeling, *in vitro* proteolysis, agar well diffusion method, HPLC, MALDI-TOF mass spectrometry.

Conclusion

Enzymatic hydrolysis engaging 2 serine proteases (trypsin and proteinase K) and asparagine protease (pepsin) was conducted *in silico* and *in vitro* [7].

Antimicrobial activity of LFWPC proteolysis products against fungal strain *Aspergillus niger* BIM F-18 (inhibition zone – 7 mm), bacterial strains *Escherichia coli* BIM B-378 (inhibition zone – 2 mm), *Streptomyces* sp. BIM B-342 (inhibition zone – 3 mm) was demonstrated. The established antibacterial activity may be determined both by the known peptide sequences deposited in recognized databases and by the newly deciphered sequences.

This problem requires further investigations. Nevertheless, the released AMP may find use as biopreservatives, enhancing safety and shelf life of stored foodstuffs. AMP also could be applied as bioactive additives to diet. It remains natural therefore that current research focus is centered on production of natural peptides distinguished by antimicrobial activity.

References

1. Nielsen, S.D. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen [et al.] // *Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 232. – P. 673–682.
2. Hernández-Ledesma, B. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits / B. Hernández-Ledesma [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2014. – Vol. 38. – P. 82–100.
3. Patil, P. Biofunctional properties of milk protein derived bioactive peptides – A review / P. Patil [et al.] // *Asian Journal of Dairy and Food*. – 2015. – Vol. 34, iss. 4. – P. 253–258.
4. Kondori, N. Fungicidal activity of human lactoferrin-derived peptides based on the antimicrobial $\alpha\beta$ region / N. Kondori [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agent*. – 2011. – Vol. 31, iss. 1. – P. 51–57.
5. Brouwer, C.P.J.M. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use / C.P.J.M. Brouwer [et al.] // *Peptides*. – 2011. – Vol. 32. – P. 1953–1963.
6. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnardal // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2014. – Vol. 25, № 5. – P. 503–514.
7. Hubchik, K.A. Characterization of peptide complex produced by trypsin hydrolysis of recombinant human lactoferrin / K.A. Hubchik [et al.] // *Microbial biotechnologies: basic and applied aspects: collect papers*. – Minsk: Belaruskaya Navuka, 2018. – Vol. 10. – P. 391–402.
8. Théolier, J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate / J. Théolier [et al.] // *Journal of Functional Foods*. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. 706–714.

Production and antimicrobial properties of peptides derived from recombinant human lactoferrin of transgenic goat origin

Kastsianeovich A., Hubchik K.

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: A.Kastsianeovich@gmail.com*

Background

Investigation of antimicrobial properties of peptides arouses vivid interest of food and pharmaceutical companies because microbial contamination may affect the expiry date of stored foodstuff and may cause diverse diseases. Chemical agents used as the preservatives enhance the safety and shelf life of alimentary products but regrettably could inflict irreparable damage on human health. It appears natural therefore that a vast number of studies is focused now on production of natural organic supplements with antimicrobial activity [1, 2].

Recombinant human lactoferrin (rhLF) and the derived peptides displaying antimicrobial action may be produced *in vitro* by enzymatic hydrolysis. The peptides could act on gram-negative, gram-positive bacteria, including drug-resistant strains and on fungi, viruses, protozoa [1, 3–5].

Objectives

Production of peptide fractions with antibacterial and antifungal activities from rhLF.

Methods

Centrifugation, spectrophotometry, SDS-PAGE, ion-exchange chromatography, agar well diffusion method, HPLC, MALDI-TOF mass spectrometry.

Conclusions

Enzymatic hydrolysis of rhLF using two serine proteases (trypsin, protease K) and pepsin was conducted.

It was found that the level of antimicrobial activity of peptides derived from rhLF depended on the specific peptide recovery method, namely the nature of applied enzyme (trypsin, protease K, pepsin) and proteolysis reaction conditions (pH, temperature, enzyme/substrate ratio, appropriate buffer).

Peptide complex resulting from rhLF proteolysis with trypsin displayed the maximum antibacterial activity against *Bacillus subtilis* BIM B–276 and *B. licheniformis* BIM B–175.

Strain *Aspergillus niger* BIM F–18 distinguished by the highest sensitivity to rhLF peptides demonstrated growth inhibition zone of 4.0 mm in diameter.

Further research will be aimed at identification of peptides possessing antimicrobial activity.

References

1. Nielsen, S.D. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization / S.D. Nielsen [et al.] // *Food Chemistry*. – 2017. – Vol. 232. – P. 673-682.
2. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnerdal // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2014. – Vol. 25, № 5. – P. 503–514.
3. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. W. Hancock // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 491-511.
4. Elbarbary, H. A. Novel antibacterial lactoferrin peptides generated by rennet digestion and autofocusing technique / H. A. Elbarbary [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2010. – Vol. 20. – P. 646–651.
5. Kondori, N. Fungicidal activity of human lactoferrin–derived peptides based on the antimicrobial $\alpha\beta$ region / N. Kondori [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agent*. – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 51–57.

Development of new approaches for waste-less simultaneous production of bioethanol and other valuable products from colza straw

Rozenfelde L.¹, Vedernikov N.², Puke M.², Kruma I.², Khroustalyova G.¹, Zala D.³, Rapoport A.¹

¹*Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, Riga, Latvia, email: linda.rozenfelde@lu.lv*

²*Laboratory of Polysaccharides, Latvian State Institute of Wood Chemistry, Riga, Latvia*

³*Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Latvia, Riga, Latvia*

Lignohemicellulose containing biomass is renewable and very promising resource for obtaining products with high demand and it is even more attractive if biomass comes from local agricultural waste. Our research is an interdisciplinary project devoted to the development of new waste-less process which will use renewable resources – agricultural waste of colza straw – to produce bioethanol as well as a number of other valuable compounds. This technology includes a method of obtaining furfural from hemicellulose without damaging the remaining cellulose part. Next step of this technology will be a special enzymatic treatment of lignocellulose which will lead to the formation of glucose. Further glucose containing hydrolysate will be used to produce ethanol by yeast fermentation. Yeast biomass will be used to produce biofilters for the protection and purification of the environment as well as checked as a source of heat shock proteins (Hsp70). The remaining lignin will be used for the improvement of growth of various medicinal mushrooms which contain a lot of valuable biologically active compounds as well as to produce laccase-containing enzymes complex which together with cellulases will be used at the stage of enzymatic hydrolysis of lignohemicellulose.

Acknowledgements

This work has been financed by European Regional Development Fund project Nr. 1.1.1.1/16/A/113.

Испытания стойкости финишных покрытий системы утепления фасадов «SaraGol» на основе минеральной ваты к воздействию плесневых грибов

**Арашкова А.А.¹, Тригубович А.М.¹, Кособуцкая О.Н.², Пирогов К.В.²,
Летунович Е.А.²**

¹*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: arashkova.mycology.by@gmail.com*

²*Иностранное унитарное предприятие «Диском», Минск, Беларусь,
электронный адрес: olga.kosobutskaya@saraGol.by*

Одним из методов значительного сокращения теплопотерь через ограждающие конструкции является утепление фасадов зданий при помощи наружной теплоизоляции [1]. Лакокрасочные материалы, применяемые для финишной отделки систем наружного утепления фасадов, в процессе эксплуатации подвергаются значительному влиянию климатических факторов и агрессивных метаболитов микроорганизмов [2].

Одним из традиционных способов защиты лакокрасочных композиций от биоповреждений является введение в их состав различных биоцидных добавок. Однако в связи с ужесточением экологических норм и требований к лакокрасочной продукции весьма актуальной становится разработка лакокрасочных материалов, не содержащих в своем составе фунгицидных препаратов, но обладающих достаточной устойчивостью к воздействию плесневых грибов [3]. Эффективность таких разработок позволяют оценить лабораторные испытания. Особую значимость имеют испытания, проведенные на образцах, моделирующих всю защитно-отделочную систему, включающую не только лакокрасочное покрытие, но и материал подложки [2, 4].

Целью данных исследований являлось изучение грибостойкости финишных покрытий системы утепления фасадов «SaraGol» на основе минеральной ваты в условиях модельного эксперимента.

Испытания стойкости 4-х видов финишных покрытий системы утепления фасадов «SaraGol» к воздействию плесневых грибов проводили на образцах, которые полностью моделировали фасадный пирог теплоизоляционной системы (минеральная вата, армирующий клеевой состав, армирующая сетка, минеральная штукатурка, финишное покрытие).

В качестве финишного покрытия использовали акриловую краску (рН 8,5), силикатные краски (рН 11,5 и 12,0) и силикатную штукатурку (рН 11,5).

Для заражения поверхности финишных покрытий спорами плесневых грибов использовали набор видов, характерных для биоповреждений лакокрасочных материалов (ГОСТ 9.050-75): *Aspergillus niger*, *Aspergillus*

terreus, *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochro-chloron*, *Penicillium martensii*, *Trichoderma viride*.

Наряду с обязательными видами плесневых грибов, использовали дополнительные тест-культуры родов *Cladosporium* и *Ulocladium*, выделенные из лакокрасочных покрытий в ходе микологических обследований пораженных теплоизоляционных систем на фасадах зданий.

Испытание грибостойкости финишных покрытий по интенсивности развития плесневых грибов в условиях, имитирующих минеральное и органическое загрязнение (метод 3 ГОСТ 9.049-91), показало, что спустя 28 суток после заражения плесневое поражение полностью отсутствовало только на силикатной краске с рН 12,0. Продление испытаний показало, что грибостойкость всех покрытий постепенно снижалась, но даже на 84 суток не превышала 3-х баллов по шкале ГОСТ 9.048-89, что позволило считать материалы выдержавшими испытания.

Дополнительные испытания по заражению финишных покрытий спорами плесневых грибов родов *Ulocladium* и *Cladosporium*, не входящих в набор видов по ГОСТ, показали, что акриловая краска больше всего была подвержена колонизации данными грибами, а силикатная краска с рН 12,0 обладала наибольшей устойчивостью к данным грибам.

При заражении финишных покрытий мицелием плесневых грибов все покрытия проявили устойчивость к колонизации *A. niger*, *P. funiculosum* и *Ulocladium* sp. Наиболее выраженным фунгицидным действием в отношении данных грибов обладала силикатная краска с рН 12,0.

В целом, более выраженная грибостойкость испытанных силикатных покрытий, чем акрилового покрытия, с учетом отсутствия в рецептуре биоцидного компонента, может быть обусловлена высокой щелочностью силикатных материалов, сдерживающей рост плесневых грибов.

Литература

1. Красулина, Л. В. Системы утепления фасадов и требования по их испытаниям / Л. В. Красулина // Актуальные проблемы инновационной подготовки инженерных кадров при переходе строительной отрасли на европейские стандарты : материалы Научн.-метод. Конф., Минск, 26–27 мая 2015 г. : Бел. нац. технич. ун-т ; редкол.: В. Ф. Зверев, С. М. Коледа. – Минск, 2015. – С. 261–267.
2. Биоповреждения систем лакокрасочных покрытий, вызываемые микроскопическими грибами / Н. А. Аникина [и др.] // Экология и промышленность России. – 2016. – Т. 20, № 6. – С. 26–29.
3. Кузнецова, Е. М. Экологическая безопасность лакокрасочных материалов / Е. М. Кузнецова // Евростройпрофи. – 2016. – № 82. – С. 44–48.
4. Биоповреждения и защита лакокрасочных материалов / Е. Л. Пехташева [и др.] // Вестник КТУ. – 2012. – Т. 15, № 10. – С. 149–152.

Эффективность полиенового антибиотика розеофунгина в отношении возбудителей кандидозного вульвовагинита

**Балгимбаева А.С., Ибрагимова Л.Н., Треножникова Л.П.,
Турлыбаева З.Ж., Султанова А.Ж., Тугелбай Г.Е., Галимбаева Р.Ш.,
Есіркепулы М.**

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан,
электронный адрес: imv_rk@list.ru*

В настоящее время вагинальный кандидоз относится к числу наиболее распространенных заболеваний женщин и составляет от 40% до 50% в структуре вагинальных инфекций. В последние десятилетия отмечается тенденция к повышению распространенности резистентности у грибов рода *Candida* к антифунгальным препаратам, что создает серьезные трудности в лечении кандидоза и требует постоянной корректировки схем эмпирической химиотерапии. В связи с этим, поиск новых антифунгальных лекарственных субстанций и разработка на их основе эффективных препаратов для лечения кандидозного вульвовагинита, доступных широким слоям населения, является настоятельной необходимостью.

В ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» открыт и изучен новый противогрибковый полиеновый антибиотик розеофунгин, обладающий высокой активностью в отношении патогенных грибов – возбудителей микозов человека.

Целью работы было изучение активности антибиотика розеофунгина в отношении клинических штаммов грибов рода *Candida* с целью разработки нового противогрибкового препарата для лечения кандидозного вульвовагинита.

Отбор клинических штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida* проводили от пациенток в возрасте от 18 до 56 лет, находящихся на амбулаторном лечении, с клиническими признаками кандидозной инфекции вульвы и влагалища. Исследование выполняли на базе микробиологической лаборатории Областного кожно-венерологического диспансера МЗ РК и бактериологической лаборатории Центральной Клинической Больницы МЗ РК. Идентификацию дрожжеподобных грибов проводили на основе изучения морфологических признаков клеток и с использованием автоматического бактериологического анализатора “MINI API” фирмы “BIO MERIEUX”. Антифунгальную активность антибиотика розеофунгина изучали методом диффузии в агар.

Всего протестировано 56 клинических изолятов грибов рода *Candida*, на их основе создана коллекция возбудителей кандидозного вульвовагинита, полученных от больных Алматинской области. В коллекцию включены клинические штаммы *C. albicans* (60%) а также штаммы *Candida non-albicans* (40%), из которых штаммы *C. krusei* составляли 13,3%, *C. tropicalis* – 13,3%, *C. glabrata* – 6,7%, *C. parapsilosis* – 6,7%. Антифунгальная активность розеофунгина определена в отношении 15 клинических штаммов грибов рода *Candida*: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК, мкг/мл) для изученных штаммов возбудителей вагинального кандидоза изменялась в пределах 1,66-2,5 мкг/мл. Наиболее высокой активностью антибиотик розеофунгин обладал в отношении клинических штаммов вида *Candida albicans* – 1,66-2,0 мкг/мл. Активность в отношении штаммов *Candida non-albicans* была ниже: МПК для *Candida tropicalis* составила 2,0 мкг/мл, для *Candida krusei*, *Candida glabrata* и *Candida parapsilosis* – 2,5 мкг/мл.

Наличие высокой активности у антибиотика розеофунгина в отношении возбудителей кандидоза свидетельствует о возможности разработки на его основе новых лекарственных препаратов для лечения кандидозного вульвагинита, способных улучшить состояние больных в Казахстане и за его пределами.

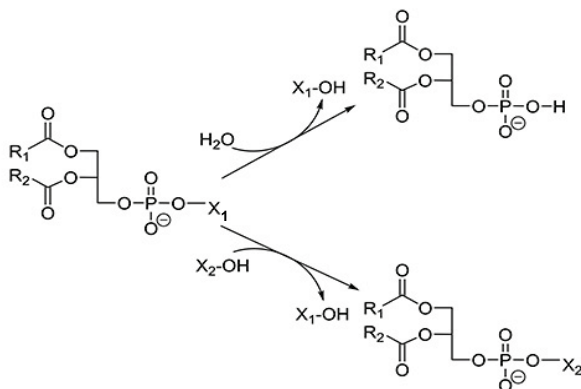
Использование бактериальной фосфолипазы D для синтеза липонуклеотидов

Биричевская Л.Л.¹, Винтер М.А.¹, Сивец Г.Г.², Михайлопуло И.А.²,
Зинченко А.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Фосфолипаза D (ФЛД; EC 3.1.4.4) – фермент, который катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи фосфолипидов, образуя фосфатидную кислоту и спиртовой остаток. В дополнение к гидролитической активности, ФЛД также катализирует взаимное преобразование полярных групп фосфолипидов по процессу, называемому трансфосфатидилированием [1] (рисунок).



R₁ и R₂ – алкилы жирнокислотных остатков, X₁ и X₂ – полярные группы.

Рисунок – Реакции, катализируемые ФЛД

Трансфосфатидилирование особенно привлекательно для синтеза малодоступных природных фосфолипидов (таких как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин или фосфатидилглицерин) из легкодоступного фосфатидилхолина. Синтезированные фосфолипиды можно использовать в качестве эмульгаторов, косметических средств, медикаментов и липосомальных препаратов [2, 3].

Целью данной работы являлось изучение возможности получения фосфатидильных производных некоторых фармакологически важных модифицированных нуклеозидов при помощи реакции трансфосфатидилирования, катализируемой ФЛД *Streptomyces netropsis*.

Использованные в работе нуклеозиды были синтезированы нами ранее. Соевый фосфатидилхолин (Lipoid S100) был поставлен фирмой «Lipoid GmbH»

(Германия). Сухой ферментный препарат ФЛД *S. netropsis* БИМ В-235 получали, как описано в работе [2].

Синтезы фосфатидильных производных нуклеозидов осуществляли в реакционной смеси объемом 2 мл, включающей 0,66 мл водно-буферной фазы и 1,34 мл хлороформной фазы, и содержащей 0,2 М натрий-ацетатный буфер (рН 6,0), 0,1 М CaCl₂, 0,3 мг биокатализатора (сухого ферментного препарата ФЛД), а также 10 мкмоль нуклеозида и 30 мкмоль фосфатидилхолина.

Все реакции осуществляли при температуре 37°C, их ход контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия), выход фосфатидилнуклеозидов и активность ФЛД определяли, как указано в [2].

Как следует из таблицы 1, все изученные нуклеозиды фосфатидилируются ФЛД с выходами 44–95 мол.% за 2–5 ч проведения процесса.

Таблица – Эффективность синтеза липонуклеотидов

Исходный нуклеозид	Активность ФЛД, нмоль/мин·мг	Максимальный выход фосфатидилнуклеозида, %	Время реакции, ч
2-фтораденинарабинозид (флударабин)	67	44	5
2-хлор-2'-дезоксаденозин (лейкладин)	952	>95	2–3
2-хлор-2'-фтораденинарабинозид (клофарабин)	1267	>95	1
6-метоксигуанинарабинозид (неларабин)	567	82	4
6-тио-2'-дезоксигуанозин	617	70	4
Кинетинрибозид	920	>95	2
1,2,4-триазол-3-карбоксамидрибозид	–	55	3

Таким образом, показана возможность синтеза фосфолипидных производных фармакологически значимых нуклеозидов с высокими выходами в ходе одностадийной ферментативной реакции, катализируемой ФЛД. Фосфолипидные производные неларабина, кинетинрибозид, 6-тио-2'-дезоксигуанозина, по-видимому, получены впервые.

Литература

1. Yang, S. Transphosphatidylation by phospholipase D / S. Yang, S. Freer, A. Benson // J. Biol. Chem. – 1967. – Vol. 242. – P. 477–484.
2. A comparison of enzymatic phosphorylation and phosphatidylation of β -L- and β -D-nucleosides / L.L. Birichevskaya [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2007. – Vol. 29, N 4. – P. 585–591.
3. Hama, S. Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids: recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes / S. Hama, C. Ogino, A. Kondo // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99, N 19. – P. 7879–7891.

Получение 5'-фосфатидил-2-хлор-2'-фтораденинарабинозида с использованием бактериальной фосфолипазы D

Биричевская Л.Л.¹, Сивец Г.Г.², Артемьева Ю.Н.², Михайлопуло И.А.²,
Зинченко А.И.¹

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Препараты на основе модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов играют значительную роль в химиотерапии онкологических заболеваний. Одним из современных высокоэффективных противоопухолевых препаратов нуклеозидной природы является клофарабин (2-хлор-2'-фтораденинарабинозид). Однако, подобно другим соединениям, применяемым для терапии онкозаболеваний, клофарабин обладает нежелательными свойствами – относительно невысоким терапевтическим индексом и выраженными токсическими эффектами, ограничивающими его клиническое применение. Одним из подходов в решении этой проблемы является разработка нового поколения лекарственных препаратов («prodrugs») на основе конъюгатов антивирусных и противоопухолевых нуклеозидов с фосфолипидами. Такие конъюгаты характеризуются большей биодоступностью, устойчивостью в русле крови, улучшенными фармакокинетическими параметрами и меньшей токсичностью [1]. Показано, что некоторые диалкилглицерофосфатные производные клофарабина проявляют меньшую токсичность в сравнении с исходным препаратом, в то же время сохраняя высокую противоопухолевую активность. Внутривенное или пероральное введение диацил-глицерофосфатов клофарабина приводит к пролонгированному выделению нуклеозида в сыворотку крови животных [2].

