



МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

**Тезисы докладов
IX Международной научной конференции,
посвященной 50-летию создания
Института микробиологии НАН Беларуси**

(Минск, 7—11 сентября 2015 г.)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Отделение биологических наук
ГНПО «Химический синтез и биотехнологии»
Институт микробиологии
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГОВ

МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Тезисы докладов
IX Международной научной конференции,
посвященной 50-летию создания
Института микробиологии НАН Беларуси

(Минск, 7–11 сентября 2015 г.)

Минск
«Беларуская навука»
2015

УДК 606:579.6(043.2)

ББК 30.16я43

M59

Организационный комитет конференции:

Э. И. Коломиец (председатель), А. Г. Лобанок (заместитель председателя),
А. В. Кильчевский, С. В. Сорока, А. М. Боронин, В. Г. Дебабов, И. Б. Ившина,
В. Д. Надыкта, В. С. Подгорский, И. А. Тихонович, Э. А. Садо́мов

M59

Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. IX Междунар. науч. конф. (Минск, 7–11 сент. 2015 г.). – Минск : Беларуская навука, 2015. – 192 с.

ISBN 978-985-08-1902-4.

В сборнике представлены тезисы докладов и выступлений участников IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» по следующим направлениям: микробный синтез биологически активных соединений, генно-инженерное конструирование микроорганизмов, коллекции микроорганизмов; биотехнологии для сельского хозяйства; биотехнологии для медицины и промышленности; биотехнологии для контроля окружающей среды.

УДК 606:579.6(043.2)

ББК 30.16я43

ISBN 978-985-08-1902-4

© Институт микробиологии
НАН Беларуси, 2015
© Оформление.
РУП «Издательский дом
«Беларуская навука», 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Секция 1: Микробный синтез биологически активных соединений. Генно-инженерное конструирование микроорганизмов. Коллекции микроорганизмов.	10
ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ХРАНЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ	
Абжалелов А.Б., Закарья К.Д., Ескараева А.А.	11
SYNTHESIS OF FLUORINATED NUCLEOSIDES USING RECOMBINANT NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES	
Beresnev A.I., Kvach S.V., Eroshevskaya L.A., Sivets G.G., Zinchenko A.I.	14
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, КОДИРУЮЩИХ СИНТЕЗ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У БАКТЕРИЙ РОДА <i>BACILLUS</i>	
Бережная А.В., Титок М.А., Коломиец Э.И.	16
КОЛЛЕКЦИЯ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ОБЪЕКТ НАЦИОНАЛЬНОГО ДОСТОЯНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ	
Бордок И.В., Охлопкова Н.П., Евтушенко Л.В., Лубянова В.М., Назарова О.М.	18
ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОНСОРЦИУМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ	
Головнева Н.А., Щетко В.А., Рябая Н.Е., Найденко И.А.	20
СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЗАХСТАНЕ	
Джакибаева Г.Т.	22
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF WOOD-ROTTING BASIDIOMYCETES	
Elisashvili V.I., Asatiani M.D., Kachlishvili E.T., Khardziani T.Sh., Metreveli E.M., Kobakhidze A., Berikashvili V., Jokharidze T.	24
КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	
Казловский И.С., Радевич Д.С., Рышко А.Н., Квач С.В., Зинченко А.И.	26
ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПОСЛЕ ЛИОФИЛЬНОГО ВЫСУШИВАНИЯ	
Кебекбаева К.М., Джакибаева Г.Т., Алимбетова А.В.	28

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК В КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ <i>CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM</i> Кирпичёва Т.Е., Литвинович Н.Е., Болотник Е.В., Коломиец Э.И., Титок М.А.	30
СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ ДЕРМАТОМИЦЕТОВ, ЦЕННЫХ В ДИАГНОСТИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ Кухар Е.В.	33
ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> БИМ F-578 Г Мороз И.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г., Капустина Ю.М.	36
ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA TOWARDS PATHOGENIC MICROORGANISMS Naidenko I.A., Denisenko V.V., Safonova M.E.	38
МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ ШТАММОВ <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> Плотникова Д.Т., Сидоренко А.В., Новик Г.И.	40
СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> , СЛИТОГО С ГЕНАМИ БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ Радевич Д.С., Рышко А.Н., Казловский И.С., Квач С.В., Зинченко А.И.	42
РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРМОПРОИЗВОДСТВА НА БАЗЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ НИЗШИХ ГРИБОВ РОДА <i>PENICILLIUM</i> Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Чекушина А.В., Рубцова Е.А., Зоров И.Н., Матыс В.Ю., Немашкалов В.А., Синецын А.П.	44
ОСОБЕННОСТИ РОСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР В СОСТАВЕ ПОЛИВИДОВОГО КОНСОРЦИУМА Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А., Грель М.В.	46
ПОЛИМОРФИЗМ <i>NOD</i> И <i>BET</i> ГРУПП ГЕНОВ У ШТАММОВ <i>SINORHIZOBIUM MELILOTI</i> Саксаганская А.С., Субботина А.Р., Черкасова М.Е., Мунтян В.С., Румянцева М.Л.	48
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА 16S рРНК В ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА <i>PSEUDOMONAS</i> Савич В.В.	50
АНАЛИЗ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БАКТЕРИЙ РОДА <i>BACILLUS</i> , РЕГУЛИРУЕМЫХ СТРЕСС-ФАКТОРАМИ Сацункевич Н.Е., Муратова А.А., Титок М.А.	52
ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОДЕГРАДАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ Сидоренко А.В., Чернявская М.И., Титок М.А., Глушень Е.М., Самсонова А.С., Новик Г.И., Синецкий С.П.	54
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЦИАНОБАКТЕРИЙ ИЗ ВОДОЕМОВ БЕЛАРУСИ Тихонова И.В., Михеева Т.М., Кузьмин А.В., Сороковикова Е.Г., Ивачева М.С., Белых О.И.	57
МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ Фальковская У.В., Сидоренко А.В., Новик Г.И.	59

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕХНИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДАМИ СЕЛЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУТАГЕНЕЗА И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ Цурикова Н.В., Костылева Е.В., Середа А.С., Смирнова И.А., Нефедова Л.И., Веселкина Т.Н., Поляков В.А., Рожкова А.М., Сеницын А.П.	61
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ХАРПИНОВ Чеботарёв Л.Ю., Валентович Л.Н.	63
ІДЭНТЫФІКАЦЫЯ ВУГЛЕВАДАРОДАКІСЛЯЮЧЫХ БАКТЭРЫЙ З ГЕАГРАФІЧНА АДДАЛЕННЫХ РЭГІЁНАЎ Чарняўская М.І., Ціток М.А.	66
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХИМОЗИН Чубанова С.В., Валентович Л.Н.	68
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА <i>PENICILLIUM</i> И <i>ASPERGILLUS</i> Шемшур О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н.	71
СВОЙСТВА α -АМИЛАЗЫ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> SUBSP. <i>AMYLOLIQUEFACIENS</i> Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Кулиш С.А., Лобанок А.Г., Тамкович И.О., Гайдук А.С., Бурвель Д.Д.	73
КОЛЛЕКЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР РИЗОБИЙ СОИ РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА Якименко М.В., Бегун С.А.	75
Секция 2: Биотехнологии для сельского хозяйства.....	77
ПРИМЕНЕНИЕ АРБУСКУЛЯРНЫХ МИКОРИЗ В ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ СОИ Абдурашитов С.Ф., Волкогон В.В.	78
ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ С УВЕЛИЧЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ 1, ПОЛУЧЕННЫЙ С ПОМОЩЬЮ МУТАНТНОГО ШТАММА <i>TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM</i> TW1-59-27 Беккаревич А.О., Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Окунев О.Н., Осипов Д.О., Сеницын А.П.	80
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗЕМЕЛЬ, НАРУШЕННЫХ В ПРОЦЕССЕ ДОБЫЧИ ТОРФА Булавко Г.И., Яковлев А.П.	82
ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ Гаранович И.М., Алещенкова З.М.	84
НАУКОЕМКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ <i>PSEUDOMONAS</i> И <i>METHYLOBACTERIUMS</i> , ИХ РОЛЬ В ОРГАНИЧЕСКОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ И ЭКОЛОГИЗАЦИИ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА Горбунов О.П., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А.	86

ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Живых А.В.....	89
ЗАВИСИМОСТЬ РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В КОРНЕОБИТАЕМУЮ СРЕДУ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ОТ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ПОЧВОГРУНТА Калацкая Ж.Н., Ламан Н.А., Молчан О.В., Братанова М.А., Фролова Т.В.....	91
ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММА <i>BACILLUS SUBTILIS</i> BZR 336G – ПРОДУЦЕНТА БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МИНЕРАЛЬНОМ УДОБРЕНИИ Козицын А.Е., Асатурова А.М.....	93
РЕКОМБИНАНТНАЯ КСИЛАЗА <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> AC-738: ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КСИЛАН-СОДЕРЖАЩЕЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЁ Лисов А.В., Белова О.В., Андреева-Ковалевская Ж., Бударина Ж., Солонин А.С., Винокурова Н.Г., Леонтьевский А.А.	95
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СИНТЕЗ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНОЛА У БАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS BRASSICASEARUM</i> БИМ В-446 Муратова А.А., Мандрик-Литвинкович М.Н., Титок М.А., Носонова Т.Л., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н., Коломиец Э.И.	97
БИОКОНТРОЛЬ ФУЗАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ РИЗОСФЕРНЫХ И ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ Марданова А.М., Лутфуллин М.Т., Хадиева Г.Ф., Мочалова Н.К., Шарипова М.Р.	100
NEW ENZYME PREPARATION FOR ANIMAL FEED PRODUCTION BASED ON <i>PENICILLIUM</i> RECOMBINANT STRAINS Merzlov D.A., Bushina E.V., Shashkov I.A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P.	102
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВРЕДНОСТИ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ НА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЕ Надыкта В.Д., Асатурова А.М., Томашевич Н.С., Павлова М.Д., Жевнова Н.А., Хомяк А.И., Дубяга В.М., Козицын А.Е., Сидорова Т.М., Карасев С.Г.	103
АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ, ОБРАБОТАННОЙ БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>BACILLUS</i> ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД Нарушко М.В., Субботин А.М., Петров С.А., Мальчевский В.А.	105
ВЛИЯНИЕ ГАЛОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛЯДВЕНЕЦ (<i>LOTUS CORNICULATUS</i>) В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ Наумович Н.И., Антохина С.П., Алещенкова З.М.	107
НОВЫЙ ВЫСОКОАКТИВНЫЙ ЦЕЛЛЮЛАЗНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ДОБАВКИ К СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМ КОРМАМ Немашкалов В.А., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Окунев О.Н., Рожкова А.М., Сеницын А.П.	109
ДНК-ИНСЕКТИЦИДЫ – НОВЫЙ ПОДХОД К РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ ЛИСТОГРЫЗУЩИХ НАСЕКОМЫХ Оберемок В.В., Гниненко Ю.И.	111

ВРЕДНОСНОСТЬ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ И ПУТИ ЕЕ СНИЖЕНИЯ В АГРОЦЕНОЗАХ ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР Пасалари Х.М., Евтушенков А.Н.	113
РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> , ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БИОЦЕНОЗАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Прищепа Л.И.	115
ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЕПЕСТИЦИДА «БЕТАПРОТЕКТИН» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ Просвиряков В.В., Свиридов А.В., Купцов В.Н.	118
ТЕХНОЛОГИЯ МАЛОТОННАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА ВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ РЫЖЕГО СОСНОВОГО ПИЛИЛЬЩИКА Сергеева Ю.А., Долмонего С.О.	121
СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК Синицын А.П.	123
БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ ДОННИКА Смирнова И.Э., Саданов А.К., Джамантиков Х.Д., Галимбаева Р.Ш.	124
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ <i>CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS</i> БИМ У-228 Д В СОСТАВЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «КРИПТОЛАЙФ-С» Тамкович И.О., Гайдук А.С., Сапунова Л.И., Кулиш С.А., Шарейко Н.А., Долженкова Е.А.	127
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ МИКРОБНЫХ УДОБРЕНИЙ «БАКТОПИН» И «ПОЛИФУНКУР» ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОДНОЛЕТНИХ ЦВЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР Тимофеева В.А., Алещенкова З.М., Головченко Л.А., Савчиц Т.Л., Дуброва О.Н., Ярук И.В., Белазарович А.В.	129
ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ КАК АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ФУЗАРИОЗА ПШЕНИЦЫ Треножникова Л.П., Саданов А.К., Айткельдиева А.С., Галимбаева Р.Ш., Балгимбаева А.С., Ултанбекова Г.Д.	131
ВЛИЯНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> SPB2137 НА АЛЮМОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ Шапошников А.И., Макарова Н.М., Баганова М.Е., Азарова Т.С., Пухальский Я.В., Белимов А.А.	133
УСИЛЕНИЕ РОЛИ МИКРОБНЫХ АГЕНТОВ БИОКОНТРОЛЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ Штерншис М.В., Беляев А.А., Шпатова Т.В., Леляк А.А.	135
ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ Щетко В.А., Грель М.В., Головнева Н.А., Сергеенко Ю.А.	137
ИССЛЕДОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИЛЬНО МИКОТРОФНОГО РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА Юрков А.П., Якоби Л.М.	139

ЭНТОМОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ КАК ОСНОВА БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В БЕЛАРУСИ

Янковская Е.Н., Войтка Д.В. 141

Секция 3: Биотехнологии для медицины и промышленности 143

РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Ануарбекова С.С., Абитаева Г.К., Бекенова Н.Е., Алмагамбетов К.Х. 144

РОДОВАЯ И ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ КИШЕЧНЫХ СТРЕПТОКОККОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ

Богдан В.К., Тимошко М.А., Кодреану С.Н. 146

ПОКАЗАТЕЛИ ЧИСЛЕННОСТИ КИШЕЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *ESCHERICHIA* И *PROTEUS*, КАК СИГНАЛ О НАРУШЕНИИ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОРГАНИЗМА

Велчу А.И., Тимошко М.А., Струтинский Ф.А. 148

ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SPIRULINA PLATENSIS*, ОБОГАЩЕННОЙ ГЕРМАНИЕМ

Джур С.В., Кирияк Т.В., Чепой Л.Е., Рудь Л.И., Кодряну С.Н., Лосева Л.П., Рудик В.Ф. 150

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Землянский В.А., Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. 152

VITAMIN CONTENT IN MEDICINAL MUSHROOMS *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* AND *TRAMETES VERSICOLOR* CULTIVATED ON BREADCRUMB

Ivanova T.S., Bisko N.A., Titova L.O., Megalinska G.P. 154

СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*, УСТОЙЧИВЫХ К БУТАНОЛУ

Кирпичёва Т.Е., Литвинович Н.Е., Болотник Е.В., Титок М.А., Коломиец Э.И. 156

ЛИТИЧЕСКАЯ ЭНДОПЕПТИДАЗА Л5 *LYSOBACTER* SP. XL1: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Васильева Н.В. 158

ВЛИЯНИЕ ЖИРНОСТИ МОЛОКА НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Кузнецова Т.В., Саубенова М.Г., Халымбетова А.Е., Айтжанова А.А., Шорманова М.М., Кулназаров Б.А. 160

ЛИЗОАМИДАЗА – АНТИМИКРОБНЫЙ ПРЕПАРАТ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Леонтьевский А.А. 162

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРОИЗВОДСТВЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Литвинова Е.В., Фроленков К.А. 164

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *FUNALIA TROGII*, С ЦЕЛЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Стерляжникова О.В., Соколова С.В., Шамцян М.М. 166

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИМПЛАНТАТОВ ОТ
МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ

Тапальский Д.В., Осипов В.А., Рогачев А.А., Ярмоленко М.А., Рогачев А.В.,
Ситник А.А., Павлов С.И., Бутовская Г.В., Круль Л.П. 168

Секция 4: Биотехнологии для контроля окружающей среды 170

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КОМПСТИРОВАНИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ
ОТХОДОВ

Беловежец Л.А., Волчатова И.В., Медведева С.А. 171

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ,
ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ЭНДО- И РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Макарова Л.Е., Маркова Ю.А. 173

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ МИЦЕЛИЯ И СПОР ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ ГРИБОВ
РОДА *ASPERGILLUS* – АГЕНТОВ БИОПОВРЕЖДЕНИЯ

Гончарова И.А., Евдокимова О.В., Арашкова А.А., Тригубович А.М., Валентович Л.Н.,
Костеневич А.А. 175

АССОЦИАЦИЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ
ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ В УСЛОВИЯХ ЖАРКОГО
КЛИМАТА

Делеган Я.А., Ветрова А.А., Акимов В.Н., Титок М.А., Филонов А.Е. 177

ПРОИЗВОДСТВО ИЗ ВТОРИЧНОГО СЫРЬЯ СУБСТРАТОВ ДЛЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Кудряшов В.Л., Погоржельская Н.С. 179

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ
ПРИРОДНЫХ СРЕД, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПЕСТИЦИДАМИ ГРУППЫ
СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ

Леонтьев В.Н., Игнатовец О.С., Ахрамович Т.И., Феськова Е.В., Марцуль Е.В. 181

РЕГЕНЕРАЦИЯ АБСОРБЦИОННОГО РАСТВОРА, СОДЕРЖАЩЕГО
ТРИЭТИЛАМИН, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII*
БИМ В-823Д

Нагорный Р.К., Самсонова А.С. 183

ВЛИЯНИЕ ГУМАТОВ НА ДЕСТРУКЦИЮ НЕФТИ АКТИВНЫМИ
АССОЦИАЦИЯМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н., Свирко Е.А.,
Аккулова З.Г., Айтуганов К.А. 185

ПОДАВЛЕНИЕ НИТЧАТОГО ВСПУХАНИЯ АКТИВНОГО ИЛА АЭРОТЕНКОВ
СЕРНОКИСЛЫМ МАРГАНЦЕМ

Юхневич Г.Г., Кирей В.А. 187

БИОСИНТЕЗ ЭКЗОГИДРОЛАЗ МИКРОМИЦЕТОМ ИЗ РОДА *ASPERGILLUS* И
ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ, КАК ОСНОВА РАЗРАБОТКИ СОВРЕМЕННЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ

Чилочи А.А., Тюрина Ж.П., Клапко С.Ф., Чапурина Л.Ф., Лаблюк С.В., Дворнина Е.Г.,
Туртэ К.И. 187

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ГРИБА *LENTINUS EDODES* CNMN-FB-01 И ЕЕ
БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Дворнина Е.Г. 187

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 193

Секция 1:

**Микробный синтез биологически активных соединений.
Генно-инженерное конструирование микроорганизмов.
Коллекции микроорганизмов.**

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ХРАНЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Абжалелов А.Б., Закарья К.Д., Ескараева А.А.

*РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» Комитета науки МОН РК,
Республика Казахстан, Астана, e-mail: rcm-info@mail.ru*

Для коллекционного дела совершенствование методов качественной консервации микроорганизмов является особо актуальной. Традиционные методы поддержания культур микроорганизмов сводятся к их выращиванию на богатых питательных средах с частыми пересевами. Длительное хранение культур без потери ценных свойств у продуцентов возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы, в том числе и генетические перестройки. При этом культура переводится в состояние, близкое к анабиозу.

Для консервации в недостаточной мере разработан и используется метод контактно-сорбционного обезвоживания (КСО), который позволяет консервировать и длительно сохранять различные группы микроорганизмов без потери ими своих основных биологических свойств, не требуя специального оборудования, значительных физических и экономических затрат. Этот метод практически не используется в нашей республике.

Для сравнения эффективности существующих методов консервации и выявления, возникающих при этом проблем, необходимо определить современные тенденции совершенствования методов хранения, целесообразно провести анализ и оценку консервации микроорганизмов, практикующих в мире и провести исследования в этом направлении.

Одно из решений существующей проблемы – внедрение и использование при хранении ценных культур наряду с известными технологиями длительного хранения – инновационной технологии хранения: субкультивирование контактно-сорбционным методом с использованием различных носителей. Сущность метода заключается в обезвоживании микроорганизмов при контакте с сорбентом влаги, в результате чего бактерии теряют воду, и метаболические процессы резко замедляются. Механизм контактно-сорбционного массообмена определяется динамикой сорбции, которая в свою очередь является функцией ряда параметров: влагоемкости сорбента, длительности контакта с сорбентом, поверхности сорбции и других [1-3].