Существующие методы химического конъюгирования фосфолипидов с нуклеозидами сложны и характеризуются невысокими выходами целевых продуктов. Ранее нами была показана возможность использования более простого и эффективного биотехнологического метода, предложенного японскими учеными [3], для синтеза фосфолипидных производных ряда нуклеозидов [4, 5].

Целью работы явилось получение фосфатидильного производного клофарабина при помощи реакции трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипазой D (ФЛД) *Streptomyces netropsis*.

Исходный нуклеозид был синтезирован по методике [6]. Источником фосфатидилхолина служил высокоочищенный соевый лецитин Lipoid S100

(«Lipoid GmbH», Германия). Сухой ферментный препарат ФЛД *S. netropsis* БИМ В-235 получали, как описано нами ранее [5].

Аналитический синтез фосфолипидного производного клофарабина осуществляли при 37°C в реакционной смеси (1 мл), включающей 0,33 мл буферной фазы и 0,67 мл хлороформной фазы, и содержащей 0,2 М натрий-ацетатный буфер (рН 6,0), 0,1 М CaCl₂, 0,15 мг биокатализатора (сухого ферментного препарата ФЛД), а также 5 мкмоль нуклеозида и 15 мкмоль фосфатидилхолина.

Ход реакции контролировали при помощи ТСХ на пластинах Silica gel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия) как указано в [5]. Выход фосфатидил-клофарабина за 1 ч в указанных условиях реакции составил более 95 мол.% (в пересчете на введенный нуклеозид). Трансфосфатидилирующая активность ФЛД в ферментном препарате составила 1,26 мкмоль/мин·мг.

Препаративный синтез проводили в двухфазной реакционной смеси объемом 10 мл, состоящей из 4 мл 0,2 М натрий-ацетатного буфера (рН 6,0) и 6 мл хлороформа. Реакционная смесь содержала 30 мг нуклеозида, 100 мг фосфатидилхолина, 0,1 М CaCl₂ и 1,2 мг сухого ферментного препарата ФЛД. Выход реакции (по данным ТСХ) составил 86 мол.%.

По окончании реакции хлороформный слой отделяли и упаривали. Очистку фосфатидил-клофарабина осуществляли на колонке с силикагелем L60 («Merck», Германия), элюируя фосфолипиды изократически системой растворителей хлороформ/метанол/вода (75:25:5 по объему). Хроматографические пики обнаруживали с помощью УФ-детектора (контроль поглощения при длине волны 206 нм и 264 нм). Фракции, содержащие хроматографически чистое целевое соединение, объединяли и упаривали. Получено 65 мг фосфатидил-клофарабина (выход около 70 мол.% в пересчете на введенный в реакцию нуклеозид).

Структура продукта доказана методами спектрометрии и ЯМР.

Таким образом, нами впервые показана возможность ферментативного получения фосфолипидного производного 2-хлор-2'-фтораденинарабинозида с высоким выходом при помощи микробной ФЛД.

Литература

1. Alexander, R.L. Nucleoside conjugates for the treatment of cancer / R.L. Alexander, G.L. Kucera // Carr. Pharm. Design. – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 1079–1089.
2. Фармакокинетические свойства фосфолипидного конъюгата клофарабина / И.А. Цибульская [и др.] // Химия, структура и функция биомолекул: материалы Междунар. конф., Минск, 4-6 июня 2014 г. – С. 42–43.
3. A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction / S. Shuto [et al.] // Tetrahedron Lett. – 1987. – Vol. 28, N 2. – P. 199–202.

4. Substrate requirements of phospholipase D from *Streptomyces netropsis* in the transphosphatidylation synthesis of phospholipids / L.L. Birichevskaya [et al.] // Chem. Nat. Comps. – 2006. – Vol. 42, N 1. – P. 32–35.
5. A comparison of enzymatic phosphorylation and phosphatidylation of β -L- and β -D-nucleosides / L.L. Birichevskaya [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2007. – Vol. 29, N 4. – P. 585–591.
6. The chemoenzymatic synthesis of clofarabine and related 2'-deoxyfluoroarabinosyl nucleosides: the electronic and stereochemical factors determining substrate recognition by *E. coli* nucleoside phosphorylases / Fateev [et al.] // Beilstein J. Org. Chem. – 2014. – Vol. 10. – P. 1657–1669.

Биотехнологический аспект зависимости уровня стрептококков в кишечнике от состояния здоровья организма

Богдан В.К., Тимошко М.А., Велчу А.И.

Институт Физиологии и Санокреатологии Министерства Культуры, Образования и Исследований Республики Молдова, Кишинэу,
электронный адрес: victoriabogdan@gmail.com

Существующая информация подтверждает, что стрептококки являются составной частью кишечной микрофлоры человека и животных. В частности у обезьян, собак, кошек, норок, мышей, крыс, хомяков и морских свинок их количество достигало уровня в: $7,3 \pm 1,4$; $9,9 \pm 0,4$; $8,5 \pm 0,4$; $9,2 \pm 0,3$; $5,6 \pm 0,9$; $8,2 \pm 0,6$; $5,1 \pm 1,5$ и $6,9 \pm 1,8$; у свиней, кроликов, лошадей и кур в $7,9 \pm 1,0$; $3,6 \pm 0,6$; $8,5 \pm 0,8$ и $7,1 \pm 0,4$ и у поросят, ягнят, телят и цыплят, они в $7,34 \pm 0,1$; $6,7 \pm 0,5$; $5,4 \pm 0,2$ и $6,5 \pm 0,5$ лог/г соответственно [1].

Показано, что пищеварительный тракт детей заселён стрептококками с первых часов после рождения, достигая уровня, характерного для взрослого человека, к 14-дневному возрасту. В частности, при естественном вскармливании энтерококки обнаруживались в пределах 10^6 - 10^7 , а искусственном – в 10^8 - 10^9 КОЕ / 1 г. [2, 3].

Учитывая вышеизложенное, целью настоящих исследований было выявить биотехнологический аспект зависимости уровня стрептококков в кишечнике от состояния здоровья организма

В результате установлено, что у здоровых детей до года численность стрептококков в кишечнике была в пределах $5,23 \pm 0,14$ – $6,53 \pm 0,09$ лог/г, а у больных, кишечными расстройствами, она несколько превышала эти данные, будучи от $5,65 \pm 0,11$ до $7,17$ лог/г (рисунок). Вместе с тем обнаружено различие в качественном составе энтерококков, подтверждённое экспериментальными данными. Если в кишечнике здоровых детей доминировал вид *Enterococcus faecium*, то у больных, другой вид – *E. faecalis*, который общепризнанный как возбудитель нозокомиальной инфекции.

Таким образом, установлено, что зависимость уровня стрептококков в кишечнике от состояния здоровья организма может являться биотехнологическим аспектом в разработке биотехнологий новых фармацевтических препаратов, защищающих организм от стрептококковых возбудителей инфекционных заболеваний, широко распространенных среди детей и взрослых. Это позволит ускорить и улучшить процесс разработки новых методов, способов, подходов и практических рекомендаций по целенаправленному использованию сапрофитных видов стрептококков, как для регулирования состава микроценоза кишечника, так и для поддержания его на

оптимальном уровне с учётом возрастных особенностей организма. Следовательно, стрептококкам кишечника принадлежит большое будущее, потому что выполняют важную роль в поддержании здоровья организма.

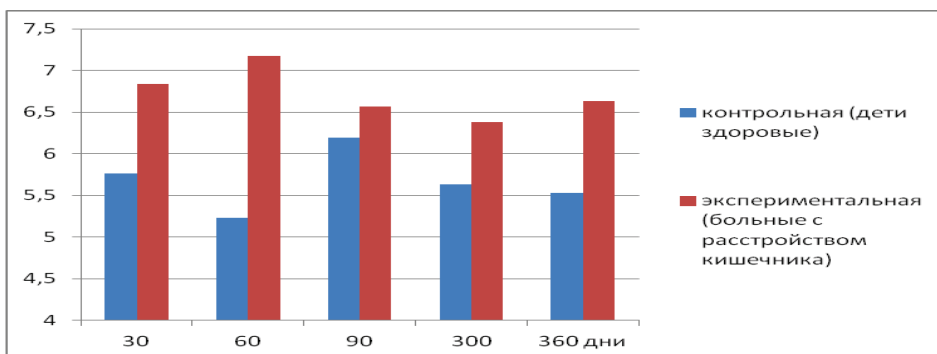


Рисунок – Численность стрептококков в кишечнике детей до 1 года с различным статусом здоровья организма в десятичных логарифмах.

Литература

1. Timoșco Maria. Stresul și flora microbiană intestinală. Chișinău, 2005, 172 p.
2. Леванова Е.А., Бондаренко В.М., Воробьев А.А. и др Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни. В ЖМЭИ, 2001, № 4, с. 47–50.
3. Velciu Aliona Dinamica constituirii bacteriocenozei tractului gastrointestinal la copii în perioada postnatală timpurie și menținerea ei la nivel sanogen. Автореф. дисс. д. б. н., 2010, 29 с.

Создание генетической конструкции для получения штамма-продуцента пуриннуклеозидфосфоорилазы, слитой с аннексином-А5

Булатовский А.Б., Казловский И.С., Зинченко А.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by

Одной из наиболее привлекательных стратегий для борьбы с онкологическими заболеваниями является использование собственного иммунитета пациента. Однако, сложность заключается в том, что опухоли создают вокруг себя особое «экологическое микроокружение», которое служит барьером, защищающим ее от противоопухолевого клеточного иммунитета [1]. При этом, одним из главных факторов, ответственных за формирование иммуносупрессирующей экологической ниши опухоли, является накапливающийся в опухоли внеклеточный аденозин [2].

Ранее [3] нами была предложена идея устранения аденозина в ложе опухоли под действием аденозин-деградирующего фермента, доставленного в опухоль с помощью аннексина-А5. Этот белок обладает уникальной способностью специфически связываться с фосфатидилсеринем, который появляется на поверхности клеток при их злокачественном перерождении [4, 5]. В качестве фермента, разрушающего аденозин может выступать бактериальная пуриннуклеозидфосфоорилаза (ПНФаза), трансформирующая этот нуклеозид в присутствии фосфата в смесь аденина с рибозо-1-фосфатом. В этой связи, целью настоящего исследования явилось создание генетической конструкции, содержащей ген человеческого аннексина-А5, слитого с геном ПНФазы *E. coli*. Это исследование представляет собой необходимый этап экспериментального получения бактериального штамма, продуцирующего соответствующий химерный белок.

На начальном этапе работы по данным литературных источников и баз данных GenBank и GenID (США) были получены нуклеотидные последовательности для генов аннексина-А5 (*anxA5*), состоящего из 957 п.о., и гена ПНФазы (*deoD*), состоящего из 732 п.о. Используя эти нуклеотидные последовательности, были подобраны четыре олигонуклеотидных праймера и сконструирован вектор, обозначенный нами рЕТ42а-РNP-АпхА5.

Для предотвращения стерических препятствий между аннексином-А5 и ПНФазой к обратному праймеру к гену *deoD* и прямому праймеру к гену *anxA5* был добавлен участок (размером 18 п.о.), кодирующий олигопептид, состоящий из поочередно повторяющихся аминокислотных остатков глицина и серина.

На втором этапе работы, методом ПЦР изолировали из геномной ДНК *E. coli* BL21(DE3) ген ПНФазы, а из коммерческой плазмиды рЕТ12-PAP1 ген аннексина-A5. После амплификации этих генов провели выделение их из реакционных смесей и подвергли электрофоретическому разделению в 1%-ном агарозном геле.

На третьем этапе работы, осуществили линеаризацию плазмиды рЕТ42a(+) методом ПЦР и подвергли электрофоретическому разделению.

На заключительном этапе оба очищенных гена и линеаризованная плаزمида рЕТ42a(+), используемая в качестве матрицы, были собраны в одну генетическую конструкцию (обозначенную как рЕТ42a-PNP-AnxA5) методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) (рисунок).

Полученная плазмида может быть применена для препаративного получения ПНФазы *E. coli*, слитой с человеческим аннексином-A5.

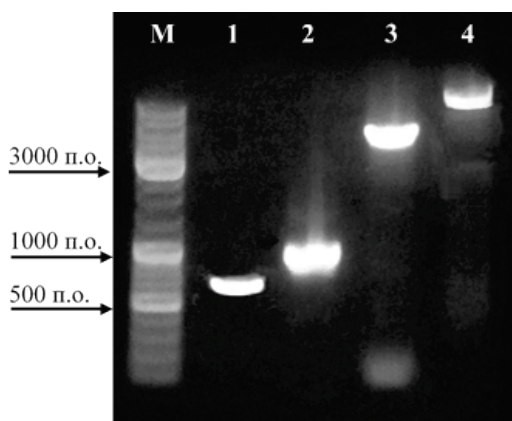


Рисунок – Электрофореграмма гена *deoD* (1), гена *anxA5* (2), линеаризованной плазмиды рЕТ42a(+) (3) и генетической конструкции рЕТ42a-PNP-AnxA5 (4)

Литература

1. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // Cell. – 2011. – Vol. 144. – P. 646–674.
2. Therapeutic potency of pharmacological adenosine receptors agonist/antagonist on cancer cell apoptosis in tumor microenvironment, current status, and perspectives / A. Soleimani [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2018. P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.27249>
3. Зинченко, А.И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А.И. Зинченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 118–128.
4. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes / T. Utsugi [et al.] // Cancer Res. – 1991. – Vol. 51. – P. 3062–3066.

Ферментация как перспективный способ технологической обработки коровьего молозива

Головач Т.Н.¹, Асафов В.А.², Харитонов В.Д.², Танькова Н.Л.²,
Романович Р.В.¹, Курченко В.П.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: halavachtn@gmail.com

²ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия

Первичное молоко, или молозиво, обладает высокой питательной и биологической ценностью, что определяет перспективность его использования в составе специализированных продуктов питания. Актуальным представляется исследование функциональных свойств первичного молока, разработка способов применения молозива и его компонентов в качестве биологически активных добавок, а также для обогащения пищевых продуктов [1]. Коровье молоко и ферментированные молочные продукты являются доступными источниками биологически активных пептидов, которые образуются в результате воздействия на белки молока пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта, при технологической обработке очищенными протеазами, а также ферментации молочнокислыми бактериями (МКБ) [2]. Антиоксидантная активность (АОА) молочных продуктов, главным образом, обусловлена наличием казеина и сывороточных белков. АОА белков и пептидов связана с восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов [3]. В данной работе также рассмотрены некоторые аспекты снижения микробиологического уровня ферментированного молозива.

Целью работы – исследование микробиологических показателей коровьего молозива после ферментации ацидофильной палочкой (*Lactobacillus acidophilus*); изучение влияния ферментации на АОА первичного молока.

Для оценки микробиологических показателей и уровня АОА применяли молозиво сухое цельное, молозиво сухое обезжиренное, молозиво сухое обезжиренное ферментированное (лиофильная сушка; ФГБНУ «ВНИМИ», г. Москва, Россия). Ферментацию молозива осуществляли с применением штамма пробиотических бактерий *Lb. acidophilus* (штамм 630, невязкий).

Результаты экспериментальной работы по определению микробиологических показателей первичного молока отражены в таб. 1. При микропировании препаратов сухого молозива, ферментированного ацидофильной палочкой, отмечена положительная динамика накопления целевых МКБ. Кроме того, установлено снижение титра кишечной палочки.

Представлены результаты исследований АОА образцов молозива. В качестве стандарта использовали тролокс – водорастворимый аналог витамина Е. Определена величина IC₅₀, или концентрация тролокса, при которой скорость восстановления катион-радикала АВТS⁺⁺ снижается в 2 раза, что составляет 16,2 мкмоль. Величину IC₅₀ стандарта использовали для расчета ТЕАС (показатель АОА, выраженный в мкмоль тролокса/ мг белка).

Таблица 1 – Микробиологические показатели образцов сухого молозива

Наименование образца	КМАФАнМ, КОЕ, см ³	БГКП (колиформы), см ³	Дрожжи/плесени, КОЕ, см ³	<i>S. aureus</i> , см ³	Патогенная микрофлора, в т.ч. <i>Salmonella</i> , 25 см ³
Молозиво нативное	4×10 ⁴	0,01	100/30	Не обн.	Не обн.
Молозиво обезжиренное	3×10 ⁴	0,01	10/60	Не обн.	Не обн.
Молозиво ферментированное	1×10 ⁸	0,1	20/40	Не обн.	Не обн.

В таб. 2 представлены показатели IC₅₀ и ТЕАС, рассчитанные для образцов молозива. Снижение АОА обезжиренного молозива, очевидно, связано с удалением липидной фракции, содержащей жирорастворимые витамины А, Е и К и гидрофобный низкомолекулярный белковый компонент. Установлено достоверное увеличение АОА ферментированного молозива в 1,5–1,6 раза по сравнению с нативным и обезжиренным молозивом.

Таблица 2 – Характеристика антиоксидантных свойств образцов молозива

Наименование образца	IC ₅₀ , мкг (сухого вещества)/мл	ТЕАС, мкмоль тролокса/мг сухого вещества
Молозиво цельное	94,4±0,7	0,171±0,001
Молозиво обезжиренное	104,0±1,8	0,156±0,003
Молозиво ферментированное	64,3±6,0	0,252±0,024

Показана практическая возможность корректировки коровьего молозива по микробиологическим показателям путем ферментации ацидофильной палочкой. Установлено возрастание АОА ферментированного молозива по сравнению с цельным и обезжиренным образцами, что связано с расщеплением белков первичного молока бактериальной протеолитической системой.

Литература

1. Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum / P. Sacerdote [et al.] // J. Dairy Sci. – 2013. – Vol. 96, № 3. – P. 1745–1754.
2. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review / D.P. Mohanty [et al.] // Saudi J. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 23, № 5. – P. 577–583.
3. Natural antioxidants in milk and dairy products / C. Grazyna [et al.] // Int. J. Dairy Tech. – 2017. – Vol. 70, № 2. – P. 165–178.

Перспективы использования рекомбинантных ферментов микроорганизмов и модифицированных компонентов нуклеиновых кислот для терапии рака

Зинченко А.И.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: zinch@mbio.bas-net.by*

В настоящее время для терапии солидных злокачественных новообразований применяются, главным образом, облучение, хирургия и химиотерапия – раздельно или в комбинациях. Радиация и хирургия имеют ограниченные возможности, так как они не могут излечивать метастазы, которые иногда возникают уже на ранних стадиях заболевания.

Основной проблемой, тормозящей развитие химиотерапии рака, является неспособность таких препаратов эффективно отличать «больные» клетки от здоровых. Этим обусловлены тяжелые побочные эффекты химиотерапии, которые часто сводят на нет пользу от такого лечения. Другими словами, традиционная химиотерапия достигла своего плато – эффекты при наиболее распространенных опухолях – паллиативные, которые не излечивают пациента, а лишь отодвигают летальный исход. Кроме того, все перечисленные выше методы лечения понижают иммунитет организма в отношении инфекционных заболеваний и онкологических рецидивов в будущем [1, 2].

Главный современный успех в изучении рака – обнаружение молекулярных мишеней, общих для всех типах раковых клеток, включая метастазы. Это дало толчок к развитию одного из наиболее перспективных направлений лекарственного лечения онкологических заболеваний – таргетной терапии. Таргетная терапия предполагает использование препаратов, мишенью которых служат молекулы, синтезирующиеся только опухолевыми клетками. Примером таких универсальных маркеров-мишеней для таргетной терапии рака являются теломераза – фермент, обеспечивающий бессмертие раковых клеток, и фосфатидилсерин – фосфолипид, обрамляющий большинство злокачественных, но не нормальных клеток [3, 4].

Не вдаваясь в подробности, нам представляется целесообразным для достижения синергетического эффекта атаковать рак по трем направлениям:

- нарушить механизм образования в раковых клетках теломер (например, с помощью химиотерапии 6-тиодезоксигуанозином) [5, 6];
- осуществить киллинг раковых клеток, используя ферментный пролекарственный подход на основе применения бактериальной пуридиннуклеозидфосфорилазы и препарата Флударабел [7];

- взломать аденозиновую защиту опухоли от хозяйской иммунной системы при помощи аденозиндезаминазы, таргетирующей поверхностно-клеточный фосфатидилсерин [1, 8].

Есть основания полагать, что такой интегральный подход к терапии рака позволит поднять ее на принципиально новый уровень эффективности и безопасности и добиться решающего успеха в борьбе с этим заболеванием.

Литература

1. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из человеческого аннексина и бактериальной аденозиндезаминазы / А.Б. Булатовский [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 89–95.
2. Зинченко, А.И. К вопросу о создании персонализированной терапевтической противораковой вакцины / А.И. Зинченко, А.С. Щеголова, Л.Л. Биричевская // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 374–381.
3. In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy / S. Riedl [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1808, N 11-15. – P. 2638–2645.
4. Sharma, B. Phosphatidylserine: a cancer cell targeting biomarker / B. Sharma, S.S. Kanwar // Semin. Cancer Biol. – 2018. – Vol. 52 (Pt 1). – P. 17–25.
5. Атака на теломеры, или подход к терапии рака с помощью 6-тио-2'-дезоксигуанозина / А.И. Береснев [и др.] // Наука и инновации. – 2016. – № 9. – С. 58–61.
6. Синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина с использованием бактериальных нуклеозидфосфорилаз / А.И. Береснев [и др.] // Сб. науч. трудов Института микробиологии НАН Беларуси «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Т. 8. – Минск, «Беларуская навука», 2016. – С. 28–36.
7. Синтез флударабин-5'-монофосфата с использованием бактериальных рекомбинантных ферментов / А.И. Береснев [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 7–15.
8. Зинченко, А.И. Аденозин как потенциальная мишень для биотерапии рака / А.И. Зинченко // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2016. – № 4. – С. 118–128.

Влияние микроудобрений на антирадикальную активность экстрактов ксилотрофных базидиомицетов

Коваленко С.А.¹, Бордок И.В.¹, Ковзунова О.В.²

¹Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь,
электронный адрес: snejana.kovalenko@mail.ru

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Высшие базидиальные грибы обладают не только большой питательной ценностью, но также являются перспективными продуцентами биологически активных и хозяйственно ценных метаболитов. Интенсивные исследования свойств плодовых тел и мицелия базидиомицетов позволили обнаружить у них иммуномодулирующие, адаптогенные, противоопухолевые, гипополидемические, гепатопротекторные, противовирусные, антиоксидантные и другие свойства. В частности, антиоксидантные свойства экстрактов макромицетов связывают с наличием в составе плодовых тел фенольных соединений, обладающих антирадикальной активностью (АРА). Основными метаболитами, отвечающими за фармакологическое действие грибов, являются полисахариды и их комплексы с белками. Выраженность биологического эффекта зависит от видовой принадлежности продуцента, используемого штамма, условий его культивирования.

Цель работы – изучить влияние микроудобрений «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» (Наноплант-4) и «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe, Zn, Cr, Mo, Se» (Наноплант-8) на урожайность и антирадикальную активность спиртовых экстрактов макромицетов. Объектами исследования являлись штаммы из коллекции ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»: FIB 185 *Lentinula edodes*, FIB 335 *Ganoderma lucidum*, FIB 287 *Hericiium erinaceus*, FIB 174 *Auricularia polytricha*.

Плодовые тела выращивались по технологиям, разработанным в Институте леса НАН Беларуси на твердых питательных субстратах. Микроудобрения вносили в субстраты до стерилизации из расчета 0,35 мл на 1 л дистиллированной воды. Применяемые марки микроудобрения Наноплант увеличивают активность глутатионпероксидазы, способствующего профилактике и лечению сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1]. Продуктивность (урожайность) грибов рассчитывали как отношение сырой массы грибов к сырой массе субстрата. Биологическую эффективность определяли по отношению сырой массы грибов к сухой массе субстрата. Коэффициент конверсии рассчитывали отношением сухой массы грибов к сухой массе субстрата. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета анализа Microsoft Excel. Высушивание плодовых тел

грибов до постоянной массы проводили при комнатной температуре в затемненном помещении.

Для определения антиоксидантной активности к экстрактам макромицетов, полученных экстрагированием в 70% этиловом спирте, добавляли раствор АБТС⁺⁺(2,2'-азино-бис(3-этил-бензтиазолин-6-сульфоукислота)) и измеряли поглощение смеси при 734 нм во времени (через каждые 10 секунд в течение 6 минут) при температуре 25°C и постоянном помешивании раствора (на спектрофотометре Agilent 8453). Для оценки АРА использовали значение оптической плотности после 1 и 5 минут от начала эксперимента. Активность макромицетов оценивали по протеканию реакции связывания радикала АБТС⁺⁺ с антиоксидантами [2]. Активность экстрактов реакции с АБТС⁺⁺ определялась относительно тролокса как стандарта.

Установлен положительный эффект от внесения микроудобрений. В наибольшей степени результат стимуляции плодоношения выражен у *A. polytricha* и *H. erinaceus*. При внесении в субстрат микроудобрений Наноплант-4 и Наноплант-8 урожайность *H. erinaceus* в опытных группах превысила данный показатель в контроле на 38,5 и 77,1%, биологическая эффективность – на 20,1 и 32,8%, коэффициент конверсии – на 22,8 и 10,8% соответственно. Продуктивность *A. polytricha* в опытных группах превысила контрольные показатели на 43,4 и 14,5%, биологическая эффективность – на 44,7 и 10,15%, коэффициент конверсии – на 33,1 и 6,8%. Внесение препаратов Наноплант-4 и Наноплант-8 в субстрат позволило улучшить контрольные показатели *L. edodes* по продуктивности на 32,7 и 35,8%, биологической эффективности – на 29,6 и 33,8%, коэффициенту конверсии – на 24,9 и 44,9%. Урожайность *G. lucidum* в опытных группах превысила контрольные показатели на 19,9 и 21,6%, биологическая эффективность – на 20,1 и 32,8%, коэффициент конверсии – на 22,8 и 10,8%. Наибольшей антирадикальной активностью в реакции с АБТС⁺⁺ обладает этанольный экстракт *G. lucidum* (таблица).

Таблица – АРА базидиомицетов в моль тролокса/мл экстракта

Группа	<i>L. edodes</i>		<i>G. lucidum</i>		<i>H. erinaceus</i>		<i>A. polytricha</i>	
	1 мин	5 мин	1 мин	5 мин	1 мин	5 мин	1 мин	5 мин
Контроль	0,192	0,247	0,402	0,429	0,365	0,426	0,273	0,316
Наноплант-4	0,375	0,442	0,492	0,508	0,409	0,464	0,408	0,420
Наноплант-8	0,394	0,439	0,513	0,530	0,423	0,492	0,414	0,449

Следовательно, спиртовые экстракты высших базидиальных грибов проявляют антирадикальные свойства. Наибольшая антирадикальная

активность в реакции с катион-радикалом АБТС⁺ наблюдается в группах с использованием микроудобрения «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe, Zn, Cr, Mo, Se».

Литература

1. Азизбеян, С.Г. Наноплант – новое отечественное микроудобрение / С.Г. Азизбеян, В.И. Домаш // Наше сельское хозяйство. – 2015. – № 7. – С. 68–71.
2. Tang, Y.-Z. Free-radical-scavenging effect of carbazole derivatives on DPPH and ABTS radicals / Y.-Z. Tang, Z.-Q. Liu // J. of the American Oil Chemists' Society. – 2007. – Vol. 84, № 12. – P. 1095–1100.

Изменение поверхностного слоя полиамидных волокон бактериями-деструкторами

Комаровская Я.В., Козячая Т.И., Тарасюк О.А., Юхневич Г.Г., Бурдь В.Н.

Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, факультет биологии и экологии, Гродно, Беларусь, электронный адрес: yaninawkom@gmail.com

Полиамидные волокна – потенциальный источник энергии и питания микроорганизмов, однако, их использование возможно только при их непосредственном взаимодействии. Способность микроорганизмов повреждать химические волокна обусловлена как особенностями свойств микроорганизмов, так и в значительной степени структурой и свойствами самих волокон [3-2]. Протеканию процессов деструкции волокон во многом способствуют дефекты в виде трещин, сколов, вмятин, которые возникают в процессе получения и отделки волокон.

Модификации подвергались: полиамидные волокна tex 93, выпускаемые филиалом «Завод Химволокно» ОАО «Гродно Азот». В качестве деструкторов использовались предварительно отобранные штаммы бактерий: один штамм из нитрификаторов (N1) и два штамма из денитрификаторов (DN2, DN3) очистных сооружений ОАО «Гродно Азот»; а также один штамм из аэротенков очистных сооружений канализации г. Гродно (A2). В качестве среды для роста биомодификаторов использовалась обедненная синтетическая среда с поливиниловым спиртом и синтетическая среда Эванса [6].

После культивирования бактерий в течение 4 мес в данных средах, было изучено изменение поверхности полиамидных волокон. Топографические изменения поверхности волокон фиксировали при помощи оптического микроскопа «MICRO 200T-01» и программы обработки изображений «NanoImages», а также атомно-силового микроскопа NT-206 производства ОАО «Микротестмашины» и программного обеспечения «SurfaceView» и «Gwyddion». Исследования проводились в 9-кратной повторности.

Определено, что в процессе биodeградации всеми исследуемыми штаммами бактерий возрастает диаметр полиамидного волокна (до 2 раз), а также меняется топография его поверхности: возрастает среднее значение высоты поверхности, увеличиваются шероховатость и общая площадь (рисунок).

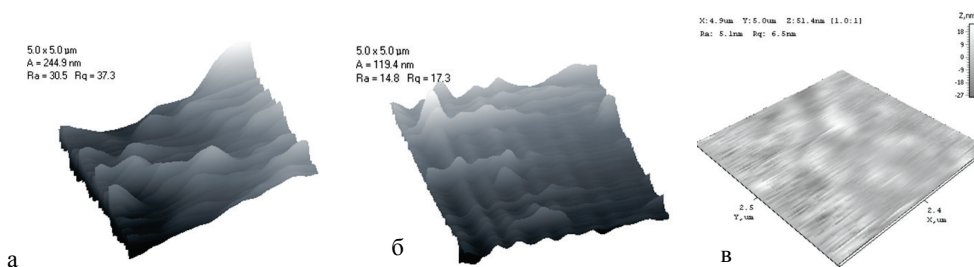


Рисунок – 3D изображение поверхности полиамидного волокна после 4-х месячного культивирования бактерий:
а – *NI*; б – *A2*; в – необработанное волокно

Поверхность полиамидного волокна разрушается равномерно, образуя высокоразвитую структуру с увеличением площади в 2-3 раза, что может быть использовано для направленного изменения физико-механических свойств полимеров.

Литература

1. Пехташева, Е.Л. Биостойкость натуральных и синтетических текстильных волокон / Е.Л. Пехташева, А.Н. Неверов // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 7. – С. 292–305.
2. Пехташева, Е.Л. Биоповреждения лубяных, искусственных и синтетических волокон / Е.Л. Пехташева [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 8. – С. 185–190.
3. Пхакадзе, Г. А. Биодеструктурируемые полимеры / Г. А. Пхакадзе // Киев: Наукова Думка. – 1990. – 54 с.
4. Allsopp, D. Introduction to biodeterioration (2nd Ed.) / D. Allsopp, K. J. Seal, C. C. Gaylarde // Cambridge: University Press, 2004. - 10 p.
5. Huang, S.J. Synthesis and Degradation of Polymers Susceptible to Hydrolysis by Proteolytic Enzymes / S.J. Huang, J.P. Bell, J.R. Knox // Proceeding of Third International Biodegradation Symposium (Kingston, USA). - London, 1975. - P. 731-741.
6. Комаровская, Я.В. Количественная оценка степени биодegradации полиамидных волокон / Я.В. Комаровская, Г.Г. Юхневич, В.Н. Бурдь // Веснік ГрДУ імя Янкі Купалы. Сер. Сер 6, Тэхніка.- 2019. - Т.9. - № 1.- С.50-57.

Сравнительный анализ тест-систем для выделения нуклеиновых кислот из мокроты

Костюк С.А.¹, Полюян О.С.¹, Руденкова Т.В.¹, Глинкина Т.В.¹, Смирский В.В.²

¹ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь, электронный адрес: s.kostiuk@mail.ru

²УП «Хозрасчетное опытное производство института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Введение. Методические подходы к выделению нуклеиновых кислот зависят от вида биологического материала, при этом при выборе метода пробоподготовки следует учитывать качественный и количественный клеточный состав биологической жидкости, спектр возможных ингибиторов и т.д. Неадекватный выбор метода пробоподготовки приводит к получению продукта с низкой концентрацией нуклеиновых кислот, снижению качества выделенной ДНК/РНК, что, в свою очередь, может приводить к появлению ложноотрицательных результатов ПЦР-исследований. Мокрота относится к биологическому материалу с высоким содержанием ингибиторов, таких как муколитические агенты, компоненты крови, полисахариды. Находящиеся в составе муцинов мокроты полисахариды обуславливают вязкую консистенцию мокроты и являются основными ингибиторами ПЦР-реакции.

Цель исследования – провести качественный (степень чистоты выделенной ДНК) и количественный (концентрация выделенной ДНК) сравнительный анализ тест-систем, зарегистрированных в Республике Беларусь и используемых в клинико-диагностических лабораториях, для выделения ДНК из мокроты.

Материалы и методы. В качестве биологического материала для исследования использовали 38 образцов мокроты пациентов с верифицированным диагнозом «пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*». Для снижения вязкости мокроты каждый образец смешивали с муколизином в соотношении 1:5 и инкубировали в течение 30 минут. Образцы центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин, полученный клеточный осадок использовали для выделения ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием 3-х коммерческих тест-систем: «Проба-НК» («ДНК-технология», РФ), «Экстракция 100» («Вектор-Бест», РФ) и «ДНК-сорб-В» («Интерлабсервис», РФ). Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, ThermoScientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280). В качестве референсного метода использовался метод фенол-хлороформной экстракции с использованием

TRIzol-реагента («Invitrogen», США). Количественные данные представлены в виде медианы и квартилей Me (Q25/Q75) и медианы и размаха Me (min/max). Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна-Уитни. Критическим уровнем значимости принят $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение A260/280 составляет $\geq 1,8$. Использование критерия Манна-Уитни позволило выявить достоверные различия между использованными тест-системами и референсным методом ($p < 0,05$), тогда как использование данного критерия при анализе тест-систем между собой таких различий не выявило ($p > 0,05$) (таб. 1). Аналогичные данные получены и при оценке концентраций выделенной ДНК из образцов мокроты.

Таблица 1 – Значения A260/280 (Me (min/max)) и концентраций (Me (Q25/Q75)) выделенной ДНК, полученные при использовании различных наборов реагентов

Наименование тест-системы	A260/280	Концентрация ДНК, мкг/мл
«Проба-НК»	1,72 (1,68/1,75)	610,16 (588,91/680,65)
«Экстракция 100»	1,76 (1,71/1,80)	696,81 (639,74/720,46)
«ДНК-сорб-В»	1,77 (1,70/1,81)	597,37 (564,15/685,66)
Фенол-хлороформная экстракция	1,89 (1,85/1,94)	805,77 (750,74/891,68)

На следующем этапе были проведены исследования по выявлению ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в образцах мокроты, прошедших пробоподготовку с использованием различных тест-систем (таб. 2).

Таблица 2 – Выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в мокроте

Наименование тест-системы	Кол-во образцов (n)	Частота выявления, %
«Проба-НК»	26	68,42 \pm 7,11
«Экстракция 100»	28	73,68 \pm 7,28
«ДНК-сорб-В»	23	60,53 \pm 6,83
Фенол-хлороформная экстракция	31	81,58 \pm 7,50

Установлено, что количество ложноотрицательных результатов выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в мокроте пациентов с верифицированным диагнозом варьирует в зависимости от выбранного метода пробоподготовки.

Заключение. Применение классических способов экстракции ДНК из мокроты с использованием коммерческих тест-систем, зарегистрированных в Республике, не лишено недостатков, способных привести к получению ложноотрицательных результатов ПЦР за счет недостаточного удаления ингибиторов, в частности полисахаридов. Для повышения эффективности выделения ДНК из мокроты необходимо усовершенствовать процедуру пробоподготовки данного биологического материала для очистки образца от примесей полисахаридов.

Преимущества использования препарата бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* для улучшения технологических показателей белорусских глин в производственных условиях

Маркевич Р.М., Якимович Л.В.

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: marami@tut.by*

Глинистое сырье белорусских месторождений обладает рядом существенных недостатков, ограничивающих его применение. В этой связи в производстве керамических изделий на 65–80% используют импортные сырьевые материалы. Среди существующих методов повышения качественных характеристик глин особое место занимает биотехнологическая обработка, поскольку в отличие от традиционных (реагентных) методов обработки глины, при которых диспергация частиц и повышение пластичности неизбежно приводят к увеличению чувствительности глин к сушке, бактериальная обработка, повышая пластичность, может снижать чувствительность глин к сушке. Данный факт свидетельствует о разнонаправленном действии продуктов микробного синтеза, из которых наибольшая роль отводится органическим кислотам и экзополисахаридам.

Цель работы заключалась в установлении в промышленных условиях (ОАО «Белхудожкерамика») преимуществ применения препарата бактерий *B. amyloliquefaciens* Г для улучшения технологических показателей глинистого сырья, используемого для получения керамических изделий методом литья и на гончарном круге.

Основное сырье предприятия – глина белорусского месторождения «Гайдуковка», которая классифицируется как дисперсная, умереннопластичная и среднечувствительная к сушке. Для изготовления качественных керамических изделий методом литья важное значение имеют текучесть формовочного шликера и усадка сырых изделий при сушке, определяющая механическую прочность готовых изделий. Обеспечение высоких термомеханических характеристик готовых керамических изделий и улучшение процесса работы с глиной на гончарном круге возможны в случае высокой дисперсности и пластичности исходного глинистого сырья.

Для достижения требуемых технологических показателей в условиях производства проводили биообработку формовочного шликера и гончарной массы [1]. Применяли препараты бактерий *B. amyloliquefaciens* Г, описание которых представлено в [2, 3], для сравнения результатов использовали препарат бактерий *B. mucilaginosus* 4. Следует отметить, что в условиях выдержки образцов шликера наблюдали увеличение количества бактериальных

клеток. Наряду с бактериями *B. amyloliquefaciens* Г в образцах отмечен рост других бактериальных колоний. По истечении времени выдержки (72 ч) концентрация клеток составила $(1,2) \times 10^7$ КОЕ на 1 г, при значительном преобладании внесенных бактерий. В варианте бактерий *B. mucilaginosus* 4 этот показатель имел меньшее значение [3], что, возможно, обусловлено предпочтительным развитием аборигенных микроорганизмов перед селекционными.

Применение препарата бактерий *B. amyloliquefaciens* Г на ОАО «Белхудожкерамика» позволило установить ряд преимуществ этих бактерий перед препаратом *B. mucilaginosus* 4.

Во-первых, технологические свойства шликера (текучесть, коэффициент загустеваемости) изменяются так, что становится возможным его повторное использование после набора первого черепка. При этом установлен факт снижения водопоглощения и повышения плотности и однородности изделий в варианте повторного использования шликера. Отмечено существенное уменьшение количества наколов, что значительно снижает процент брака.

Во-вторых, отмечено снижение воздушной линейной усадки после обжига образцов, отлитых из биообработанного шликера, по сравнению с производственными, а также уменьшение водопоглощения изделий на 15–18% за счет изменения микроструктуры, что является показателем увеличения их механической прочности.

В третьих, впервые показано положительное воздействие вылеживания глин, обработанных препаратом бактерий *B. amyloliquefaciens* Г на пластичные свойства гончарных масс. Вылеживание глины с добавлением бактериального препарата ведет к понижению водопоглощения образца на 13% и к увеличению пластичности керамической массы на 36%. Данный образец характеризуется наименьшей пористостью и наибольшей плотностью и однородностью. Кроме того, увеличение пластичности способствовало облегчению работы мастера с глиной на гончарном круге.

И, наконец, показано, что достижение требуемых технологических показателей возможно при снижении в 2 раза количества препарата бактерий *B. amyloliquefaciens* Г для обработки формовочного шликера по сравнению с препаратом бактерий *B. mucilaginosus* 4.

Литература

1. Якимович, Л.В. Изготовление опытных изделий из биообработанных керамических масс в производственных условиях ОАО «Белхудожкерамика» / Л.В.Якимович, Р.М. Маркевич, Л.В. Свистунова // Труды БГТУ. – 2015. – Т. 177, № 4. – С. 229–233.
2. Маркевич, Р.М. Препарат бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* для изменения технологических показателей глины / Р.М. Маркевич, Л.В. Якимович // Биотехнология. – 2018. – Т.34, № 4. – С. 67–77.
3. Биотехнологическая обработка глин / Л.В. Куис [и др.] // Наука и инновации. – 2009. – Т. 80, № 10. – С. 38–41.