В результате многочисленных исследований впервые показано, что сорбционно-контактное обезвоживание материалов, в которых жидкая фаза находится в микрокапельном состоянии, стабилизированном сухим высокодисперсным гидрофобным разобщителем с наноразмерами частиц, сопровождается различными процессами: гидромеханическими, тепло- и массообменными,

биофизическими. В результате контакта частиц сорбента с обезвоживаемым материалом сорбент начинает поглощать влагу, а материал – терять ее [4-5].

В рамках грантового проекта «Разработка инновационной технологии хранения промышленных микроорганизмов контактно-сорбционным методом с использованием различных носителей» в Республиканской коллекции микроорганизмов разработаны и испытаны шесть вариантов контактно-сорбционного обезвоживания адсорбентами.

В качестве сорбента были взяты отечественные препараты Таган и Алтай сорбенты (ТОО «Сорбент», г. Усть-Каменогорск, РК) на первом этапе хранения. Затем для КСО были использованы адсорбенты: Адсорбикс, Энтеросгель, Лактофильтрум и белая глина. За отчетный период изучены оптимальная адсорбционная способность сорбентов при различных концентрациях, различной микробной нагрузке, различных формах колоний микроорганизмов, различных сроках инкубации микроорганизмов.

Результаты исследования количественной оценки микроорганизмов после 8-ми месячного хранения на 3 и 6 вариантах КСО с использованием адсорбентов: Таган, Алтай, Адсорбикс показывают хорошую сохраняемость от $1,0 \pm 0,5$ до $4,3 \pm 0,3 \times 10^8$ КОЕ/мл. Лучшую сохраняемость в количественном отношении обеспечивает 6 вариант КСО адсорбентами для бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей, бацилл и МКБ. Необходимо отметить, что микроорганизмы на сорбентах: Таган, Адсорбикс, Алтай сохранились с улучшением морфолого-культуральных свойств через 8 месяцев хранения. В большинстве случаев тинкториальные свойства, хранившихся штаммов на адсорбентах были более выражены, как у вновь выделенных культур по сравнению с окрашенными препаратами, сделанных с субкультур этих же штаммов.

Результаты морфолого-культуральных свойств группы бактерий, группы *Bacillus*, мицелиальных грибов и дрожжей с адсорбентов Лактофильтрум, белая глина, Алтай Таган и Энтеросгель, а также Адсорбикс для мицелиальных грибов и дрожжей через 8 и 9 месяцев хранения позволяют говорить о хорошей сохраняемости на всех использованных для хранения сорбентах. При этом необходимо отметить, что адсорбент Лактофильтрум был использован без протекторной среды, суспензии для перечисленных культур микроорганизмов добавлялись в адсорбент без молока. На всех адсорбентах: Лактофильтрум, белая глина, Алтай, Таган и Энтеросгель морфолого-культуральные свойства микроорганизмов были типичными и соответствовали исходным данным.

Таким образом, метод КСО определенными сорбентами позволяет консервировать и сохранять различные группы микроорганизмов без потери ими своих основных биологических свойств. Лактобактерий могут быть использованы в качестве индикаторных микроорганизмов при отборе адсорбентов для хране-

ния, которые содержат лигнин и каолин, не приемлемые для использования при хранении лактобактерий.

В ходе работы практически обоснована эффективность использования технологии длительного сохранения бактерий с использованием метода КСО с целью длительного хранения различных культур. Метод обеспечил возможность длительного хранения микроорганизмов (в течение 2 лет) без изменений культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств.

Список литературы

- 1 Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; A review // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – V. 66 (2). – P. 183-193.
- 2 Давыдкин В.Ю., Давыдкин И.Ю., Алёшкин В.А., Мелихова А.В., Афанасьев С.С. Способ сорбционно-контактного обезвоживания высокодисперсных биологически активных материалов // Пат № 2455349 Российская Федерация // опубл. 10.07.2012.
- 3 Homolka L. [et al.] Basidiomycete cryopreservation on perlite: evaluation of a new method // Cryobiology. - 2006. - V. 52. No. 3. - P. 446-453.
- 4 Homolka L. [et al.] Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite // Folia Microbiol. - 2007. - V. 52. No. 2. - P. 153-157.
- 5 Mata G. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant / G. Mata, R. Perez-Merlo // Cryobiology. - 2003. - Vol. 47. No. 1. - P. 14-20.

SYNTHESIS OF FLUORINATED NUCLEOSIDES USING RECOMBINANT NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES

Beresnev A.I.¹, Kvach S.V.¹, Eroshevskaya L.A.¹, Sivets G.G.², Zinchenko A.I.¹

¹*Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus;*
e-mail: dronber@yahoo.com

²*Institute of Bioorganic Chemistry, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus*

Background. 3'-Fluoro-3'-deoxy- and -2',3'-dideoxy- β -D-ribo/arabino-furanosyl nucleosides exhibited a wide range of biological activities [1]. Chemical synthesis of 3'- α -fluoro pyrimidine nucleosides is generally well elaborated [2], but the known methods for preparation of corresponding purine analogs are often rather challenging [3]. Enzymatic approaches to synthesis of purine 3'-fluorinated nucleosides from pyrimidine nucleosides in the presence of nucleoside phosphorylases as biocatalysts for transglycosylation reactions have not been studied so far.

Objectives. Production of 3'-fluorinated 3'-deoxy- and -2',3'-dideoxy- β -D-ribo/arabino-furanosyl nucleosides using recombinant nucleoside phosphorylases.

Methods. Using genetic engineering approach *Escherichia coli* recombinant strains producing pyrimidine nucleoside phosphorylase from *Thermus thermophilus* (PyNP), purine nucleoside phosphorylase from *E. coli* (PuNP) and adenosine deaminase from *E. coli* (AD) were achieved. Enzymatic synthesis of fluorinated nucleosides was catalyzed by highly purified recombinant PyNP, PNP and AD.

Conclusion. Using recombinant nucleoside phosphorylases PyNP, PuNP and AD demonstrated the enzymatic approach to the synthesis of compounds which have potential value in medicine (antiviral and anticancer activity) and molecular biology (DNA amplification and sequencing), such as: 3'-fluoro-3'-deoxyribofuranosyl adenine (1), 3'-fluoro-3'-deoxy-2-aminoribofuranosyl adenine (2), 3'-fluoro-3'-deoxyribofuranosyl guanine (3), 3'-fluoro-2',3'-dideoxy-2-fluororibofuranosyl adenine (4), 3'-fluoro-2',3'-dideoxy-2-chlororibofuranosyl adenine (5), 3'-fluoro-3'-deoxy-2-amino-6-metoxyribofuranosyl purine (6), 2'-fluoro-2'-deoxy-2-chloroarabinofuranosyl adenine (7) and other valuable nucleosides (figure).

- X=NH₂, Y=Cl, Z=R=H, W=F (5);
- X=NH₂, Y=F, Z=R=H, W=F (4);
- X=O, Y=NH₂, Z=R=H, W=F (3);
- X=NH₂, Z=OH, Y=R=H, W=F (1);
- X=NH₂, Y=NH₂, Z=OH, R=H, W=F (2);
- X=NH₂-O-CH₃, Y=NH₂, Z=OH, R=H, W=F (6);
- X=NH₂, Y=Cl, R=F, Z=H, W=OH (7);

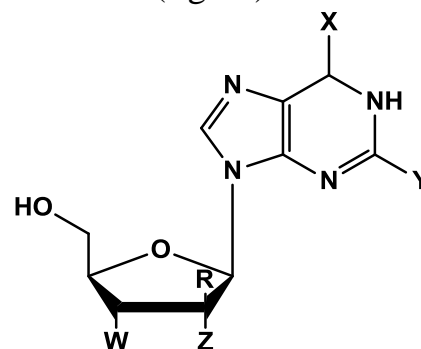


Figure – Enzymatically synthesized modified nucleosides

Structures of synthesized compounds were confirmed by TLC, UV-, ¹H NMR- and mass spectrometry. Overall yield of synthesized products was in the range 50–85 %, which exceeded in several times the values achieved by chemical methods.

References

1. Agarwal, H.K. Synthesis and anti-HIV activities of phosphate triester derivatives of 3'-fluoro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine / H.K. Agarwal, F.D. Gustavo, K. Parang // *Tetrahedron Lett.* – 2008. – Vol. 49. – P. 4905–4907.
2. Synthesis and *in vitro* antiviral activities of 3'-fluoro (or chloro) and 2',3'-difluoro-2',3'-dideoxynucleoside analogs against hepatitis B and C viruses / N.C. Srivastav [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18. – P. 7542–7547.
3. Synthesis of 6-Arylthio Analogs of 2',3'-Dideoxy-3'-fluoroguanosine and their effect against hepatitis B virus replication / T. Torii [et al.] // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2006. – Vol. 25. – P. 655–665.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, КОДИРУЮЩИХ СИНТЕЗ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Бережная А.В., Титок М.А., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: domilazo@bk.ru

Бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами широкого спектра биологически активных соединений, в том числе антибиотиков, ПАВ, ферментов и др., что и определяет их широкое использование в качестве основы для биологических средств защиты растений. Наиболее известными метаболитами, определяющими свойство антагонистической активности бактерий рода *Bacillus* в отношении широкого спектра патогенов, являются липопептиды группы сурфактинов и итуринов [1]. Данные активные вещества были нами выделены из супернатанта культуральной жидкости штамма *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439 [2].

Целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез сурфактинов у представителей рода *Bacillus*. В качестве объектов исследования использовали коллекционные штаммы БИМ В-439, БИМ В-497, БИМ В-454, отнесенные на основании физиолого-биохимических свойств и сиквенс-анализа генов 16S рРНК к бактериям рода *Bacillus*.

В результате полимеразной цепной реакции при добавлении в качестве матрицы тотальной ДНК штаммов БИМ В-439, БИМ В-497, БИМ В-454 и праймеров, обеспечивающих копирование генов *srfA*, были получены специфические продукты амплификации размером 1131 п.н. Рестрикционный анализ отобранных ампликонов с использованием ферментов *EcoRI* и *HincII* позволил установить, что все три исследованных штамма имеют идентичные последовательности генов *srfA* (на электрофореграммах фиксировали образование одинаковых по молекулярной массе фрагментов ДНК). Следует отметить, что использованные ферменты рестрикции позволяют картировать данные генетические детерминанты у различных представителей рода *Bacillus* (нуклеотидные последовательности генов *srfA* проявляли видоспецифичность [3]). Сравнительный ПДРФ-анализ (сравнивали последовательности генов *srfA* разных видов рода *Bacillus* из базы ГенБанка) позволил выявить сходство исследованных детерминант с таковыми бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum*.

Продукты амплификации генов *srfA* чистили из геля и встраивали в *SmaI*-сайт вектора рUC19. Для одной из гибридных плазмид определяли нуклеотидную последовательность вставки (фрагмент гена *srfA* бактерий штамма БИМ В-454) с использованием стандартных праймеров М13. Анализ секвенирован-

ной последовательности размером 569 п.н. позволил выявить ее высокую степень гомологии (97 % – 99 %) с генами *srfA* бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum*. Сходство с аналогичными детерминантами бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *amyloliquefaciens* и *B. subtilis* не превышала 94 % и 79 %, соответственно (рисунок 1).

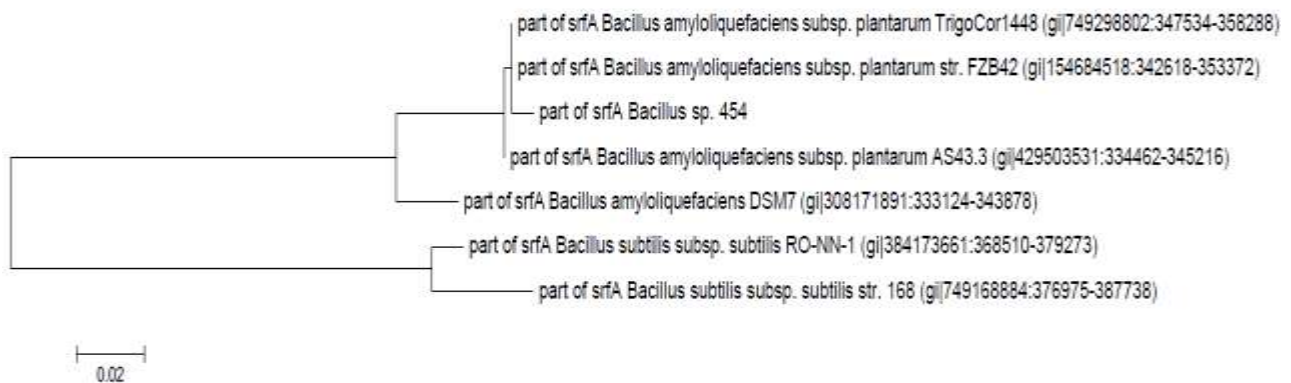


Рисунок 1. Результаты филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена *srfA* природных бактерий *Bacillus sp.454*

Таким образом, в результате проведенной работы установлено наличие в геноме исследуемых бактерий (штаммы БИМ В-439, БИМ В-497 и БИМ В-454) генов *srfA*, определяющих синтез сурфактинов. На основании результатов рестрикционного и сиквенс-анализа амплифицированной последовательности гена *srfA*, исследованные бактерии могут быть отнесены к *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum*. Клонированный фрагмент гена *srfA* может быть использован для направленного мутагенеза бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* подвида *plantarum* с целью изучения свойств синтезируемых сурфактинов (в частности, физико-химических и антимикробных свойств).