Оценка микробиологических показателей хлеба на основе продукта ферментированного горохового безглютенового

**Нелюбина Е.В.¹, Урбанчик Е.Н.¹, Сапунова Л.И.², Каминская О.С.¹,
Тамкович И.О.², Шляхотко Е.А.²**

¹*Могилевский государственный университет продовольствия, Могилев, Беларусь,
электронный адрес: urbanchik@tut.by*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: enzyte@mbio.bas-net.by*

Роль хлеба как основной части рациона (до 50% у отдельных народов) обусловлена содержанием в нем нутриентов (углеводов, протеинов, липидов, витаминов, других биологически активных веществ), практически полностью обеспечивающих физиологические потребности человека [1]. На рынке Беларуси представлены многочисленные сорта хлеба, среди которых лишь малую долю составляет продукция специализированного питания, в том числе безглютеновая. В то же время рынок так называемых «free from»-продуктов – один из самых быстро растущих в Европе: ожидается, что к 2020 г. совокупный среднегодовой темп его роста составит 5% [2, 3].

Хлеб и применяемые для его выпечки ингредиенты из-за малого содержания в них активной воды рассматриваются как безопасные с точки зрения микробиологии продукты. Нарушение режимов хранения приводит к пролиферации содержащихся в них бактерий и плесневых грибов, что существенно снижает качество хлебобулочных изделий и создает угрозу возникновения пищевых инфекций [4].

Ранее нами разработана рецептура хлеба (РЦ ВУ 700036606.266-2018, ТИ ВУ 700036606.161-2018) – продукта специализированного питания, относящегося к группе безглютеновых изделий (менее 10 мг глютена в 1 кг). В качестве основного мучного сырья в хлебе используется продукт ферментированный гороховый безглютеновый (ТУ ВУ 700036606.12-2018), полученный из пророщенного зерна гороха согласно разработанной нами оригинальной технологии (ТР ВУ 700036606.001-2017).

Цель настоящей работы – определение микробиологических показателей опытных образцов хлеба, изготовленного на основе продукта ферментированного горохового безглютенового.

Исследование микробиологических показателей хлеба и продукта ферментированного горохового безглютенового, используемого для его выпечки, проводили общепринятыми методами.

Полученные результаты показали, что в составе хлебобулочного изделия, а также использованного для его производства продукта ферментированного

горохового безглютенового, не обнаружены споровые бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*, бактерии группы кишечной палочки (колиформы), сальмонеллы, а также плесневые и дрожжевые грибы. Общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, выявленных в продукте ферментированном гороховом безглютеновом, составило $0,6 \times 10^2$ КОЕ/г и не превысило норм общей микробной обсемененности, регламентированных ТР ТС 021/2011 [5].

Таким образом, продукт ферментированный гороховый безглютеновый и изготовленный из него хлеб отвечают требованиям микробиологической безопасности. Разработка новых рецептур и организация импортозамещающего производства безглютенового хлеба позволит расширить ассортимент отечественной продукции специализированного назначения высокого потребительского качества для больных целиакией.

Литература

1. Microbiology of wheat and flour milling in Australia / L. K. Berghofer [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 85. – P. 137–149.
2. Ngemakwe, P.H. Advances in gluten-free bread technology / P.H. Ngemakwe, R.-H.M. Le, V.A. Jideani // Food Sci Technol Int. – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 256-76.
<https://doi.10.1177/1082013214531425>.
3. Горобечи, М. Пять ключевых тенденций, определяющих рынок хлебобулочных изделий в Беларуси в ближайшие пять лет / М. Горобечи // Продукт.БҮ. – 2016. – №10 (174).
<https://produkt.by/story/pyat-klyuchevyh-tendenciyopredelyayushchih-rynok-hlebobulochnyh-izdeliy-v-belarusi-v>.
4. Determination of microbiological quality of packed and unpacked bread / A. Khanom, T. Shammi, S. Kabir // Stamford J. Microbiol. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 24–29.
5. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. – Введ. 01.07.2013 – Евраз. Эконом. Комис. – Минск: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2015. – 150 с.

Искусственное выращивание лекарственного гриба *Lentus edodes* на разных средах

Пушкарская О.В., Жебрак И.С.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь,
электронный адрес: corupe@mail.ru

Шиитакэ (*Lentus edodes*) – экзотический для Беларуси гриб. В естественных условиях этот гриб растет в Японии, Корее, Китае и некоторых странах Юго-Восточной Азии, где издавна применяется в народной медицине, которая называет его «эликсир жизни». Гриб обладает противоопухолевым, антивирусным действием, снижает уровень холестерина, стабилизирует кровяное давление. Из шиитакэ получено лекарственное средство лентинан (лентинацин, эритаденин). История выращивания шиитакэ насчитывает около 2000 лет. Началось это в Японии, откуда шиитакэ распространился по всему миру. В настоящее время ежегодное мировое производство *Lentus edodes* составляет около 500 тыс. т, из которых около 150 тыс. т производится в Европе. Однако основной поставщик шиитакэ – Япония [1].

Цель работы – освоить методику культивирования гриба *Lentinus edodes* и подобрать субстраты для его оптимального роста.

Получение плодовых тел начинали с выращивания мицелия *Lentinus edodes* на различных плотных средах: PDA (Potato-dextrose agar), картофельно-глюкозном агаре, среде Чапека, среде Сабуро, голом агаре (на поверхности с фильтровальной бумагой). Чашки Петри с мицелием гриба культивировали в термостате при 19°C и 26°C. Через 7, 13 и 20 суток после посева измеряли диаметр и высоту колоний мицелия. Оценку роста культур на плотных средах проводили по радиальной скорости роста (РСР) колонии и ростовому коэффициенту (РК) [2].

Посев мицелия проводили в стеклянные банки с соломой пшеничной, крупными и мелкими сосновыми опилками, крупными березовыми опилками. В природные субстраты вносили дополнительные компоненты по следующей схеме: 1) контроль (без внесения); 2) CaCO₃ (5%); 3) CaCO₃ (5%) + отруби (5%); 4) CaCO₃ (5%) + мука гречневая (5%). Гриб культивировали в темноте при комнатной температуре. Через месяц заросшие мицелием субстраты переносили в полиэтиленовые мешки и в течение месяца формировали грибные блоки. Затем их доставали с полиэтиленовых мешков и размещали в поддоны с водой. Поддоны ставили на свету при комнатной температуре [1].

Расчет ростового коэффициента с учетом плотности и высоты колоний показал, что мицелий *Lentinus edodes* быстрее всего рос на среде Сабуро (РК = 23-28,2), а самая низкая интенсивность роста мицелия отмечалась на среде

Чапека (PK = 1,4-3,5) и голодном агаре (KP = 0,7-1,8). Согласно классификации А.С. Бухало [3], *Lentinus edodes* относится к медленнорастущим мицелиальным грибам. Во всех вариантах опыта мицелий *Lentinus edodes* быстрее рос при 26°C, чем при 19°C.

На природных субстратах плодовые тела гриба *Lentinus edodes* начали появляться на шестой месяц после посева. Выросшие плодовые тела подсчитывали, сушили и взвешивали. По массе исходного субстрата и массе сухих плодовых тел подсчитывали процентное соотношение массы плодового тела к массе субстрата [4]. Максимальное количество плодовых тел (4 шт.) было получено в двух варианта опыта (крупные опилки березовые+отруби+CaCO₃ и солома+отруби+CaCO₃). На крупных березовых опилках с добавлением муки и мела плодовые тела имели наибольшую массу по сравнению с другими вариантами (1,92 г). На крупных сосновых опилках с добавлением муки и отрубей и на соломе без добавок (контроль) выросло по одному плодовому телу небольших размеров. Их средняя масса составляла 0,33-0,68 г. В варианте с соломой+отруби+CaCO₃ отмечали самый высокий показатель процентного соотношения массы плодового тела к массе субстрата (11%).

Таким образом, наиболее высокие показатели роста мицелия отмечали на среде Сабуро (PK=23-28,2) и низкие – на среде Чапека (PK=1,4-3,5) и голодном агаре (KP=0,7-1,8). Для выращивания шиитаке и получения плодовых тел можно рекомендовать солому, крупные сосновые и березовые опилки. На березовых опилках гриб *Lentinus edodes* рос лучше, чем на сосновых. Мелкие опилки в качестве субстрата для выращивания шиитаке использовать не рекомендуется. Наиболее плодovitыми субстратами оказались солома и опилки березовые крупные с добавлением отрубей и мела. На рост шиитаке благоприятное влияние оказывали органические добавки (отруби и мука гречневая) и мел.

Литература

1. Гарибова, Л. Выращивание грибов / Л. Гарибова. – М: Из-во Вече, 2005. – 95 с.
2. Ветчинкина, Е.П. Морфологические особенности роста мицелия и плодоношения некоторых штаммов съедобного ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* / Е.П. Ветчинкина, В.Е. Никитина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – Т.9.– №4. – 2007. – С. 1085-1090.
3. Бисько Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько, А.С. Бухало, С.П. Вассер. – Киев: Наукова думка, 1983. – 312 с.
4. Никитина В.Е. Особенности роста мицелия *Lentinus edodes* на различных средах / В.Е. Никитина, Р.А. Озерова, О.М. Цивилева // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета, 2003. – С. 176-179.

Технологические аспекты биосинтеза полиенового антибиотика розеофунгина в ферментаторе

**Саданов А.К., Треножникова Л.П., Балгимбаева А.С., Берзин В.Э.,
Кулмагамбетов И.Р.**

*ТОО Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии КН МОН РК,
Алматы, Казахстан,
электронный адрес: imv_rk@list.ru*

Проблема микозов является актуальной в связи с их широким распространением и неуклонным ростом заболеваемости. В настоящее время грибковые инфекции поражают до 5-20% взрослого населения в мире, причем на долю микозов приходится от 37 до 42% заболеваний кожи и её придатков. Число больных с различными формами микозов не имеет тенденции к снижению, поскольку грибковые инфекции высоко контагиозны и плохо поддаются лечению, что объясняется, как недостаточной эффективностью существующих препаратов, так и быстрой изменчивостью грибов, приводящей к появлению устойчивых форм.

Сотрудниками НППЦ микробиологии и вирусологии (г.Алматы, Казахстан) открыт и изучен новый противогрибковый полиеновый антибиотик розеофунгин, обладающий высокой активностью в отношении патогенных грибов – возбудителей микозов человека. Новый оригинальный антибиотик розеофунгин относится к группе карбонил-конъюгированных пентаеновых антибиотиков. Продуцентом антибиотика является проактиномицетный вариант *Streptomyces roseoflavus* var. *roseofungini* AS-20.14.

Производство антибиотика розеофунгина осуществляется методом периодической ферментации в ферментаторе при определенных значениях температуры, рН, аэрации, перемешивании. Процесс осуществляется путем глубинного культивирования продуцента в жидкой питательной среде с 3% овсяной муки, в качестве источников углерода используются глюкоза и лактоза. К ферментатору со стерильной питательной средой, охлажденной до температуры $28 \pm 1^\circ\text{C}$, стерильно подсоединяют инокулятор с посевной культурой. Засев производят передачей посевной культуры из инокулятора 5-8% от объема питательной среды в ферментатор путем создания избыточного давления в инокуляторе.

Биосинтез антибиотика розеофунгина в ферментаторе 610 SIP проводят при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72-96 часов. Режим аэрации переменный: в первые сутки – 1 литр воздуха на 1 литр среды в минуту, во вторые сутки – 0,5 литра воздуха на 1 литр среды в минуту. Режим температуры и рН в процессе культивирования контролируют по показателям регистрирующих

приборов. Для поддержания pH на уровне $7,0 \pm 0,1$ в ферментаторе используют 40% раствор гидроксида натрия. В случае пенообразования подается стерильный пеногаситель – растительное масло.

В процессе биосинтеза розеофунгина с соблюдением правил асептики через каждые 24 часа отбирают пробы культуральной жидкости в количестве $100,0 \pm 5,0$ мл для проведения информативного контроля, в которых контролируют: водородный показатель (pH), массовую долю углеводов, цвет биомассы, морфологические характеристики биомассы.

Разработка биосенсоров для детекции глюкозы на основе наноструктурированного графита

Семашко Т.В.¹, Жуковская Л.А.¹, Демешко О.Д.¹, Михаленок Е.В.²,
Бельская А.И.², Бусла А.П.²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: tsemashko@mbio.bas-net.by

²ОАО «Минский НИИ Радиоматериалов», Минск, Беларусь

Нанотехнологии и наноматериалы проникли во все сферы человеческой деятельности, они стали неотъемлемой частью аналитической биотехнологии, одной из главных задач которой является разработка технологий и устройств для экспрессного, чувствительного и селективного анализа различных многокомпонентных объектов [1, 2]. Среди большого разнообразия сенсоров лидирующее положение занимают биосенсоры для детекции глюкозы [3-5]. Спектр наноматериалов, применяемых в биосенсорах, достаточно широк, особый интерес представляют собой наноструктурированный графит.

Графит – электропроводящий материал измерительной части биосенсора, на который осуществляется иммобилизация фермента. Традиционно для производства электродов применяются графит, углеродные волокна и ткани, другие углеродные материалы. Этот ряд активно дополняется новыми наноуглеродными графеноподобными соединениями: фуллеренами, нанотрубками, карбином, графеном, высокоориентированным пиролитическим графитом. Благодаря слоисто-волокнутой структуре такой графит хорошо прессуется, формируется, прокатывается и армируется [3].

Цель данного исследования – получение образцов наноструктурированного графита и создание на его основе тест-полосок для определения глюкозы в крови с использованием в качестве индикаторного компонента глюкозооксидазы *Penicillium adametzii*.

Была проверена возможность использования нескольких методов обработки графитов для создания наноструктурированного материала. Получение конъюгатов с глюкозооксидазой осуществляли путем нековалентной иммобилизации.

Обработку графита проводили с использованием химических реагентов (серной кислоты, щелочи) и термически. Установлено, что получение наноструктурированного графита обеспечивает многоэтапная последовательная обработка растворами щелочи и кислоты под воздействием высоких температур от 400 до 1000°C.

Данный способ обеспечивал получение частиц графита преимущественно от 1,2 до 3,6 мкм (в длину). Показатели электропроводности частиц составляли 0,0025- 0,0037 См.

Установлено, что до химической и термической обработки кристаллическая решетка используемого графита была многоступенчатой гексагональной формы, частицы объединялись в округлые радиально-лучистые агрегаты. После обработок кристаллическая решетка образцов стала высокоориентированной, агрегаты стали листоватой формы.

В дальнейшем была отработана технология введения наноструктурированного графита в состав ферментной пасты глюкозооксидазы. Определено, что введение фермента в графит-медиаторную пасту и ее последующая сушка должны осуществляться при температуре не выше 20°C. Полученные образцы индикаторного слоя обеспечивали достижение силы тока тест-полосок 18-22 мкА, что свидетельствует о перспективности создания на основе полученных наноструктурированных материалов биосенсоров для детекции глюкозы.

Таким образом, путем химической и термической обработки графитов различных марок получены и охарактеризованы образцы наноструктурированного коллоидно-графитового препарата. Определены условия введения наноструктурированного графита в состав ферментной пасты. Разработана технология введения конъюгированной на наночастицах графита глюкозооксидазы в состав модифицированного графит-медиаторного композита.

Литература

1. Jain, K.K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics / K.K. Jain // Clinica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 358. – P. 37–54.
2. Stylios, G.K. Applications of nanotechnologies in medical diagnostics / G.K.Stylios, P.V.Giannoudis, T.Wan // Injury, International Journal of the Care of the Injured. – 2005. – Vol. 36S. – P. S6-S13.
3. Cash, K.J. Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes / K.J.Cash, H.A.Clark // Trends in Molecular Medicine. – 2010. – Vol. 16, N. 12. – P. 584-593.
4. Scognamiglio, V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years / V. Scognamiglio // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – Vol. 47. – P. 12–25.
5. Nanomaterial-mediated biosensors for monitoring glucose / M Taguchi [et al.] // J Diabetes Sci Technol. – 2014. – Vol. 8(2). – P.403-411.

Антимикробное действие дезинфицирующих препаратов на суспендированные клетки и биопленки

Сикор А.Н., Юхневич Г.Г.

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь,
электронный адрес: guhnev@grsu.by

В настоящее время признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок [1]. Клетки, включенные в биопленки, демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов. Установлено, что резистентность микроорганизмов в составе биопленки возрастает во много раз по сравнению с суспендированными, что требует их дальнейшего детального изучения, в том числе и при выборе современных дезинфицирующих веществ для обеспечения санитарной очистки оборудования и помещений.

Цель работы – провести сравнительный анализ антимикробного действия дезинфицирующих средств на бактериальные суспензии и биопленки.

В работе использовали дезинфицирующий комбинированный препарат «Микроцид-Д», содержащий в качестве действующих веществ глиоксаль 6%, и алкилдиметилбензиламмоний 5 %, и предназначенный для дезинфекции птицеводческих и животноводческих помещений, санитарно-технического оборудования, посуды, предметов ухода за животными; дезинфекции поверхностей в организациях здравоохранения [2].

Тест-культурами для оценки антимикробного действия препарата служили бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis*. Для получения суспензии бактерии культивировали в МПБ в течение 24 ч. Для адсорбирования на твердой поверхности применяли метод культивирования статических биопленок в жидкости [3]. Биопленки выращивали в течение 3 сут статически в плоскодонных 96-луночных планшетах при температуре 37°C с пересевами каждые 24 ч. После инкубации удаляли остатки среды с суспендированными клетками, образовавшиеся биопленки отмывали фосфатным буфером (рН 7,4).

Начиная с концентрации, рекомендованной для практического применения, двукратные разведения дезинфицирующего средства в питательной среде. Контролем служил рост бактерий без внесения дезинфицирующих веществ. Затем в лунки, содержащие суспендированные клетки и биопленку, добавляли 0,005% резазурина и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Ф300ТП при длине волны 540 нм через 15, 30, 60 и 90 мин.

Установлено, что после внесения препарата «Микроцид-Д» ферментативная активность суспензий и биопленок *B. subtilis* и *P. aeruginosa* уменьшилась по сравнению с исходной как при увеличении концентрации препарата, так и при увеличении времени экспозиции. Стоит отметить, что при концентрации 0,01% препарата заметное снижение развития суспензий и биопленок культуры *P. aeruginosa* произошло уже через 15 мин, а для *B. subtilis* только через 90 мин. Эффективность воздействия 1,5%-ого изучаемого дезинфицирующего средства на суспензии клеток обоих видов бактерий не превышала 67% (таблица 1).

Таблица 1– Эффективность воздействия препарата «Микроцид-Д» на суспендированные клетки *P. aeruginosa* и *B. subtilis*, %

Концентрация препарата	<i>P. aeruginosa</i>				<i>B. subtilis</i>			
	15 мин	30 мин	60 мин	90 мин	15 мин	30 мин	60 мин	90 мин
1,50%	58,5	59,8	61,1	66,6	57,4	58,0	60,2	66,8
1,00%	56,1	58,8	59,4	60,5	58,0	59,7	61,5	64,4
0,50%	45,2	46,8	48,4	50,8	37,4	37,9	39,4	46,6
0,01%	38,3	39,7	41,0	41,9	30,2	30,8	33,4	37,2

Эффективность воздействия 1,5%-ого дезинфицирующего препарата на биоплёнки, сформированные клетками *P. aeruginosa*, достигла 93,9%, а на биоплёнки, сформированные клетками *B. subtilis* – 88,3% (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность воздействия препарата «Микроцид-Д» на биоплёнки по отношению к *P. aeruginosa* и *B. subtilis*, %

Концентрация препарата	<i>P. aeruginosa</i>				<i>B. subtilis</i>			
	15 мин	30 мин	60 мин	90 мин	15 мин	30 мин	60 мин	90 мин
1,50%	87,8	88,7	93,4	93,9	82,1	85,6	87,3	88,3
1,00%	87,3	88,4	93,3	93,7	79,4	80,0	84,3	87,0
0,50%	81,6	84,1	93,3	93,6	45,5	63,1	74,9	82,8
0,01%	78,1	80,9	84,4	91,7	35,4	49,2	74,9	81,6

Выявленная более высокая эффективность препарата «Микроцид-Д» в отношении биоплёнок в сравнении с суспендированными клетками может быть связана с его высокими адсорбционными свойствами, что и определяет возможность использования данного дезинфицирующего вещества для обработки разнообразных поверхностей.

Литература

1. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64, N 4. – P. 847–867.
2. Инструкция по применению препарата дезинфицирующего «Микроцид-Д» № 16-12-01/7556 от 05 марта 2009 г. – 10 с.
3. Пужевская, Т.О. Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas* / Т.О. Пужевская [и др.]. – Антибиотики и химиотерапия, 2009. – № 54. – С. 10–13.

Выделение, очистка и характеристика молокосвертывающих протеиназ из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*

Сакович В.В., Жерносеков Д.Д.

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
электронный адрес: mrs.valeryia@mail.ru*

Протеолитические ферменты широко используются в молочной промышленности (сыроделии), в качестве сычужных ферментных препаратов. Замена дорогостоящего сычужного фермента грибными протеазами специфического действия экономически выгодна и перспективна. Уровень активности молокосвертывающих ферментов базидиальных грибов сопоставим с активностью коммерческих препаратов, традиционно используемых для приготовления сыров. В литературе имеются данные, что экстракт плодовых тел *P. ostreatus* имеет сходство с препаратами, используемыми в молочной промышленности [1].