Список литературы

1. Ongena, M. The Roles of Cyclic Lipopeptides in the Biocontrol Activity of *Bacillus subtilis* / M. Ongena, G. Henry, Ph. Thonart // Recent Development in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st century -1. – pp.59-66.
2. Бережная А.В. Первичная идентификация метаболитов с антифунгальной активностью, продуцируемых штаммом *Bacillus subtilis* БИМ В-439 / А.В. Бережная, Э.И. Коломиец, Т.В. Романовская, В.Н. Купцов // XIII съезд Товарищества микробиологов Украины им. С.В. Виноградского. Тезисы докладов. Ялта-2013. – стр. 65.
3. Joshi, R. Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis* / R. Joshi, B.B. McSpadden Gardener // Phytopathology - Vol. 96, No. 2. 2006 – pp. 145-154.

КОЛЛЕКЦИЯ ШТАММОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ОБЪЕКТ НАЦИОНАЛЬНОГО ДОСТОЯНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Бордок И.В., Охлопкова Н.П., Евтушенко Л.В.,
Лубянова В.М., Назарова О.М.**

Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь, e-mail: bordok1957@mail.ru

Коллекции живых культур грибов – уникальный фонд грибных организмов, где поддерживаются в живом состоянии представители различных таксонов в их фено- и генотипическом разнообразии. Сохраняемые культуры – важнейший источник для морфологических, физиологических, биохимических и генетических исследований, которые являются основой для выполнения фундаментальных и прикладных разработок. Одним из таких научных объектов является Коллекция штаммов базидиальных грибов Института леса НАН Беларуси, которая была создана более 40 лет назад как рабочая коллекция для проведения исследований по изучению биологии и экологии, а также разработке технологий выращивания, в первую очередь, ксилотрофного базидиомицета вешенки обыкновенной. Многолетнее сотрудничество с учеными России, Украины Молдавии, Венгрии, Германии, США, Китая, Японии и других стран позволило микологам Института леса расширить как видовой, так и штаммовый ассортимент коллекции видами базидиальных грибов. Последние нашли широкое применение в разработке экстенсивных и интенсивных технологий производства посевного мицелия, плодовых тел, фармакологических субстанций, а также в различных областях микологических исследований, и послужили основой для формирования в нашей стране принципиально нового направления – промышленного грибоводства.

В настоящее время Коллекция является самой представительной в Беларуси по количеству чистых культур базидиальных грибов. В коллекционном фонде поддерживается жизнеспособность 315 штаммов 62 видов грибов, которые относятся к 46 родам, принадлежащим к различным таксономическим группам грибов из разных географических регионов. Основу коллекции составляют чистые культуры ксилотрофных базидиомицетов (более 70%). Широким штаммовым разнообразием представлены съедобные макромицеты, перспективные для промышленного культивирования – грибы рода вешенка (*Pleurotus sp.*), лентинус съедобный, сиитаке (*Lentinus edodes (Berk.) Sing.*) и опенок зимний (*Flammulina velutipes (Curt.) Sing.*). Особое место в Коллекции занимают чистые культуры грибов, которые являются перспективными в сфере биотехнологий получения отечественных лечебно-профилактических препаратов, биокорректоров и антиоксидантных комплексов. К их числу относятся трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst.*), аурикулярия аурикула (*Auricularia auricular-judae (Bull.) J. Schröt.*), кариолус многоцветный (*Coriolus*

versicolor (L.: Fr.) Quel.), герициум гребенчатый (*Hericium erinaceus* (Bull: Fr.) Pers.), трутовик серно-желтый (*Laetiporus sulphureus* (Bull. :Fr.) Murr.), веселка обыкновенная (*Phallus impudicus* L.: Pers.), чага или березовый гриб (*Inonotus obliquus* (Acharius ex Persoon) Pilát.), щелелистник обыкновенный (*Schizophyllum commune* Fr.: Fr.), кордицепс военный (*Cordyceps militaris* (L.) Fr.), грифола курчавая или гриб-баран (*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray), чешуйчатка золотистая (*Pholiota aurivella* (Batsch.) Kumm.). Свыше 40% штаммов из коллекционного фонда составляют чистые культуры, выделенные сотрудниками из тканевых изолятов плодовых тел, собранные в природных условиях.

Научный объект осуществляет накопление, длительное хранение и всестороннее изучение штаммов микроорганизмов. Основными принципами функционирования Коллекции являются чистота, стабильность, сохранность и доступность каждого штамма или изолята для научных исследований и практического внедрения. Перспективные штаммы макромицетов из коллекционного фонда позволили разработать биотехнологии получения экологически чистой грибной продукции, создать научные основы интродукции новых видов грибов пищевого и лечебно-профилактического назначения и легли в основу организации единственного на постсоветском пространстве производства по выращиванию грибов и выпуску грибной продукции на КСУП «Комбинат «Восток».

Основными направлениями научно-организационной деятельности коллекции являются: гарантированное поддержание жизнеспособности штаммов из коллекционного фонда в зависимости от принадлежности вида к определенной таксономической и эколого-трофической группе; формирование коллекционного фонда высокопродуктивных штаммов, представляющих интерес для промышленного выращивания посевного мицелия съедобных и лекарственных грибов; пополнение коллекции природными изолятами; верификация штаммов на основе культуральных методов с использованием ростовых параметров, макро- и микроморфологических признаков, а также сведений генетического анализа; систематизация информации о валидности родовых и видовых названий поддерживаемых штаммов с использованием международной сервисной службы MusoBank, создание базы данных и структуры коллекционного фонда, паспортизация штаммов в соответствии со стандартными правилами, которые используются мировыми коллекциями микроорганизмов.

Жизнеспособность штаммов Коллекции поддерживается высококвалифицированными микробиологами методом субкультивирования посредством ежегодных (1-2 раза в год) пересевов на свежие питательные агаризованные среды, используя современное оборудование и технологии, необходимые для длительного хранения культур, обеспечения их жизнеспособности и важнейших биологических характеристик.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОНСОРЦИУМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Головнева Н.А., Щетко В.А., Рябая Н.Е., Найденко И.А.

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

Эффективность пробиотических препаратов определяется совокупностью биологических свойств штаммов, входящих в состав препаратов. Исследования физиолого-биохимических особенностей пробиотических культур в смешанных популяциях, оценка их антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, актуальны и имеют несомненную практическую значимость для повышения качества коммерческих препаратов, решения технологических проблем микробиологического производства [1-3].

В сравнительном аспекте исследована антагонистическая активность монокультур и бактериальных композиций, включающих в различном сочетании лактобактерии, бифидобактерии и пропионовокислые бактерии. Объектами исследований служили штаммы *B. adolescentis* 51, *B. adolescentis* Cf, *L. plantarum* 3а, *L. plantarum* 15/1, *L. plantarum* 23/1, *Propionibacterium* sp. В качестве индикаторных тест-культур использовали штаммы *Staphylococcus aureus* 2098, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, полученные из отдела бактериальных инфекций Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси. Антагонистические свойства культур тестировали методом лунок с использованием агаризованных питательных сред и при культивировании тест-культуры в жидких питательных средах в присутствии супернатанта штамма-антагониста.