Материалы и методы. Использовали глубинную культуру *P. ostreatus*. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически [2]. За единицу молокосвертывающей активности принимали количество фермента, сворачивающее 100 мл молока за 40 мин при 35°C [3]. Общую протеолитическую активность определяли по лизису желатина в тонком слое агарового геля [4]. Для первичной очистки применялся метод высаливания с использованием хлорида натрия. Для удаления соли применялся метод диализа. Дальнейшую очистку проводили на колонке с DEAE-сефарозой (1,5 X 3) (Bio-Rad, США).

Результаты и выводы. При высаливании культуральной жидкости сохранилась практически вся исходная молокосвертывающую активность. При хроматографии на DEAE-сефарозе фермент, обладающий молокосвертывающей активностью, практически весь выходит в промывной фракции, при этом достигается его очистка в 22.7 раза. Данный этап очистки предлагаем использовать в сыроделии на этапе образования сырного сгустка.

При исследовании влияния pH на протеолитическую активность было установлено, что протеолитическая активность ферментного препарата сохранялась во всем исследуемом диапазоне pH от 3,6 до 8,0. При этом pH оптимум протеолитической активности находится при значении pH 7,0. По сравнению с протеолитической активностью молокосвертывающая активность ферментного препарата наблюдалась в более узком диапазоне pH от 3,6 до 5,6. Следует отметить, что pH оптимум молокосвертывающей активности представлен двумя пиками при pH 3,6 и pH 5,0. Однако, при практическом использовании препарата, обладающего МСА, мы рекомендуем использовать

pH среды (буфера) со значением 3,6, так как при данном значении pH соотношение МСА/ПА составляет 74:1. При pH 5 соотношение МСА/ПА составляет 13:1. При высокой протеолитической активности, что наблюдается при pH 5 полученные сгустки часто имеют горький вкус, что негативно сказывается на качестве сырной продукции

Таблица 1 – Соотношение молокосвертывающей к протеолитической активности

pH	Белок мг/мл	Общая МСА	Удельная МСА	Общая ПА	Удельная ПА	МСА/ПА
3,6	1,07	81,08	75,78	1,09	1,02	74:1
5,0	1,07	80	74,77	6,32	5,91	13:1

Температурные оптимумы для ПА и МСА оказались разными. Протеолитическая активность ферментного препарата из *P.ostreatus* наблюдалась во всем исследуемом диапазоне температур от 25 до 60°C. При этом температурный оптимум протеолитической активности находится при 45°C. Максимальная молокосвертывающая активность наблюдается при температуре 35°C.

Таким образом, частично очищенный препарат охарактеризован для промышленного использования: pH 3,6; температура 35°C; частично очищенный препарат имеет преимущество перед высоко очищенным, благодаря его стабильности.

Литература

1. Emmanuel, V. PontualBelany, E. CarvalhoRanilson, S. Ranilson, C. BezerraLuana, B.B. Coelho, M.G. Caseinolytic and milk-clotting activities from Moringaoleifera flowers. Food Chemistry, 2012, Vol. 135. No. 6, 1848-1854
2. Рудакова Н.Л. Секретируемая металлопротеиназа *Bacillus intermedius*: получение гомогенного препарата фермента и исследование физико-химических свойств. Ученые записки казанского государственного университета, 2010, Т.40, кн.2, С. 145-154.
3. ГОСТ ISO 11815-2015. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента. М.: Стандартформ, 2015. 10 с.
4. Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 76, 1973, 103-122.

Секция 5

Природоохранные биотехнологии

Выделение и скрининг микроорганизмов-деструкторов ксилола и толуола

Алешкевич И.И., Петрова Г.М., Глушень Е.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: shuniborova@mail.ru

Очистка промышленных выбросов от летучих органических соединений (ЛОС) является одной из актуальных экологических проблем, поскольку только в атмосферу ежегодно выбрасываются десятки тысяч тонн органических веществ в газообразном состоянии. Так в атмосферный воздух Республики Беларусь ежегодно от стационарных источников выделяется более 50 тысяч тонн ЛОС. Одним из значительных источников попадания данных токсикантов в окружающую среду является применение растворителей в производственных процессах, связанных с нанесением лакокрасочных покрытий на производимую промышленную продукцию с целью защиты изделия от агрессивного воздействия окружающей среды. Основными ЛОС, используемыми в лакокрасочных материалах, являются: толуол, орто-, пара- и метаксилолы [1-3].

Цель настоящего исследования – выделение и скрининг высокоактивных штаммов микроорганизмов-деструкторов ксилола и толуола.

Скрининг микроорганизмов, способных к утилизации ксилола и толуола, проводили среди выделенных и музейных штаммов коллекционного фонда лаборатории природоохранных биотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси. Выделение микроорганизмов, утилизирующих ксилол и толуол, проводили методом накопительных культур. В качестве источников выделения использовали сточные воды лакокрасочных производств, растворы абсорбционно-биохимических установок предприятий нефте-химической отрасли; а также дерново-подзолистая почва, загрязненная токсикантами в искусственных условиях. Для выделения и культивирования микроорганизмов-деструкторов использовали минеральную среду Е-8 с различной концентрацией токсикантов в качестве единственного источника углерода.

В результате скрининга из 380 музейных штаммов отобрано 62 бактериальные культуры, способные использовать ксенобиотики в качестве единственного источника углерода. Среди отобранных штаммов доминировали представители рода *Rhodococcus*.

Многократные высевы из накопительных культур позволили обнаружить и выделить в чистую культуры только 11 штаммов с различной активностью растущих на ксилоле и толуоле. Рост большинства из выделенных изолятов на среде с токсикантами в концентрации 100 и 300 мг/л по оценочной шкале характеризовался как «хороший» и «слабый». Среди выделенных

микроорганизмов-деструкторов наиболее активный рост в отношении данных ксенобиотиков был характерен для штаммов КТ-23 и Вг-3. Согласно морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим свойствам штаммы КТ-23 и Вг-3 предварительно идентифицированы как *Rhodococcus* sp.

Толуол являлся наиболее предпочтительным субстратом для роста исследуемых микроорганизмов-деструкторов. Кроме того, повышение концентрации токсиканта в среде до 500 и выше мг/л не отразилось на их активности роста. Наиболее активными штаммами являлись музейные культуры *Rhodococcus ruber* 30П, *R. ruber* P1, *R. ruber* 52a, *R. opacus* 31D, *R. erythropolis* 87Ф, *R. ruber* H2004, а также выделенные родококки КТ-23 и Вг-3.

Среди микроорганизмов, способных к утилизации ксилола в концентрациях до 300 мг/л, лидировали *R. ruber* 1НГ, *R. ruber* 1В, *R. ruber* 52a, *R. opacus* 31D, *R. erythropolis* 5Д, *R. erythropolis* 87Ф, *R. ruber* H2004, *Rhodococcus* sp. КТ-23 и *Rhodococcus* sp. Вг-3. Увеличение концентрации токсиканта в ростовой среде до 1000 мг/л значительно сказывалась на их активности роста. Исключение составили выделенные штаммы КТ-23 и Вг-3, а также музейные культуры *R. erythropolis* 87Ф и *R. ruber* H2004.

Проверка деструктивной активности на средах с ксенобиотиками в концентрациях от 100 до 1000 мг/л показала, что наиболее активные штаммы (*Rhodococcus* sp. КТ-23, *Rhodococcus* sp. Вг-3, *Rhodococcus erythropolis* 87Ф и *Rhodococcus ruber* H2004) осуществляли очистку водных растворов от ксилола на 70-92%, а от толуола на 74-95% в зависимости от концентрации токсикантов. Следует отметить, что штаммы КТ-23 и Вг-3 использовали более активно толуол в качестве единственного источника углерода, чем ксилол. Скорость деструкции толуола данными штаммами в зависимости от концентрации на 10-30% выше скорости утилизации ксилола. В то время, как штаммы *Rhodococcus erythropolis* 87Ф и *Rhodococcus ruber* H2004 с одинаковой скоростью утилизировали как ксилол, так и толуол.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения вышеперечисленных штаммов для очистки сточных вод и абсорбционных растворов от ксилола и толуола.

Литература

1. Durmusoglu, E. Health risk assessment of BTEX emissions in the landfill environment / E. Durmusoglu, F. Taspinar, A. Karademir // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – Vol. 176, Is. 1-3. – P. 870-877.
2. Bolden, A.L. New look at BTEX: are ambient levels a problem? / A.L. Bolden, C.F. Kwiatkowski, T. Colborn // Environmental Science & Technology. – 2015. – Vol. 49, Is. 9. – P. 5261-5276.
3. Bolden, A.L. New look at BTEX: are ambient levels a problem? / A.L. Bolden, C.F. Kwiatkowski, T. Colborn // Environmental Science & Technology. – 2015. – Vol. 49, Is. 9. – P. 5261-5276.

Изучение термотолерантных микроорганизмов, выделенных из почв Западного Казахстана

**Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г.,
Спанкулова Г.А.**

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан,
электронный адрес: sa.kz@list.ru, ecomicrolab@gmail.com*

Температура является ключевым фактором окружающей среды, влияющей на микробный рост и активность в почве, а также на физическое состояние углеводов, присутствующих на загрязненном участке [7, 8]. В зависимости от температуры бактериальная активность и скорости биодegradации нефти и нефтепродуктов могут сезонно изменяться [9, 10]. Около 60% мировых запасов нефти находится на территориях стран с жарким климатом, где специфика природных, в частности, температурных условий вынуждает более тщательно подходить к выбору метода ремедиации загрязненных земель [6]. В нефтедобывающих регионах Казахстана климат резко-континентальный, характеризующийся резкими сезонными и суточными перепадами температур. Исследования, связанные с поиском и изучением термотолерантных микроорганизмов-деструкторов нефти, в настоящее время являются весьма актуальными.

Целью работы было выделение и изучение термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов.

Выделение термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов проводили методом накопительных культур из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана. Биодеструкцию нефти определяли гравиметрическим и газохроматографическим методами. Идентификацию активных штаммов термотолерантных нефтеокисляющих бактерий проводили молекулярно-генетическим методом.

Из нефтезагрязненных почв при температуре 50°C было выделено 14 изолятов. При их культивировании в жидкой минеральной среде с нефтью степень ее деструкции составляла 17,7–33,8% за 7 суток. Три наиболее активных изолята утилизировали свыше 30% нефти. Абиотические потери нефти составляли 10,8%. Газохроматографический анализ нефти после культивирования отобранных штаммов микроорганизмов показал что, в ходе эксперимента протекают реакции, в результате которых изменяется содержание основных компонентов нефти. Согласно полученным данным в опытных образцах происходило снижение количества n-алканов. Также отмечалось уменьшение основных ароматических углеводов.

Проведенные исследования по влиянию аэрации на степень деструкции нефти термотолерантными культурами микроорганизмов показали, что при более интенсивной аэрации у большинства культур увеличивалась деструкционная активность на 3,2–12,2% (см. рисунок). Наибольшая деструкция нефти составила 37,6%.

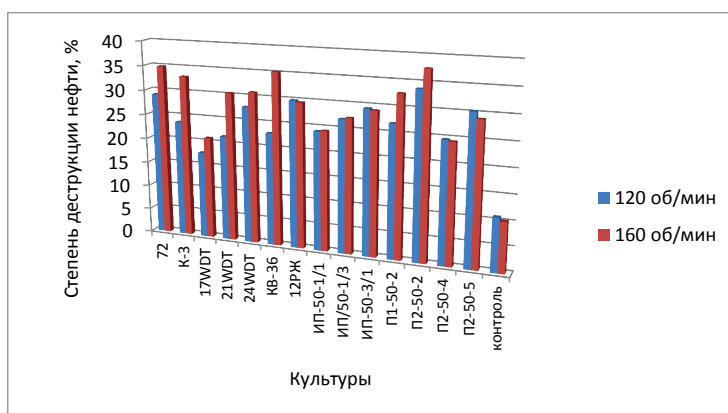


Рисунок – Деструкция нефти культурами при различной степени аэрации при 50°C

Идентификация молекулярно-генетическим методом показала, что выделенные штаммы термотолерантных микроорганизмов были представлены родами *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*.

Литература

- 1 Varjani S.J., Thaker M.B., Upasani V.N. Optimization of growth conditions of native hydrocarbon utilizing bacterial consortium “HUBC” obtained from petroleum pollutant contaminated sites // *Indian J. Appl. Res.* – 2014. – Vol. 4, № 10. – P. 474-476.
- 2 Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon / S. Chandra [et al.] // *Ann. Microbiol.* – 2013. – Vol. 63/ - P. 417-431.
- 3 Iqbal J. Effect of temperature on efficiency of in situ bioremediation technology: A laboratory microcosm and field study: PhD Thesis - Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2003. – 118 p.
- 4 Pandey J., Chauhan A., Jain R.K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation // *FEMS Microbiol Rev.* – 2009. – Vol. 33. – P. 324–375.
- 5 Thermotolerant Oil-Degrading Bacteria Isolated from Soil and Water of Geographically Distant Regions / Ya.A. Deegan [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2016. – Vol. 52, №. 4. – P. 389–396.

Выделение галотолератных бактерий для стимуляции роста растений в условиях засоления почвы

**Евенкова-Чернецова К.И., Алешенкова З.М., Ананьева И.Н.,
Сафронова Г.В., Наумович Н.И.**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: ananeva@mbio.bas-net.by*

Техногенное засоление почвы является одной из крупнейших проблем озеленения больших городов, вследствие использования противогололедных реагентов на дорогах в зимний период. В Республике Беларусь, в том числе в Минске, в зимний период используется противогололедный реагент галит – минеральный концентрат, состоящий из натрия хлористого технического с примесями других химических веществ. Его получают как попутный продукт при разведке и добыче калийной и поваренной соли или в процессе переработки калий-натрий содержащей руды – сильвинита.

Большие объемы и химический состав используемого галита негативно влияют на почвы и растения вдоль транспортных магистралей, нарушая экологическую обстановку, вызывая засоление почв и, как следствие, увеличение количества ослабленных деревьев в посадках вдоль улиц или гибель зеленых насаждений [1]. Справиться с последствиями загрязнения городских почв, дисбалансом в них элементов минерального питания, и соответственно, повысить жизненное состояние зеленых насаждений, возможно посредством применения удобрений, мелиорантов, регуляторов роста растений и др. Для пополнения микробоценозов почвы полезной почвенной и ризосферной микрофлорой с целью улучшения питания растений эффективно использование микробных удобрений, основу которых составляют азотфиксирующие и фосфатмобилизующие микроорганизмы. Несмотря на негативное влияние засоления, в почвах с высоким уровнем засоления и техногенной нагрузкой формируется уникальная микрофлора, способная выживать в экстремальных условиях среды. Микроорганизмы, обладающие комплексом агрономически ценных свойств и адаптированные к выживанию в условиях повышенной минерализации, представляют особый интерес.

Цель исследований – выделение солеустойчивых штаммов бактерий с азотфиксирующими и фосфатмобилизующими свойствами.

Из твердых солевых отходов Старобинского месторождения калийных солей ОАО “Беларуськалий” выделен изолят бактерий СА-6, хорошо растущий на безазотистых средах Эшби и Bürk’a. В ходе ПЦР-анализа фрагмента *nifH*-гена исследуемого изолята с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R у исследуемого изолята выявлена специфическая зона амплификации размером ~ 430 п.н., что

подтверждает генетически детерминированную способность анализируемых бактерий фиксировать азот атмосферы и их принадлежность к азотфиксаторам. Азотфиксирующую активность изолята СА-6 в чистой культуре определяли ацетиленовым методом [2] на газовом хроматографе Хром-4, модернизированном аппаратно-програмным комплексом UniChrom 4.x-5. Выявлено, что нитрогеназная активность бактерий СА-6 в чистой культуре составляла 155,8 нМоль C_2H_4 фл./сут.

При культивировании бактерий изолята СА-6 на агаризованной глюкозо-аспарагиновой среде Муромцева [3], в которую методом осаждения вносили фосфаты кальция образовывались зоны «галло», т.е. бактерии способны солибилизовать фосфаты кальция.

Изучение устойчивости изолята СА-6 к хлориду натрия показало, что он растет в среде, содержащей NaCl в концентрации 1-10%. Изолят относится к галотолерантным бактериям, поскольку растет как на средах, содержащих хлорид натрия, так и без NaCl.

Идентификация изолята была осуществлена с помощью секвенирования гена 16S рНК. Отобранный галотолерантный бактериальный изолят СА-6 идентифицирован как *Rhodococcus jostii*.

Оценка влияния галотолерантного штамма *Rhodococcus jostii* СА-6 на всхожесть семян, рост и развитие проростков лядвенца при различных уровнях засоления показала, что обработка семян культуральной жидкостью штамма *Rhodococcus jostii* СА-6 оказывает позитивный эффект. В опыте с концентрацией хлорида натрия 513 и 855 мМ всхожесть семян лядвенца выше на 13 и 19% (соответственно), а длина проростков на 19 и 12%, соответственно, по сравнению с контролем без обработки в условиях засоления.

Выделенный галотолерантный штамм *Rhodococcus jostii* СА-6 перспективен для разработки на его основе микробного препарата для стимуляции роста и повышения устойчивости растений в условиях засоления почвы.

Литература

1. Сысой, М. Минск «пересаливают»: Расследуем, почему реагенты все еще портят город [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.the-village.me/village/city/report/263773-salt>. – Дата доступа: 20.11.2018.
2. Умаров, М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М.М. Умаров // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119–123.
3. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств: Метод. рекомендации ВНИИСХМ. – Л., 1987 – 53 с.

Гидроксированные полихлорированные бифенилы – как источник углерода для штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7

Егорова Д.О.¹, Горбунова Т.И.², Первова М.Г.²

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» -
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия, электронный адрес: daryao@rambler.ru

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) являются стойкими органическими загрязнителями и, согласно Стокгольмской конвенции 2001 г., подлежат полному уничтожению [1]. В настоящее время все разработанные технологии имеют ряд ограничений, препятствующих эффективному уничтожению ПХБ. Особую проблему представляет очистка объектов окружающей среды, так как ПХБ устойчивы к физическому, химическому и биологическому воздействиям. Однако, в природе они частично трансформируются до гидроксированных ПХБ (НО-ПХБ). Установлено, что НО-ПХБ, и в особенности моно-НО-ПХБ, являются не менее токсичными для животных и человека, чем исходные конгенеры ПХБ [2]. В связи с этим проблема разложения ПХБ и НО-ПХБ в объектах окружающей среды является актуальной в настоящее время.

Рядом исследований установлено, что аэробные бактерии способны разрушать ПХБ и НО-ПХБ до менее токсичных соединений, а в ряде случаев, утилизировать их полностью используя в качестве ростового субстрата [3].

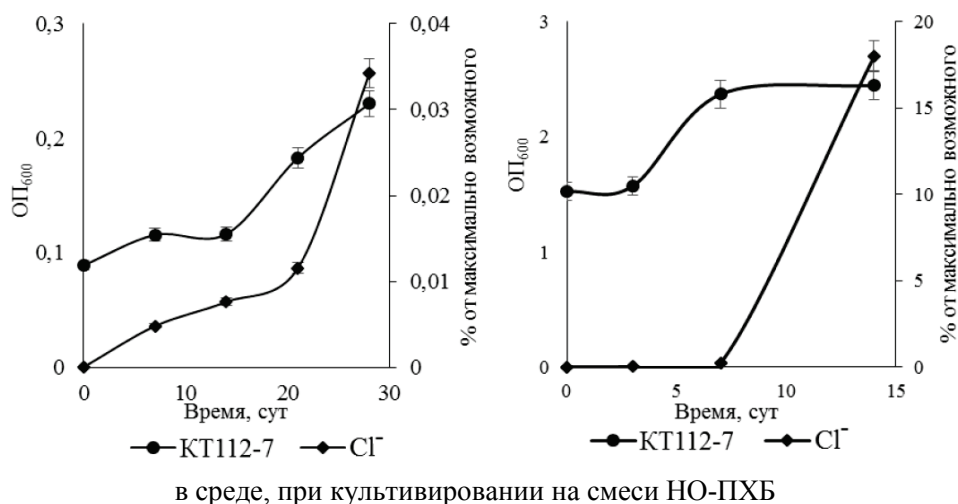
Цель исследования – изучить возможность использования смеси НО-ПХБ в качестве единственного источника углерода при культивировании штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7.