Наиболее высокая антимикробная активность отмечена у исследуемых штаммов бифидобактерий. В смешанной культуре бифидобактерий и лактобацилл или пропионовокислых бактерий наблюдалось выраженное повышение антагонистической активности по отношению ко всем тест-культурам.

Установлен эффект усиления антагонистических свойств бактериоцинопродуцирующего штамма бифидобактерий компонентами клеток тест-культуры *St. aureus* 2098. Внесение в среду роста штамма *B. adolescentis* 51 инактивированных клеток *St. aureus* 2098 (1×10^7 кл/мл) привело к значительному увеличению антагонистической активности бесклеточной культуральной жидкости. Как видно из представленных на рисунке 2 данных, в контрольном варианте при культивировании тест-штамма *St. aureus* 2098 в течение 6-ти часов число жизнеспособных клеток увеличилось с $10^{6,5}$ – $10^{6,6}$ до $10^{9,86}$ КОЕ/мл. При добавлении нейтрализованной (рН 6,8-7,0) культуральной жидкости *B. adolescentis* 51 наблюдалось ингибирование роста тест-штамма в 10 раз, ко-

личество жизнеспособных клеток *St. aureus* 2098 достигло $10^8,4$ КОЕ/мл. При добавлении культуральной жидкости *B. adolescentis* 51, выращенного в присутствии *St. aureus* 2098, отмечено ингибирование роста тест-штамма в 100 раз, значение $10^7,7$ КОЕ/мл снизилось до $10^7,7$.

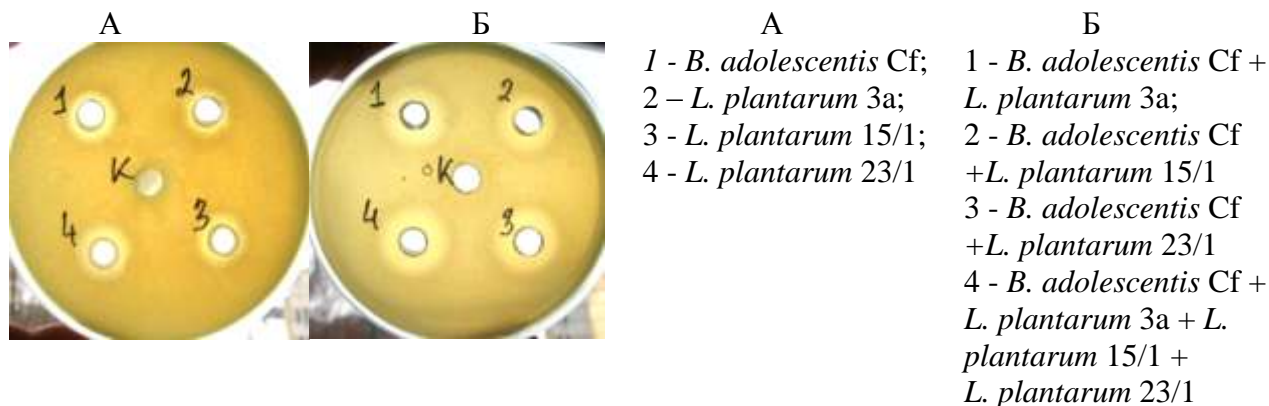
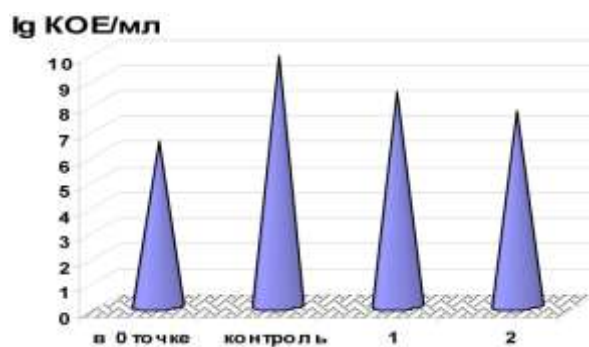


Рисунок 1 – Антагонистическая активность монокультур (А) и комплексных препаратов (Б) по отношению к тест-культуре *St.aureus*



**Рисунок 2 – Подавление роста тест штамма *St. aureus* 2098 при внесении:
1 – культуральной жидкости *B. adolescentis* 51 (рН 6,8-7,0)
2 – культуральной жидкости *B. adolescentis* 51, выращенного
в присутствии *St. aureus* 2098**

Таким образом, показано увеличение антагонистической активности пробиотических бактерий в результате предварительной активации антагониста клетками условно патогенных культур. Обнаруженный эффект целесообразно использовать для усиления антимикробного действия пробиотических препаратов.

Список литературы

1. Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in vitro / E. Myllyluoma [et al.] // Clinical and vaccine immunology. – 2008. – P. 1472–1482.
2. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium / P. G. Casey [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2007. – P. 1858–1863.
3. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus species* / C.Piper [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – V 64. – P. 546–551.

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА МИКРООРГАНИЗМОВ В КАЗАХСТАНЕ

Джакибаева Г.Т.

Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан,

e-mail: J.Gulnar60@mail.ru

Создание, систематическое пополнение и изучение коллекции микроорганизмов является приоритетным направлением, способствующим устойчивому развитию соответствующих отраслей промышленности и науки Казахстана. Коллекции культур микроорганизмов играют важную роль в исследовании микробного разнообразия, а также в сохранении генетической стабильности продуцентов биологически активных веществ и микробной биомассы для практического использования, как в настоящем, так и в будущем в различных отраслях сельского хозяйства, медицины, пищевой и перерабатывающей промышленности [1-3]. Коллекция Института микробиологии и вирусологии включает более 500 штаммов, ранее она выполняла функции регионального центра Всесоюзной коллекции микроорганизмов. В коллекции поддерживаются в активном состоянии микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам. Это актиномицеты – продуценты антибиотиков и витаминов группы; молочнокислые и пропионовые бактерии для приготовления сухих бактериальных заквасок для силосования кормов и пробиотиков; штаммы, окисляющие железо, мышьяк, нефтепродукты; дрожжи для винодельческой и хлебопекарной промышленности и продуценты кормового белка. Также в коллекции находятся культуры микроорганизмов, являющиеся продуцентами биологически активных веществ, на основе которых получены высокоэффективные препараты для медицины, сельского хозяйства и охраны окружающей среды.