Периодическое культивирование производили в минеральной среде К1, содержащей смесь НО-ПХБ (77,7% моно-НО-ПХБ, 9,5% ди-НО-ПХБ) в концентрации 0,1 г/л. Смесь гидроксизамещенных полихлорбифенилов получена при химической модификации коммерческой смеси ПХБ «Совол». Культуру штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 вносили в двух концентрациях: 0,09 о.е. и 1,5 о.е. при длине волны 600 нм. Контролировали рост культуры по изменению оптической плотности (спектрофотометр Bio-Сpec-mini, Shimadzu, Япония), концентрацию свободных ионов хлора в среде (спектрофотометрически при реакции с азотнокислым серебром) и образование промежуточных метаболитов (ВЭЖХ, хроматограф LC20А, Shimadzu, Япония).

Установлено, что штамм КТ112-7 растет в минеральной среде, где единственным источником углерода является смесь НО-ПХБ (рисунок). Удельная скорость роста штамма составила 0,015 сут⁻¹ в обоих вариантах эксперимента, что свидетельствует о труднодоступности субстрата. Однако,

рост штамма сопровождался появлением в среде свободных ионов хлора. Наиболее активно данный процесс протекал при высокой начальной плотности культуры. К 14 суткам эксперимента концентрация ионов хлора в среде составила 18% от теоретически возможного, что при пересчете в удельные единицы превышает аналогичный показатель при низкой начальной плотности культуры штамма КТ112-7 в 20 раз. В обоих вариантах в среде удалось зафиксировать присутствие катехола (максимальная обнаруженная концентрация составляла 0,004 мг/л), что также подтверждает глубокую трансформацию исходного углеродного субстрата.

Рисунок – Рост штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 и накопление ионов хлора



Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 использует смесь НО-ПХБ в качестве единственного источника углерода, разлагая входящие в нее конгенеры до соединений основного обмена клетки, что может быть использовано при разработке технологий биоремедиации ПХБ-загрязненных территорий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-05016 мк.

Литература

1. Стокгольмская конвенция «О стойких органических загрязнителях». http://chm.pops.int/Portals/0/sc10/files/a/stockholm_convention_text_r.pdf
2. Tehrani, R. Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: source, fate, and toxicities / R. Tehrani, B. Van Aken // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2014. – V. 21. – P. 6334–6345.
3. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil / S. Mizukami-Murata [et al.] // Chemosphere. – 2016. – V. 165. – P. 173–182.

Биосинтез наночастиц серебра различными микроорганизмами

Зайнидинова Л.И.¹, Куканова С.И.¹, Жураева Р.Н.¹, Лобанова И.В.¹,
Вохидова Н.²

¹Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан,
электронный адрес: zajn-lyudmila@yandex.ru

²Институт химии и физики полимеров АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Изучение нанотехнологии в основном представлено биологией, физикой, химией и материаловедением, а также разработкой новых терапевтических наноразмерных материалов для биомедицинских, фармацевтических применений, что особенно характерно для наночастиц серебра и золота. Как известно, биологический синтез наночастиц осуществляется различными организмами, такими как, бактерии, грибы, водоросли, микроводоросли и растения. В наших исследованиях использовались в основном бактерии и микроскопические грибы как продуценты наночастиц серебра. Для изучения процесса биосинтеза наночастиц серебра бактериями и грибами нами был проведен скрининг коллекционных микроорганизмов из коллекции Института микробиологии АН РУз. Выбор объектов определялся устойчивостью их к различным загрязнениям, в том числе тяжелым металлам, а также способностью к биосорбции серебра, т.к. считается, что способность к образованию наночастиц металлов является защитной функцией микроорганизмов. Образование серебряных наночастиц фиксировали визуально по окрашиванию растворов и биомассы в желтый и бурый цвета, характерные для НЧ серебра.

Полученные результаты позволили определить наиболее активные в биосинтезе наночастиц серебра штаммы микроорганизмов *Pseudomonas stutzeri* и *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. Среди микроскопических грибов образование НЧ серебра отмечалась для *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. и *Acremonium* sp. Следует отметить, что наибольшая активность наблюдается через 2 суток культивирования для всех изученных микроорганизмов. Более длительный контакт с солью серебра вызывает агрегацию НЧ и выпадение осадка, особенно это справедливо в отношении микроскопических грибов.

Факт образования наночастиц, синтезированных в присутствии различных микроорганизмов исследован УФ-спектроскопическим и АСМ-методами. Изученные спектры поглощения в УФ области выявили, что в присутствии микроорганизмов в спектре появляются ярко выраженные полосы поглощения и повышается их интенсивность. Это свидетельствует об изменении

химического состава среды связанного с деятельностью микроорганизмов, что приводит к образованию наночастиц серебра. АСМ-снимки и гистограмма распределения НЧ серебра в полимерной матрице показывают, что образуются частицы в диапазоне 1,5-5 нм.

Известно, что микроорганизмы, устойчивые к действию солей тяжелых металлов и способные восстанавливать их ионы до металлов в нулевой степени окисления, незаменимы в таких процессах, как очистка почв и сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами, биосорбция металлов и биоформирование металлических НЧ. Поэтому перспективным является изучение микробных сообществ, реализующих механизмы коллективной устойчивости к металлам, например, сообществ активного ила водоочистных сооружений, которые также являются эффективными сорбентами металлов. Исходя из этого, также исследованы культуры, выделенные из иловых отложений станции очистки и наиболее толерантные к солям серебра. Устойчивые к серебру культуры также эффективны при работе с другими тяжелыми металлами, т.е. возникает эффект полирезистентности.

Показана антимикробная активность полученных наночастиц серебра по отношению к *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Бактериальная деградация трибенурон-метила – гербицида класса сульфонилмочевины

Крючкова Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В.

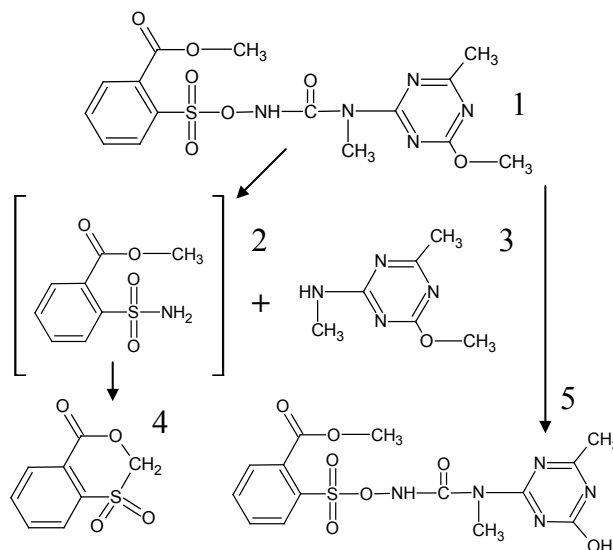
ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов, Россия, kryu-lena@yandex.ru

Гербицидные препараты класса сульфонилмочевины популярны во всём мире из-за низкой дозы применения ($10-40 \text{ г га}^{-1}$) и беспрецедентно высокой активности [1]. Они состоят из радикала R1, представленного алифатическим, ароматическим или гетероциклическим кольцом, соединённым сульфонилмочевинным мостиком с R2, являющимся производным сим-триазина или пиримидина [2]. Химические свойства, биохимическое действие, деградация в природе соединений сульфонилмочевины подробно изучались [3]. Однако данные о бактериальной деградации носят противоречивый характер, особенно при сопоставлении путей и метаболитов, описанных для биодеградации и химического гидролиза. Данная работа посвящена исследованию бактериальной деградации трибенурон-метила (ТБМ) штаммом *Pseudomonas chlororaphis* К3.

Описанные на сегодня пути бактериальной деградации ТБМ можно рассмотреть на примере *Pseudomonas* sp. NYZ 42. Этот штамм деградировал ТБМ в процессе кометаболизма, используя две различные стратегии (рисунок). Первый путь был связан с разрывом сульфонилмочевинной связи и образованием двух метаболитов: сахарина (соединение 4, рисунок) и метоксилированного триазина (соединение 3, рисунок). Впервые для бактерий был описан альтернативный путь, связанный с деалкилированием триазинового кольца (соединение 5, рисунок) [4]. Однако, в более ранних работах, посвящённых исследованию физико-химического гидролиза сульфонилмочевинных соединений, описаны те же пути деградации с образованием таких же интермедиатов [1].

В работе мы использовали среду М9 с ТБМ. Гербицид добавляли в среду как кометаболит, либо как единственный источник углерода, либо как единственный источник азота. Варианты без бактерий использовали в качестве контролей. ВЭЖХ анализ образцов показал, что бактерии повышали скорость деградации ТБМ на 60 % относительно контроля только в условиях дефицита азота. Наименьшая скорость деградации наблюдалась в случае кометаболизма. Процесс деградации сопровождался образованием сахарина и триаминамина. Исходя из полученных результатов, мы предположили, что первоначально происходит фото- или химический гидролиз ТБМ с разрывом сульфонилмочевинной связи. А затем штамм *P. chlororaphis* К3 может

утилизировать для роста аминогруппу, высвобождающуюся в процессе циклообразования компонента 2 в сахарин (4, рисунок). Кроме того, бактериям доступна метилированная аминогруппа триазинового остатка.



-1-трибенуронметил; разрыв сульфонилмочевинного мостика (3-триаминамин, 4-сахарин) и деалкилирование (компонент 5)

Рисунок – Пути деградации трибенуронметила штаммом *Pseudomonas* sp. NYZ 42 [4]

Таким образом, *P. chlororaphis* К3 использовал азот в молекуле ТБМ для ростовых процессов. Кроме того, штамм К3 показал способность к росту на триаминамине, добавленном в среду в качестве единственного источника азота. Дальнейшая работа будет посвящена изучению возможности полной минерализации высоко токсичного триаминамина исследуемыми бактериями.

Литература

1. Sarmah, K. Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review / K. Sarmah, J. Sabadie // *J. of agricultural and food chemistry* – 2002. – Vol. 50, №. 22. – P. 6253-6265.
2. Gee K. Recent developments in the chemistry of sulfonylurea herbicides / K. Gee, J. Hay // *Herbicides Inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis*. – Springer, Berlin - Heidelberg – 1994. – P. 15-46.
3. Brown H. Recent advances in sulfonylurea herbicides / H. Brown, J. Cotterman // *Herbicides Inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis*. – Springer, Berlin - Heidelberg – 1994. – P. 47-81.
4. Zhang J. Co-metabolic degradation of tribenuron methyl, a sulfonylurea herbicide, by *Pseudomonas* sp. strain NyZ42 / J. Zhang et al. // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – Vol. 76. – P. 36-40.

Ускорение деструкции нефти различных месторождений с помощью микробного препарата Родобел-ТН

Клишевич Н.Г., Алещенкова З.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: nataliklis@mail.ru

Широкое распространение нефтепродуктов в окружающей среде приводит к загрязнению почвы и воды, что создает серьезную угрозу для всех форм жизни. Одной из наиболее щадящих для окружающей среды технологий ликвидации последствий нефтяного загрязнения является биоремедиация. Углевородоокисляющие микроорганизмы встречаются в окружающей среде повсеместно и могут быть изолированы из загрязненных нефтью почвы и воды. Актуальность выделения из природных сообществ микроорганизмов-деструкторов обоснована необходимостью постоянного совершенствования методов очистки окружающей среды от ксенобиотиков путем создания экологически безопасных технологий [1, 2].

Объектом исследования являлся микробный препарат Родобел-ТН, созданный в Институте микробиологии НАН Беларуси на основе микроорганизмов-деструкторов *Rhodococcus wratislaviensis* Г-13, *Rhodococcus ruber* 1НГ-30П, *Bacillus sp.* 2-4-201N и *Bacillus sp.* 4НГ-ПСД. Цель исследований – оценить эффективность применения микробного препарата для ускорения разложения нефти белорусских и российских месторождений.

С целью изучения эффективности применения микробного препарата Родобел-ТН в условиях загрязнения почвы нефтью был заложен модельный опыт с использованием дерново-подзолистой почвы и 0,1% нефти (белорусской, плотность 0,91 г/см³ и российской, плотность 0,85 г/см³). Определение численности микроорганизмов-деструкторов проводили общепринятыми методами предельных разведений и посева на агаризованную синтетическую среду Е-8 с 0,1% гексадекана [3]. Повторность опыта – трехкратная, продолжительность эксперимента – 4 месяца. Общий титр клеток микроорганизмов-деструкторов в составе микробного препарата Родобел-ТН равнялся $2,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Количественное содержание нефти в почве определяли гравиметрическим методом с экстракцией хлороформом и гексаном.

В результате наблюдений было отмечено варьирование численности микроорганизмов-деструкторов нефти в разные сроки отбора образцов почвы. Численность нефтеокисляющих микроорганизмов до внесения препарата эксперимента не превышала $6,8 \cdot 10^5$ КОЕ/г почвы. На протяжении всего модельного опыта отмечалось постепенное увеличение численности

микроорганизмов-деструкторов. Через 4 месяца численность нефтеокисляющих микроорганизмов в варианте с препаратом Родобел-ТН достигла $0,98 \cdot 10^7$ (с белорусской нефтью) и $1,07 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы (с российской нефтью) соответственно. К концу эксперимента деструкция нефти в контрольных вариантах с белорусской и российской нефтью составила 29,3 и 47,8% соответственно. В аналогичных вариантах с применением микробного препарата Родобел-ТН нефть разрушилась на 60,2 и 77,0% соответственно.

Таким образом, в результате модельного опыта установлено, что интродукция микробного препарата Родобел-ТН в почву, загрязненную нефтью, обеспечивает ускорение ее деструкции. Позитивное влияние препарата на эффективность разрушения российской нефти было выше, чем белорусской, что связано с их различными физико-химическими свойствами.

Литература

1. Иванова, А.Е., Соколова, Д.Ш., Канатъева, А.Ю. Биодegradация углеводов и образование поверхностноактивных соединений ацидофильными микобактериями / А.Е. Иванова, Д.Ш. Соколова, А.Ю. Канатъева // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 300–308.
2. Brzeszcz, J. R-Strategist versus K-Strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils / J. Brzeszcz [et al.] // Intern. Biodeter. & Biodegrad. – 2016. – V. 106. – P. 41–52.
3. Ерошин В.К., Перцовская А.Ф., Скрыбин Г.К. О росте грибов *Mucorales* на парафине // Микробиол. – 1965. – Т. 34, вып. 5. – С. 883–887.

Скрининг микроорганизмов-деструкторов органических веществ с высокой ксеро- и термоустойчивостью, перспективных для очистки коммунально-бытовых сточных вод

Петрова Г.М., Кельник Д.И., Алешкевич И.И., Чирикова М.С., Глушень Е.М.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
электронный адрес: gem@mbio.bas-net.by*

Эффективность биологических очистных сооружений, как городских, так и автономных систем канализаций, напрямую зависит от их окислительной мощности. Для повышения эффективности работы очистных сооружений используют различные препараты. Очистка бытовых стоков при помощи биопрепаратов – это наиболее эффективный, экономически выгодный и экологически безопасный способ. Совершенствование технологий производства и применения биопрепаратов тесно связано с разработкой их новых препаративных форм, способствующих сохранению в течение длительного времени жизнеспособности и функциональной активности входящих в их состав микроорганизмов. Наиболее удачное решение этой задачи – производство микробных препаратов в порошкообразном виде, удобном для хранения, транспортировки и применения, что является одним из основополагающих факторов потребительского спроса.

Целью работы являлось исследование ксеро- и термоустойчивости микроорганизмов-деструкторов органических веществ, присущих коммунально-бытовым сточным водам.

Исследована сохранность жизнеспособности и деструктивной активности клеток 19 микроорганизмов-деструкторов органических веществ после высушивания. Культуральную жидкость исследуемых штаммов предварительно концентрировали методом декантации и центрифугирования до получения пасты. Процесс сушки микроорганизмов проводили в температурном интервале от 35–70°C в течение 12–48 ч до конечной влажности, составляющей не более 10%. Оценку жизнеспособности и сохранности деструктивной активности отобранных штаммов осуществляли путем высева предварительно разведенных в стерильной воде сухих образцов на среду МСА и агаризованную коммунально-бытовую сточную воду. Выявлено, что при температуре 45–55°C наблюдается максимальный процент выживаемости и высокий деструктивный потенциал клеток исследуемых микроорганизмов. Наибольшей ксеро- и термоустойчивостью обладали

штаммы: *Bacillus* sp. K-1, *Rhodococcus ruber* 1НГ, *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus ruber* P1 и *Rhodococcus wratislaviensis* Г13.

В качестве питательных сред для определения уровня накопления биомассы отобранных штаммов использовалась минеральная среда Е-8 с различными источниками углерода, среда Федорова, Мейнелла и питательная среда на основе отходов производства лактоферрина. Среды Федорова и Мейнелла были выбраны нами в связи с тем, что они содержат в качестве источника углерода мелассу, под воздействием которой штаммы активно выделяют экзополисахариды, выполняющие защитную функцию при высушивании клеток микроорганизмов. По уровню накопления биомассы при глубинном культивировании выявлено преимущество сред, содержащих в качестве источника углерода мелассу в концентрациях, не превышающих 10 г/л. При более высоких концентрациях мелассы происходит ингибирование роста исследуемых штаммов. Максимальная биомасса на данных средах отмечена у штаммов родококков P1, 1НГ и 2В и составила не менее 3 г/л АСБ через 48 часов культивирования. Стоит отметить, что среда на основе отходов производства лактоферрина не уступает минеральным средам с добавлением мелассы и обеспечивает высокий уровень накопления клеток у штаммов *Bacillus* sp. K-1, *Rhodococcus wratislaviensis* Г13 и *Rhodococcus ruber* 2В.

Концентрированную биомассу исследуемых микроорганизмов, выращенных на вышеперечисленных средах, подвергали высушиванию при температуре 45–55°C. Результаты определения количества жизнеспособных клеток после высушивания без введения протектора свидетельствуют о том, что исследуемые образцы сопоставимы по чувствительности к воздействию высоких температур. Потеря жизнеспособных клеток составляла от 10 до 30% в зависимости от штамма. Стоит отметить, что выживаемость культур, выращенных на среде, содержащей отходы производства лактоферрина, не отличается от выживаемости культур, выращенных на средах с мелассой. Это связано с тем, что отходы лактоферрина содержат лактозу, которая является общеизвестным протектором для лиофилизации культур.

В процессе хранения сухих культур исследуемых штаммов при комнатной температуре в течение 2 месяцев количество живых клеток уменьшалось не более чем на 2%, что свидетельствует о перспективности использования отобранных штаммов для создания сухой препаративной формы биоактиватора для очистки коммунально-бытовых сточных вод.

Выявление потенциально коррозионных микроорганизмов из проб воды Финского залива

Петрова М.С.¹, Няникова Г.Г.¹, Царовцева И.М.²

¹*Санкт-Петербургский государственный технологический университет (технологический институт), Санкт-Петербург, Россия, электронный адрес: missis-petrowa2012.petrova@yandex.ru*

²*АО «ВНИИ гидротехники им. Б.Е. Веденеева»*

Некоторые микроорганизмы, обитающие в воде и грунте, могут вызывать биоповреждения – прямое или косвенное воздействие живых организмов, которые в результате своей жизнедеятельности влияют на внешний вид и технические свойства материалов. Биоповреждения неорганических строительных материалов приводят к нарушению сцепления составляющих компонентов за счет воздействия минеральных или органических кислот микробного происхождения, бетонные сооружения разрушаются вследствие химических реакций между цементным камнем и продуктами жизнедеятельности микроорганизмов.

В зависимости от условий эксплуатации и применяемых средств защиты скорость коррозии в зоне переменного уровня гидротехнических сооружений может изменяться в широких пределах [1, 2]. На жизнедеятельность микроорганизмов могут оказывать влияние различные факторы: географическое расположение сооружений, уровень кислорода в воде и грунте, температура, соленость, течение и другие [3].

Целью исследования было изучение микробного состава проб воды и грунта, отобранных в Финском заливе вблизи комплекса защитных сооружений (КЗС).

Отбор проб производили в сентябре и декабре 2018 г. Воду отбирали на судопропускном сооружении С-1, а также был произведен смыв с арматуры на водопропускном сооружении В-3.

Для достижения поставленной цели были использованы микробиологические методы выделения и идентификации микроорганизмов. Для выделения накопительных культур и в дальнейшем получения чистых культур были использованы селективные питательные среды: среда Бейеринка – для тионовых (рН 9,2), среда Виноградского – для нитрифицирующих (рН 7,1), среда Захаровой – для железобактерий (рН 6,9), СПА – для аммонифицирующих (рН 7,4). При микроскопировании чистых культур со среды Виноградского и Бейеринка были обнаружены Грам-отрицательные палочки и кокки, расположенные одиночно, попарно или скоплениями, со среды Захаровой – Грам-положительные палочки. Описана морфология

колоний на разных средах. Для железоокисляющих бактерий было установлено отношение к температуре методом выращивания в различном температурном диапазоне (+4°C, +28°C, +45°C), а также отношение к кислороду методом укола в столбики агаризованной среды.

В результате проведенных исследований были описаны морфологические и некоторые физиолого-биохимические признаки выделенных культур. В настоящее время проводятся молекулярно-генетические исследования выделенных чистых культур.

Исследования выполнены в рамках гранта РФФИ, проект № 18-29-05031/18 мк.

Литература

1. Ильичев, В. Д. Экологические основы защиты от биоповреждений / В. Д. Ильичев, Б.В. Бочаров, М. В. Горленко. – М.: Наука, 1985. – 340 с.
2. Маркович, Р. А. Коррозия морских гидротехнических сооружений / Р. А. Маркович, А. В. Коглушкин // Гидротехника. – 2009. – №2. – С. 56–59.
3. Коглушкин, А. В. Влияние природных факторов на скорость коррозии морских ГТС / А.В. Колгушкин, Н. Д. Беляев // Предотвращение аварий зданий и сооружений. – 2009. – С. 216–227.

Лигнинолитические грибы для экологических биотехнологий: теоретические и практические аспекты

Позднякова Н.Н., Баландина С.А., Бондаренкова А.Д., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия, электронный адрес: pozdnyakova_n@ibppm.ru

Детоксикационный потенциал живых организмов лежит в основе технологий биоремедиации и является важным фактором самоочищения природных экосистем. Успешность биоремедиации зависит от целого ряда факторов, наиболее важными из которых являются физико-химические и биологические свойства почвы, типы загрязнителей и их концентрации, биодоступность поллютантов, способность интродуцированных организмов развиваться в почве и деградировать те или иные соединения [1].

Грибы являются одним из важнейших компонентов функционирования и саморегулирования экосистем. Микоремедиация – процесс грибной деградации или трансформации опасных органических соединений в менее токсичные, является простым и недорогим методом биоремедиации, и может быть использована для очистки почвы и поверхности воды, загрязненных промышленными и сельскохозяйственными отходами, нефтью и нефтепродуктами, а также широким рядом ксенобиотиков (<http://www.eoearth.org/article/Mycoremediation>). Ключом к успешному применению микоремедиации является корректный подбор видов грибов, способных утилизировать специфические поллютанты.

Грибы, утилизирующие в природе лигнин и продуцирующие мощную внеклеточную окислительную ферментативную систему, обладают значительным потенциалом для использования в биоремедиационных технологиях, особенно для деструкции соединений, которые трудно разлагаются бактериями [2].

Целый ряд уникальных свойств делает лигнинолитические грибы привлекательными для использования в микоремедиации: (а) широкое распространение в природе; (б) способность к росту на недорогих субстратах, являющихся отходами сельского хозяйства, которые легко могут быть внесены в загрязненную почву; (в) рост распространением гиф, позволяющий им проникать к поллютантам, малодоступным для бактерий; (г) продукция неспецифической окислительной ферментной системы, следствием чего является способность к деградации и минерализации значительного ряда токсичных поллютанов, включая гидрофобные; (д) внеклеточная природа лигнинолитического ферментного комплекса и наличие низкомолекулярных медиаторов, увеличивающих биодоступность поллютантов для этих грибов; (е)

конститутивная природа лигнинолитических ферментов, что предотвращает необходимость адаптации организма; (ж) экспрессия лигнинолитических пероксидаз у ряда грибов в ответ на лимит по источникам питания, который является обычными для почвы [3].

Однако из-за недостаточной изученности этих организмов в приложении к экологическим биотехнологиям их применение все еще ограничено.

На основании предварительного скрининга [4] для моделирования микоремедиации нефтезагрязненной почвы нами был использован штамм *Pleurotus ostreatus* Florida, обладающий высокой деструктивной активностью по отношению к широкому спектру поллютантов и продуцирующий мощную лигнинолитическую ферментную систему. Для получения твердофазного инокулята гриб культивировали на одном из природных субстратов (рисунок, А), который затем интродуцировали в нефтезагрязненную почву (рисунок, Б). *P. ostreatus* Florida, интродуцированный в нефтезагрязненную почву в виде твердофазного инокулята, конкурировал с почвенной микрофлорой, выживал в ней в течение как минимум 3 недель и утилизировал до 60% нефти при стартовой концентрации 22 г/кг, деградация затрагивала все фракции нефти (рисунок, В).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05062.

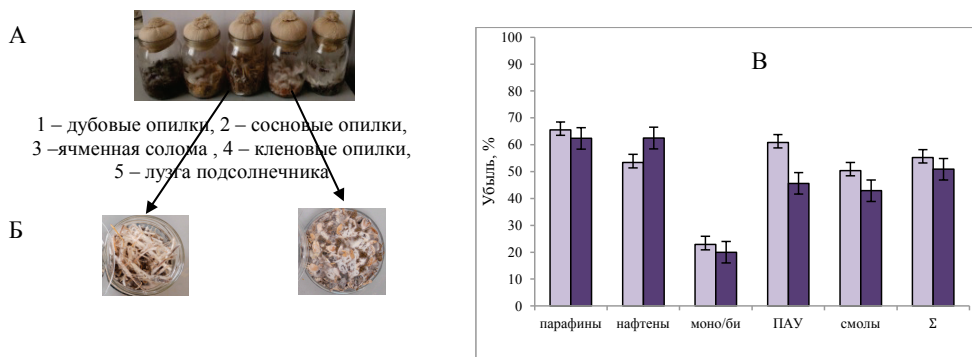


Рисунок – Деградация нефти *P. ostreatus* Florida в модельной системе

Литература

1. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soil / V. Leonardi [et al.] // Int. Biodeter. Biodegr. – 2007. – Vol. 60. – P. 165–170.
2. Wong, D. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes / D. Wong // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2009. – Vol. 157. – P. 174–209.
3. Harms, H. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals / H. Harms, D. Schlosser, L. Wick // Nature Reviews. Microbiol. – 2011. – Vol. 9. – P. 177–192.
4. Promising fungal species for the development of mycoremediation technologies / N. Pozdnyakova [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – submitted.

Дегградация фенола бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

Соляникова И.П.¹, Чернявская М.И.², Титок М.А.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пуццино, Россия

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: titok@bsu.by

Геном бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap содержит генетические детерминанты, определяющие дегградацию широкого спектра органических соединений (в частности, дибензофурана, хлорированных производных бензола, фенола, циклогексана, дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его более токсичного производного 1,1'-дихлор-2,2-бис(п-хлорфенил)этилена (ДДЭ), эфиров фталевой кислоты и др.) [1]. Показано, что данные микроорганизмы способны утилизировать нефть, а также входящие в ее состав углеводороды [1-3]. Указанные свойства позволяют рассматривать данный штамм как перспективный объект экологической биотехнологии.

Целью настоящей работы являлось изучение способности бактерий дегградировать фенол.

Следует отметить, что фенол является крайне токсичным соединением с выраженными мутагенными свойствами. Особую опасность представляет его присутствие в воздухе и воде. Мощными источниками поступления фенола в атмосферный воздух и сточные воды являются нефтедобывающие, коксохимические, металлургические заводы, производство асфальтобетона, машиностроительное производство. Предельно допустимая концентрация фенола в воздухе составляет от 0,03 мг/м³ (жилая зона) до 0,3 мг/ м³ (рабочая зона), а в водоемах не должна превышать 0,001 мг/л.

Для изучения способности бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать фенол их выращивали в жидкой минимальной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода фенол в концентрации 100, 250, 500, 750, 1000 или 1250 мг/л. Эффективность утилизации фенола определяли при его концентрации в среде 100 мг/л согласно методике, приведенной в работе [4].

В результате проведенных экспериментов установлено, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap способны расти при концентрациях фенола от 250 до 1250 мг/л. Следует отметить, что повышение концентрации фенола приводило к увеличению выхода биомассы бактерий и удлинению лаг-фазы. В частности, максимальное увеличение оптической плотности бактериальной культуры от 0,3 до 1,8 фиксировали через 50 ч выращивания в присутствии фенола в концентрации 1250 мг/л. При этом период лаг-фазы увеличивался до 18 ч (при концентрации фенола 250 мг/л период лаг-фазы составлял 3 часа).

При анализе эффективности утилизации фенола (100 мг/л) использовали бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, не адаптированные (т.е. выращивались на полноценной питательной среде) или адаптированные к фенолу (предварительно культивировали в среде с фенолом). В результате было установлено, что адаптированная культура уже через 2 ч культивирования достигала стационарной фазы (лаг-фаза отсутствовала). При этом фиксировали полную деградацию фенола. При отсутствии адаптации для полного удаления фенола из среды требовалось 14 ч (лаг-фаза длилась около 2 ч, в течение которых индуцировались ферменты деградации фенола).

Такая высокая эффективность утилизации фенола объясняется присутствием в геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap генов, определяющих активный синтез ферментов, участвующих в утилизации фенола. В частности выявлен ген (координаты: 4 602 307-4 603 347 п.н.), кодирующий фенолгидроксилазу. Кроме того, в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap выявлено 3 гена (координаты: 2 627 164-2 628 096 п.н., 4 282 536-4 283 441 п.н., 4 865 866 605 п.н.), детерминирующих синтез катехол-1,2-диоксигеназы; один хромосомный (координаты: 4 604 532-4 605 626 п.н.) и один плазмидный гены, обеспечивающие синтез катехол-2,3-диоксигеназы. Присутствие данных детерминант позволяет предполагать, что данные бактерии способны полностью расщеплять фенол через орто- и/или мета-путь утилизации катехола (ключевой промежуточный продукт расщепления фенола) [4].

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что предварительно адаптированные бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap в водной среде способны за 2 ч полностью утилизировать фенол в концентрации 100 мг/л (в 100 000 раз превышает предельно допустимую концентрацию в воде). Полученные данные позволяют использовать данные бактерии для очистки сточных вод от фенола. Присутствие в геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap целого ряда генетических детерминант, продукты которых необходимы для утилизации этого опасного соединения, является основой для изучения механизма его деградации.

Литература

1. Чернявская, М.И. Сравнительная характеристика углеводородокисляющих бактерий различных климатических зон : автореф. дис. ... канд. биол. наук. : 03.02.03 / М.И. Чернявская; Инст-т микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2016. – 23 с.
2. Первичный анализ генома бактерий – деструкторов нефти *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap / М.И. Чернявская [и др.] // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11, Ч. 1. – С. 219–223.
3. Биоразнообразие почвенных углеводородокисляющих бактерий из разных климатических зон / М.И. Чернявская [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 5. – С. 581–594.
4. Разложение фенола штаммом *Rhodococcus opacus* 1G / Е.С. Шумкова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 51–57.

Адсорбционная иммобилизация микроорганизмов-деструкторов формальдегида

Степанян Р.А., Глушень Е.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
электронный адрес: gem@mbio.bas-net.by

Одним из способов повышения эффективности микробной очистки сточных вод является использование иммобилизованных клеток. Существует две основные задачи при разработке биотехнологических методов очистки сточных вод: удаление из сточных вод загрязняющих веществ и очистка воды от микроорганизмов. Иммобилизация микроорганизмов-деструкторов позволяет решить обе [1]. Иммобилизованные клетки сохраняют способность к размножению как непосредственно после иммобилизации, так и после длительного использования в биотехнологическом процессе. При этом кинетические характеристики роста иммобилизованных клеток практически не отличаются от аналогичных характеристик свободных клеток [2].

Цель работы – исследование адсорбционной иммобилизации микроорганизмов-деструкторов формальдегида на искусственных носителях.

Ранее проведенный скрининг активных микроорганизмов-деструкторов формальдегида позволил выявить 4 штамма: *Bacillus* sp. P-7, *Rhodococcus opacus* ФФ 3-1, *Rhodococcus* sp. КР-3 и *Rhodotorula* sp. ВФФ-1. Изучение роста чистых культур микроорганизмов-деструкторов на агаризованной минеральной среде Е-8 с концентрациями токсиканта 0,01 и 0,05 % показало, что увеличение в среде концентрации формальдегида до 0,05% оказывает значительное ингибирующее действие на отобранные штаммы. В связи с этим, нами рассмотрена возможность снижения токсичного влияния высоких концентраций токсиканта на исследуемые штаммы путём их иммобилизации на твердых носителях.

Иммобилизацию клеток микроорганизмов-деструкторов проводили в условиях периодического культивирования в течение 72 часов на орбитальном шейкере при 120 об./мин, температуре 25°C. Отбор проб носителя для определения массы иммобилизовавшихся клеток микроорганизмов проводили через 2, 24 и 72 часа. Образцы высушивали до постоянной массы при температуре 105°C. В качестве носителей для иммобилизации использовали полиамидную нить, полиэтилентерефталат, полипропилен, полиэфирное волокно, а также полистирольное волокно.

Выявлено, что значения мгновенной иммобилизации для штаммов *Rhodococcus opacus* ФФ 3-1 и *Rhodococcus* sp. КР-3 на лавсановом носителе составили 38,6 и 43,1 мг АСБ/г носителя, соответственно. Для культур *Bacillus*

sp. P-7 и *Rhodotorula* sp. ВФФ-1 максимум иммобилизованной биомассы на лавсане за аналогичный период времени составил 38,9 и 36,9 мг АСБ / г носителя.

Максимальное развитие биопленки через 24 часа культивирования было отмечено у культуры *Rhodococcus opacus* ФФ 3-1 на лавсановом носителе и составило 92,5 мг/г носителя. Следует отметить, что полиэтилентерефталат (лавсан) оказался предпочтительным для всех культур в качестве носителя для иммобилизации, что наиболее ярко проявлялось на 24 и 72 час исследования. Исключение составила культура *Bacillus* sp. P-7, максимальное количество биомассы которой иммобилизовалось на полипропиленовом волокне «Фиброил» через 72 часа культивирования (119,3 мг/г носителя).

На основании полученных данных по изучению адгезивных свойств установлено, что все исследуемые штаммы обладают высокой иммобилизационной способностью на волокнистых носителях. В качестве носителя для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов формальдегида – штаммов *Rhodococcus opacus* ФФ 3-1, *Rhodococcus* sp. КР-3 и *Rhodotorula* sp. ВФФ-1, предпочтительно использование лавсанового волокна, а для культуры *Bacillus* sp. P-7 – полипропиленовое волокно.

Проверку деструктивной активности свободными и иммобилизованными клетками исследуемых штаммов проводили путем периодического культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, на шейкере-инкубаторе со скоростью вращения 160 об/мин и температурой 30°C в течение 48 ч. Для культивирования использовали минеральную среду Е-8 с добавлением 0,05 и 0,1% формальдегида в качестве единственного источника углерода. Концентрацию формальдегида определяли одновременно фотометрическим и хроматографическим методами согласно ГОСТ Р 55227-2012 [3].

Исследование деструктивной активности культур, иммобилизованных на полиэтилентерефталате, свидетельствует о повышении потенциала и скорости деструкции при их иммобилизации на волокнистом носителе. В среднем, скорость деструкции токсикантов иммобилизованными бактериальными клетками родококков и дрожжевой культурой ВФФ-1 возрастает в 1,5-2,0 и 0,7-1,2 раза, соответственно. Иммобилизация штамма *Bacillus* sp. P-7 на полипропиленовом волокне позволяет увеличить эффективность очистки водных растворов от формальдегида минимум в 1,4 раза.

Литература

1. Белова, Д.Д. Подбор носителей и параметров иммобилизации консорциума микроорганизмов-деструкторов фосфатов / Д.Д. Белова // Вестник КрасГАУ. – Красноярск, 2018. – С. 294–299.

2. Ефременко, Е.Н.. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: автореф. дис.... д-ра. биол. наук : 03.00.02 / Е.Н. Ефременко ; Ин-т. биохим. физики им. Н.М. Эмануэля РАН. – Москва, 2009. – 53 с.
3. Методы определения содержания формальдегида : ГОСТ Р 55227-2012 ; введ. 01.01.2014. – М.: Стандартиформ, 2013. – 24 с.

Выделение и изучение микроорганизмов-деструкторов о-ксилола

Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н.

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан, электронный адрес: elmira_f@mail.ru, ecomicrolab@gmail.com

Одними из распространенных загрязнителей окружающей среды являются ароматические углеводороды, такие как бензол, толуол, этилбензол и ксилол (БТЭК). Они широко используются в качестве растворителей и сырья для производства пестицидов, пластмасс, синтетических волокон, красок и фармацевтических препаратов [1]. Эти углеводороды являются основными ароматическими компонентами многих нефтепродуктов и встречаются как загрязняющие вещества в почве и грунтовых водах, что создает серьезную угрозу для здоровья населения, поскольку обладают токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами [2]. В связи с этим, они стали объектом всесторонних исследований. Актуальным направлением среди них является микробиологическая деградация этих соединений. Микробная биотрансформация является основным экологическим процессом, влияющим на судьбу ароматических углеводородов в наземных и водных экосистемах [3]. Кроме того, биологические способы очистки природной среды наиболее безопасны, эффективны и менее затратны по сравнению с методами химической и физической очистки [4]. В связи с этим, важным является поиск активных штаммов микроорганизмов – деструкторов ароматических углеводородов, обитающих в определенных эколого-географических условиях.

Целью исследования было выделение и изучение микроорганизмов, способных трансформировать о-ксилол.

Выделение микроорганизмов – деструкторов ароматических углеводородов проводили методом накопительных культур. Содержание о-ксилола определяли методом парофазного анализа в сочетании с газовой хроматографией на газовом хроматографе Agilent 7890 (США) с помощью плазменно-ионизационного детектора.

Из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана методом накопительных культур на различных ароматических углеводородах было выделено 118 изолятов. В результате предварительного скрининга было отобрано 49 культур, хорошо растущих на агаризованной минеральной среде в парах о-ксилола. Изучен рост отобранных культур углеводородокисляющих микроорганизмов на этом субстрате. В жидкой минеральной среде с о-ксилолом хорошо росли 19 культур, биомасса которых возрастала в 2-3 раза за 2 суток. Установлено, что за первые 6 ч культивирования три штамма уже утилизировали 43,7-57,3%

субстрата (см. рисунок). В последующие 12 ч они также показали наибольшую активность. Далее потребление ксилола замедлялось и к 48 ч в среде оставалось 12,3-21,0% субстрата. У остальных штаммов более эффективно деструкция о-ксилола наблюдалась через сутки культивирования и к 48 ч составила 79,0-98,6%. Естественная убыль субстрата составила 2,3% за 48 ч.

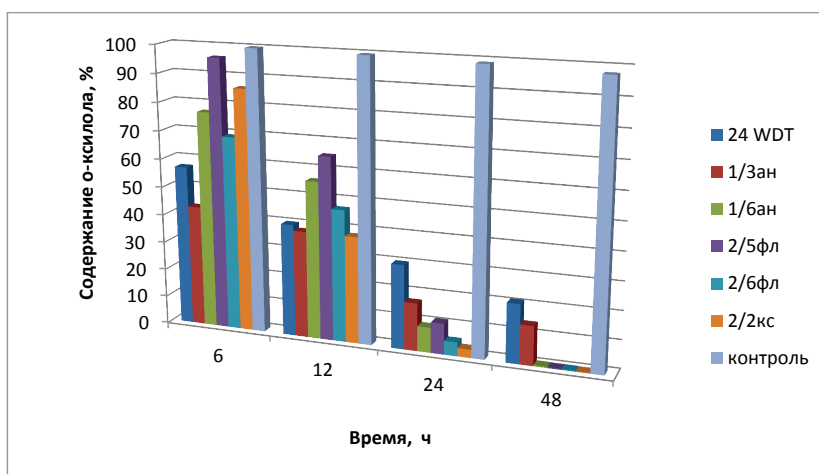


Рисунок – Динамика убыли о-ксилола под воздействием отобранных культур

Молекулярно-генетическая идентификация показала, что выделенные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов были представлены родами *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pusillimonas*, *Rhodococcus*.

Таким образом, в результате проведенных исследований отобрано 9 наиболее активных культур, перспективных для разработки биопрепаратов, используемых при очистке экосистем, загрязненных углеводородами.

Литература

1. Li J., Dong Sh., Shim H. Cometabolism of CAHs while growing on BTEX in soil slurry // *Advanced Materials Research*. – 2013. – Vol. 807-809. – P. 1662–1665.
2. Morlett-Chávez J.A., Ascacio-Martínez J.Á., Rivas-Estilla A.M., Velázquez-Vadillo J.F., Haskins W.E., Barrera-Saldaña H.A., Acuña-Askar K. Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2010. – Vol. 64. – P. 581–587.
3. Brzeszcz J., Kaszycki P. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility // *Biodegradation*. – 2018. – Vol. 29. – P. 359–407.
4. Kadri T., Rouissi T., Brar S.K., Cleon M. Sarma S., Verma M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review // *Journal of environmental sciences*. – 2017. – Vol. 51. – P. 52–74.

Скрининг микроорганизмов-деструкторов наиболее распространенных растворителей лакокрасочного производства

Чирикова М.С., Петрова Г.М., Глушень Е.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
электронный адрес: margarita.chirikova@mail.ru

Производство лакокрасочных материалов и их применение является одним из крупных источников загрязнения окружающей среды: 5-10% общего количества промышленных загрязнений приходится на лакокрасочную промышленность. Наиболее существенная проблема производства и применения лакокрасочных материалов – очистка сточных вод, которые относятся к высококонцентрированным и, по природе химических соединений, к трудно очищаемым физико-химическими методами. В последние годы все более широкое распространение получил метод интенсификации очистки сточных вод, основанный на внесении в очистные сооружения бактериальных культур, прошедших селекцию и предварительную адаптацию к основным загрязнителям сточных вод лакокрасочных производств [1-3].

Цель настоящего исследования – скрининг высокоактивных штаммов микроорганизмов-деструкторов наиболее распространенных растворителей лакокрасочного производства, в частности кетонов, аренов и спиртов.

Скрининг микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков проводили среди коллекционного фонда лаборатории природоохранных биотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси. Микроорганизмы высевали на плотную синтетическую среду Е-8, содержащую пропанол, бутанол, ацетон и бензол в концентрациях 1% и 5%. В качестве контроля использовали минеральную среду Е-8, не содержащую ксенобиотики, с целью исключения агаролитических культур. Рост культур оценивали ауксанографически.

Микроорганизмы из лабораторной коллекции, отобранные для исследования, представлены микроорганизмами, относящимися к пяти таксономическим группам: *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Sarcina* и *Azotobacter*. Подавляющее большинство принадлежит к роду *Rhodococcus* (61,3%). Микроорганизмы рода *Bacillus* составили 29,1%, а родов *Gordonia*, *Sarcina* и *Azotobacter* – по 3,2%.

В результате проведенных исследований установлено, что бензол и ацетон являются более предпочтительными субстратами для роста отобранных культур. Способность использовать бензол в концентрации 1% в качестве единственного источника углерода выявлена у 31 культуры, а ацетон – у 30. Следует отметить, что активный рост на среде с бензолом отмечался у 15, а на

среде с ацетоном – у 6 бактерий. Увеличение концентрации токсикантов до 5% не отразилось ни на количестве штаммов, способных утилизировать исследуемые ксенобиотики, ни на их активности роста, что свидетельствует о высоком деструктивном потенциале данных штаммов. Исключение составил штамм *Rhodococcus ruber* 2В – высокие концентрации ацетона способствовали увеличению его окислительной активности, что проявлялось в более активном росте на среде, содержащей токсикант в концентрации 5%, а не 1%. Уникальной, на наш взгляд, оказалась и культура *Rhodococcus ruber* H2004 – уже на третьи сутки на всех концентрациях бензола отмечался хороший рост, что несвойственно для родококков. Данная способность может быть использована в технологиях очистки производственных сточных вод с целью быстрого старта процесса деструкции ксенобиотика.

Скорость роста микроорганизмов на селективных средах с использованием спиртов в качестве единственного источника углерода зависела от концентрации токсикантов. Так, в присутствии 1%-го пропилового спирта способность к росту проявили 30 культур, из которых 12 являлись активными деструкторами данного соединения. Увеличение концентрации ксенобиотика снижало численность микроорганизмов, способных использовать пропанол, до 16 штаммов. И только 3 штамма – *Rhodococcus erythropolis* 87ф, *Rhodococcus erythropolis* 5Д *Rhodococcus erythropolis* 14Д – проявили активный рост на селективной среде с высокой концентрацией токсиканта.

С бутанолом наблюдалась аналогичная ситуация. Рост на среде, содержащей 1%-ый бутанол, отмечен у 25 штаммов родов *Rhodococcus* и *Gordonia*, из которых 12 культур проявили высокую активность роста. Увеличение концентрации бутилового спирта в ростовой среде до 5% приводило к значительному сокращению количества растущих на ней микроорганизмов-деструкторов до 6 культур, из которых 2 штамма – *Gordonia amicalis* 88ф и *Rhodococcus erythropolis* 87ф, проявили средний и обильный рост, соответственно.

Таким образом, предварительный скрининг музейных штаммов позволил отобрать для дальнейших исследований наиболее перспективные микроорганизмы-деструкторы пропанола, бутанола, ацетона и бензола – наиболее широко используемых растворителей в лакокрасочном производстве.

Литература

1. Degradation of nitrocellulose – based paint by *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 1354 / L. Giacomucci // Biodegradation. – 2012. – Vol. 23. – P. 705–716.
2. Biodegradation of polyurethane: a review / G.T. Howard // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2002. – Vol. 49. – P. 245–252.
3. Kurowski, G. Paint-degrading microorganisms / G. Kurowski, O. Vogt, J. Ogonowski // Technical Transactions. – 2017. – Vol. 12. – P. 81-92.

Развитие нитчатых микроорганизмов в аэротенках городских очистных сооружений канализации

Юхневич Г.Г., Мурина Д.А.

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь,
электронный адрес: guhnev@grsu.by*

В нормально функционирующем активном иле аэротенков городских очистных сооружений канализации практически постоянно присутствуют нитчатые организмы. Они чрезвычайно устойчивы к разнообразным неблагоприятным факторам (токсикантам, недостатку кислорода, дисбалансу питательных веществ, температуре, рН и др.) [1, 2]. При превышении порога стрессирующего антропогенного воздействия численность флокулообразующих бактерий активного ила сокращается до минимума, а более устойчивые к неблагоприятным факторам нитчатые организмы занимают их экологическую нишу. Развитие нитчатых микроорганизмов сильно ограничивает гидравлический потенциал вторичного отстойника и может привести к выходу активного ила в природную среду [3]. Выявление способов предупреждения развития нитчатого вспухания путем изменения технологических режимов аэротенков делает данную работу актуальной.

Цель работы – изучить изменение численности и размеров нитчатых микроорганизмов при циркуляции ила в аэротенках городских очистных сооружений канализации.

В аэротенке 2 очистных сооружений канализации г. Гродно внедрена технология глубокого удаления биогенных элементов с созданием аэробных и анаэробных зон. В них обеспечивается чередование аэробных зон с мелкопузырчатой придонной аэрацией через дисковые диффузоры с аноксидной зоной с горизонтальными погружными мешалками (во второй половине 1-го коридора и 2-м коридоре). Для исследования отбирали пробы иловой смеси в трех зонах аэротенка 2 с разным режимом аэрации.

Из каждой пробы иловой смеси объемом 0,1 см³ готовили препараты «раздавленная капля» в 3-х повторностях, в которых устанавливали длину нитчатых микроорганизмов с помощью окулярного микрометра [4]. Нитчатые микроорганизмы ранжировали по группам: 0–50 мкм, 51–100 мкм, 101–150 мкм, 151–200 мкм, 201–250 мкм, 251–300 мкм, 301–350 мкм.

Численность нитчатых микроорганизмов аэротенка 2 очистных сооружений канализации г. Гродно находилась в диапазоне от 21328 до 65842 экз/см³ и, как правило, уменьшалась к выходу из аэротенка (таблица). Корреляционный анализ показал наличие прямой тесной зависимости между численностью нитчатых микроорганизмов и иловым индексом ($r=0,77$).

Таблица – Изменение численности нитчатых микроорганизмов аэротенка 2, экз/см³

Пробы	1 коридор (начало)	3 коридор (начало)	4 коридор (конец)
1	21328±1208	50160±2516	41218±2865
2	74505±1753	54712±2408	31692±1271
3	49852±1022	42412±2742	60762±3820
4	28564±1478	48931±2648	39751±1487
5	58942±1258	52461±2147	34108±2148
6	65842±1364	51784±2014	59713±2984
Среднее	51505±1347	50910±2412	44540±2429

Размер особей нитчатых микроорганизмов активного ила аэротенка колебался от 64 мкм до 330 мкм. Наибольшее количество микроорганизмов с нитчатой структурой находилось в диапазоне 0–50 мкм. Их встречаемость составляла в начале первого коридора до 75% экземпляров, в третьем коридоре (после аноксидной зоны) – до 68%, в конце четвертого коридора – до 64%. По длине аэротенка количество нитчатых микроорганизмов с длиной 101–150 мкм уменьшалось, а с длиной 51–100 мкм увеличивалось.

Таким образом, основной причиной нарушения разделения иловой смеси на городских очистных сооружениях канализации является развитие нитчатых микроорганизмов. Выделение аноксидной зоны в аэротенках способствует не только снижению концентраций нитратов, но и уменьшению численности нитчатых микроорганизмов, формированию более компактных, легко оседающих хлопьев активного ила, что способствует лучшему разделению иловой смеси во вторичных отстойниках.

Литература.

1. Jenkins, D. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems / D. Jenkins, M.G. Richard, G.T. Daigger. – 3rd edition. – LEWIS PUBLISHERS, 2003. – 260 p.
2. Юхневич, Г.Г Развитие нитчатых микроорганизмов в активном иле аэротенков городских очистных сооружений / Г. Г. Юхневич, В. А. Кирей // Международный молодежный научный экологический форум «Экобалтика» : сборник трудов. – Гродно: Игд-во ГГАУ, 2017. – С. 134–141.
3. Колесников, В. П. Современное развитие технологических процессов очистки сточных вод в комбинированных сооружениях / В. П. Колесников, Е. В. Вильсон. – Ростов-на-Дону : Изд-во «Юг», 2005. – 212 с.
4. Жмур, Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н. С. Жмур. – М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Abilchadirov A.S., 13
Abisheva G.Zh., 13
Abitaeva G.K., 13
Abzhalelov A.B., 13

В

Bissenova G.N., 13

С

Сакович В.В., 244

Н

Hubchuk K., 202, 204

К

Kastsianevich A., 202, 204
Keyer V.V., 72, 73
Khroustalyova G., 206
Kruma I., 206

Р

Puke M., 206

Р

Ramankulov Y.M., 72, 73
Rapoport A., 206
Rozenfelde L., 206

С

Sarmurzina Z.S., 13
Shevtsov A.B., 72, 73
Shustov A.V., 72, 73
Syzdykova L.R., 73

Т

Текебаева Zh.B., 13

U

Urazova M.S., 13

V

Vedernikov N., 206

Z

Zala D., 206

А

Абельденов С.К., 160, 193
Абуталипов Д.Б., 193
Айткельдиева С.А., 249, 272
Актаева С.А., 123
Акулова Н.И., 158
Акылова М.А., 112
Алешкевич И.И., 247, 261
Алещенкова З.М., 251, 259
Ананьева И.Н., 251
Андрусевич А.С., 155
Арашкова А.А., 207
Артемьева Ю.Н., 213
Асатурова А.М., 195
Асафов В.А., 220
Атавлиева С.Ш., 38
Ауэзова О.Н., 249, 272

Б

Бабицкая М.А., 151, 153
Байгонусова Ж.А., 97
Баландина С.А., 265
Балгимбаева А.С., 209, 238
Балтин К.К., 123
Баневская К.Г., 124
Баранов О.Ю., 40
Барейко А.А., 127
Бельская А.И., 240
Бельская И.В., 90
Белявцева К.В., 14
Бенько А.Н., 52
Бережная А.В., 129, 131
Березин В.Э., 238
Бесараб Н.В., 16
Биричевская Л.Л., 211, 213
Бирюк Е.Н., 133
Богдан В.К., 187, 216
Бойко С.В., 191
Болотник Е.В., 149

Бондаренкова А.Д., 265
Бордок И.В., 225
Борщевская Л.Н., 74, 82, 95
Бражникова Е.В., 136
Буйницкая С.В., 46, 116
Букляревич А.А., 18, 61
Буко А.И., 24, 76
Булатовский А.Б., 93, 99, 218
Бурдь В.Н., 228
Бурыгин Г.Л., 138
Бусла А.П., 240

В

Валентович Л.Н., 18, 32, 46, 59, 66,
103, 105, 107, 116, 127
Василевская М.Е., 101
Василенко С.Л., 167, 180
Велчу А.И., 187, 216
Веремеенко Е.Г., 101
Винтер М.А., 211
Волотович О.А., 140
Волоханович А.А., 165
Воронин С.П., 82
Вохидова Н., 255

Г

Галимбаева Р.Ш., 209
Гапонова И.И., 149, 199
Герасимович А.Д., 79
Герловский Д.О., 21
Гирилович Н.И., 140, 176
Гласкович А.А., 143
Гласкович М.А., 145
Гласкович С.А., 147
Глинкина Т.В., 42, 230
Глушень Е.М., 247, 261, 269, 274
Головач О.С., 151, 153
Головач Т.Н., 220
Головнева Н.А., 24, 44, 76, 155
Голомидова А.К., 35
Горбунова Т.И., 253
Гордеева Т.Л., 74, 82, 95
Гуринович А.С., 26, 28

Д

Давыдовская А.М., 69
Демешко О.Д., 84, 240
Дьяконова А.Т., 30

Е

Евграфова Е.С., 48
Евдокимова О.В., 32
Евенкова-Чернецова К.И., 251
Евтушенков А.Н., 16, 50
Егорова Д.О., 253
Еримханқызы Г., 193
Ерхова Л.В., 199
Есіркепұлы М., 209
Ефимов А.Д., 35

Ж

Жабанос Н.К., 151, 153, 167, 180, 189
Жебрак И.С., 174, 236
Жерносеков Д.Д., 244
Жолдыбаева Е.В., 38
Жуковская Л.А., 240
Жураева Р.Н., 255

З

Зайнидинова Л.И., 255
Зайнитдинова Л.И., 88
Заинчковская А.Н., 86
Зинченко А.И., 84, 90, 92, 93, 99, 114,
211, 213, 218, 223

И

Ибрагимова Л.Н., 209
Иванько М.В., 153
Игнатова Л.В., 136
Изотова Е.Д., 48

К

Казловский И.С., 84, 90, 92, 93, 99, 114,
218
Калинина А.Н., 74, 82, 95
Калмыкова Г.В., 158
Камельчук Я.С., 40
Каминская О.С., 234
Кантор К.В., 54, 178
Каргаполова К.Ю., 138
Каширская М.Д., 82
Кельник Д.И., 261
Кириллов С.О., 160, 193
Климовцова И.А., 76
Клишевич Н.Г., 259
Коваленко С.А., 225
Ковзунова О.В., 225

Кожаметова С.С., 38
Козьячая Т.И., 228
Коломиец Э.И., 54, 127, 129, 131, 140,
165, 170, 176, 178, 197
Комаровская Я.В., 228
Кособуцкая О.Н., 207
Костюк С.А., 42, 52, 230
Котова И.Б., 30
Кравченко Н.С., 180
Круль Л.П., 76
Крученок Т.В., 180
Крючкова Е.В., 257
Кугач А.А., 66
Кудряшов В.Л., 162
Куканова С.И., 255
Куликов Е.Е., 35
Кулиш С.А., 120, 124, 199
Кулмагамбетов И.Р., 238
Купцов В.Н., 127, 165, 197
Курманбаев А.А., 97
Курченко В.П., 220
Кутюн Е.Л., 18

Л

Лагодич А.В., 69
Лагоненко А.Л., 16, 50
Ладысюк В.А., 99
Лапец А.Е., 69
Левданская А.И., 101
Лемеза Д.А., 92
Летаров А.В., 35
Летунович Е.А., 207
Ли П.К., 160
Литвинко Н.М., 21
Лобан Е.Н., 170
Лобанова И.В., 255

М

Мазурек Б.Г., 174
Макаревич О.В., 149, 199
Максимова Н.П., 101
Мандрик-Литвинкович М.Н., 140, 165,
176, 197
Мантоптин А., 187
Маркевич Р.М., 232
Масленникова С.Н., 172
Мильчанин О.В., 16
Мистейко М.М., 155
Михайлопуло И.А., 211, 213
Михаленок Е.В., 240
Михалюк А.Н., 178
Морозова А.Н., 24, 44

Моховиков М.А., 16
Муканов К.К., 160
Мукашева Т.Д., 136
Мурат А.У., 193
Муратова А.А., 103
Муратова А.Ю., 257
Мурина Д.А., 276
Мусахметов А.С., 193
Мямин В.Е., 64

Н

Надеева Г.В., 48
Наумович Н.И., 251
Нелюбина Е.В., 234
Нестеров А.Г., 143
Новик Г.И., 79
Нугманова Р.Е., 38
Няникова Г.Г., 263

О

Одинцов Д.В., 143
Орловская П.И., 176
Охремчук А.Э., 18, 46, 93
Охремчук Е.В., 46

П

Первова М.Г., 253
Песоцкая К.Ю., 50
Петрова Г.М., 247, 261, 274
Петрова М.С., 263
Пилипенко Н.Н., 105
Пилипчук Т.А., 127, 140
Пирогов К.В., 207
Позднякова Н.Н., 265
Поликсенова В.Д., 109
Полуян О.С., 52, 230
Попова И.В., 107
Прищепа Л.И., 167
Проскурнина И.А., 54, 170, 178
Пушкарская О.В., 236

Р

Раманкулов Е.М., 38, 160
Романова Л.В., 149, 155, 199
Романович Н.С., 180
Романович Р.В., 220
Романовская Т.В., 131, 170, 178
Руденкова Т.В., 230
Рябая Н.Е., 24

С

Савельева Т.А., 189
Саданов А.К., 182, 185, 238
Самарцев А.А., 24
Сапунова Л.И., 120, 124, 199, 234
Сафонова М.Е., 24
Сафронова Г.В., 251
Сацункевич Н.А., 28
Сверчкова Н.В., 178
Семашко Т.В., 57, 84, 240
Сивец Г.Г., 211, 213
Сидоренко А.В., 14, 46, 127, 197
Сидорова Т.М., 195
Сиколенко М.А., 59
Сикор А.Н., 242
Силаев Д.В., 160
Смирский В.В., 230
Синеокий С.П., 74, 82, 95
Смирнова И.Э., 182, 185
Смоляк Т.М., 153
Соколова С.В., 118
Соляникова И.П., 267
Спанкулова Г.А., 249
Степанян Р.А., 269
Стрельченя И.И., 155
Строкова В.Н., 187
Струтинский Ф.А., 187
Султанова А., 112
Султанова А.Ж., 209
Сыздыков Т.А., 38

Т

Тактарова Ю.В., 30
Тамкович И.О., 234
Танькова Н.Л., 220
Тарасюк О.А., 228
Тарашкевич Ю.С., 133
Тарлыков П.В., 38
Татаркина Л.Г., 249, 272
Тимошко М.А., 187, 216
Титова О.А., 189
Титок М.А., 18, 26, 28, 61, 66, 127, 267
Ткаченко О.В., 138
Треножникова Л.П., 209, 238
Трепашко Л.И., 191
Тригубович А.М., 64, 207
Тугелбай Г.Е., 209
Тургимбаева А.М., 193
Турковская О.В., 257, 265
Турлыбаева З.Ж., 112, 209

У

Урбанчик Е.Н., 234

Ф

Файзулина Э.Р., 249, 272
Федоров А.С., 74
Федюшко И.А., 109
Фурик Н.Н., 133, 151, 153, 167, 180, 189

Х

Харитонов В.Д., 220
Хасенов Б.Б., 123, 160, 193
Хасенова А.Х., 112
Хмелевская К.С., 114
Хожаева Г.С., 38
Хомяк А.И., 195
Храмцова Е.А., 86

Ц

Царовцева И.М., 263

Ч

Чеботарёв Л.Ю., 93
Чердынцева Т.А., 30
Чернявская М.И., 18, 66, 267
Чешкова А.Ф., 158
Чирикова М.С., 261, 274
Чокинэ М., 187

Ш

Шавела Ю.В., 116
Шамцяи М.М., 118
Шляхотко Е.А., 120, 234
Шмыга Е.Ю., 14, 197
Шонина М.Ю., 69
Шорабаев Е.Ж., 185

Щ

Щетко В.А., 24, 149, 199

Ю

Юхневич Г.Г., 228, 242, 276

Я

Якимович Л.В., 232

Научное издание

**МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

**Материалы
XI Международной научной конференции
(Минск, 3–6 июня 2019 г.)**

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Л. Н. Валентович*
Художественный редактор *В. В. Домненков*
Технический редактор *О. А. Толстая*
Компьютерная верстка *Л. Н. Валентович, П. В. Тумилович*

Подписано в печать 28.05.2019. Формат 70 × 100 ¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 23,08. Уч.-изд. л. 21,0. Тираж 150 экз.
Заказ 128.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом
«Беларуская навука». Свидетельства о государственной регистрации
издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18
от 02.08.2013, № 2/196 от 05.04.2017. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.