«**Бакойл KZ**» – высокоэффективный бактериальный препарат для микробиологической очистки водоемов, почвы и промышленных стоков от нефтяных загрязнений. Основой препарата являются активные штаммы нефтеокисляющих бактерий. Результаты полевых испытаний препарата показали снижение содержания нефти в нефтезагрязненной почве на 77-86%; «**Ризовит – АКС**» – высокоэффективный препарат, созданный на основе штаммов клубеньковых бактерий. Препарат повышает урожай и плодородие почвы, снижает заболеваемость растений; «**Казбиосил**» - специализированные концентрированные закваски, содержащие высокоэффективные штаммы молочнокислых бактерий. Биоконсерванты предназначены для силосования широкого набора кормовых растений; Кормовая добавка «**Бентобак**» – пробиотик физиологического назначения, способствует лучшему усвоению грубых кормов, снижению риска ацидоза у животных. Препарат приводит к приросту живой массы сельскохозяйственных животных на 30%, уменьшению затрат корма на 5%. Препарат представляет собой ассоциацию пропионовокислых и целлюлозолитических бактерий;

«**Триходермин**» – грибной препарат для борьбы с корневыми гнилями картофеля, сахарной свеклы и других овощных культур; «**Лактовит**» – лечебно-профилактический препарат на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий для профилактики колибактериоза и сальмонеллеза молодняка сельскохозяйственных животных и птиц; «**Розеофунгин**» – широкого спектра противогрибковый полиеновый антибиотик для лечения глубоких и поверхностных микозов. Спектр действия данного антибиотика значительно шире известных противогрибковых препаратов; «**Полилактобак**» – пробиотик, составленный из ассоциации молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Испытан для лечения больных доброкачественной гипертензией предстательной железы 1 и 2 степени, осложненной после катеризации воспалением нижних мочевых путей. Применение препарата повышает эффективность стандартного антибактериального лечения в 2,5 - 3,7 раза.

Список литературы

1. Бродский А.К. Введение в проблемы биоразнообразия. –Санкт-Петербург.-2002.-143 с.
2. Илялетдинов А.Н. Развитие микробиологии в Казахстане//Вестник КазНУ.Сер.биол.-2002.-№1.-с.18-22.
3. Шигаева М.Х. Разнообразие микроорганизмов //Вестник КазНУ.-Сер.биол.-2002.-№1.-С.133-137.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF WOOD-ROTTING BASIDIOMYCETES

**Elisashvili V.I., Asatiani M.D., Kachlishvili E.T., Khardziani T.Sh.,
Metreveli E.M., Kobakhidze A., Berikashvili V., Jokharidze T.**

Agricultural University of Georgia, Tbilisi, Georgia,

e-mail: v.elisashvili@agrni.edu.ge

Wood rotting fungi are common in nature. They are particularly abundant in forest ecosystems where they contribute significantly to carbon recycling. Considerable and helpful fundamental information now exists on these fungi to employ their biosynthetic and biodegradation potential for useful purposes, particularly for the production of enzymes, dietary supplements, physiologically active compounds, and bioremediation. Results of our extensive screening proved that mushroom submerged cultivation for the antioxidants, lectins, and extracellular polysaccharides (EPS) production with high yield is a promising approach. Thus, the water extracts from *Coprinus comatus*, *Agaricus nevoi*, and *Flammulina velutipes* and ethanol extracts from *Agaricus nevoi*, *Omphalotus olearius*, and *Auricularia auricula-judae* showed the highest (more than 80%) antioxidant activity at 2 mg/ml. When the DPPH radical scavenging activity of ethanol and water extracts was measured, *Ganoderma lucidum* (56-69%) and *Daedalea quercina* (51-55%) were the best among 24 strains tested. Moreover, we for the first time showed that all higher *Basidiomycetes* tested have a capability to accumulate lectin activity during cultivation on defined liquid medium and in submerged and solid-state fermentation of agro-industrial wastes. The results show that the hemagglutinating activity is a species- and strain-dependent and varies with cultivation conditions. The specificity toward a variety of sugars and the minimal inhibition concentrations has been established for different mushroom lectins. Finally, our and literature data prove that the capability to synthesize EPS is widespread among *Basidiomycetes* species which accumulated 0.6-8.2 g/l of EPS in submerged cultivation. Glucose, maltose, and mannitol were the most appropriate carbon sources for biomass and EPS production. Organic nitrogen sources appeared to be the most suitable nitrogen sources for biomass and EPS accumulation. The cultivation process in shake flasks was successfully reproduced in a laboratory fermenter with enhanced EPS production in cultivation of *A. nevoi* and *Inonotus levis*.

A common feature of white-rot *Basidiomycetes* is the production of cellulases, xylanases, laccases, and manganese peroxidases in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic substrates. Enzyme production by the white rot basidiomycetes (WRB) has been studied from both a basic and an applied viewpoint. This presentation focuses on a physiological diversity of WRB belonging to different taxonomic and ecological groups. Based on the enzyme production patterns, several categories of WRB will be distinguished. Moreover, several approaches and strate-

gies that aim to activate the fungi biosynthetic activity and to increase lignocellulolytic enzymes production rate and yield will be analyzed. Finally, several examples of lignocellulolytic enzymes application will be considered.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI*, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Казловский И.С.¹, Радевич Д.С.², Рымко А.Н.², Квач С.В.²,
Зинченко А.И.^{1,2}

¹МГЭУ им. А.Д. Сахарова, Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Недавние исследования показали, что циклические динуклеозидмонофосфаты (ц-диНМФ), выполняющие функцию вторичных посредников у бактерий, стимулируют иммунную систему млекопитающих, что позволяет применять их в качестве терапевтических агентов и адъювантов для вакцин [1].

Одним из ц-диНМФ является циклический 3',5'-диаденозинмонофосфат (ц-диАМФ) – это бактериальный динуклеотид, который выполняет функции вторичного мессенджера и участвует в регуляции таких физиологических процессов, как репарация ДНК и споруляция [2].

С увеличением объемов исследований, направленных на изучение иммуностимулирующих и иммуномодулирующих свойств ц-диАМФ и его аналогов, возрастает потребность в синтезе препаративных количеств данного циклического динуклеотида. В настоящее время его в основном получают химическим способом, недостатками которого являются сложность, дороговизна и небольшой выход целевого продукта [2, 3]. Альтернативный подход заключается в ферментативном синтезе целевого соединения, который характеризуется меньшими затратами времени, реагентов и денежных средств [4, 5]. В литературе предложено использовать для синтеза ц-диАМФ диаденилатциклазу бактерии *Bacillus thuringiensis* (btDisA), которая имеет высокую каталитическую активность. Однако в литературе отсутствуют данные о продуцирующей способности рекомбинантных штаммов-продуцентов btDisA и удельной активности данного фермента.

Исходя из вышеперечисленного, целью настоящей работы явилось создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* продуцента btDisA.

В результате выполнения работы получен новый генно-инженерный штамм *E. coli* pet42-btDisA – продуцент btDisA. В структуру целевого белка встроен дополнительный гистидиновый олигопептид, позволяющий проводить выделение фермента в одну стадию, используя очистку на аффинной смоле Ni-NTA. Выход целевого белка составил 62 мг/л КЖ, с чистотой более 95 %, что позволяет использовать этот фермент для синтезов особо чистых соединений. Удельная активность очищенного ферментного препарата btDisA составляет 5,85 ед./мг белка. Установлено, что btDisA имеет узкую субстратную специ-

фичность и (из проверенных УТФ, дЦТФ, дТТФ, дАТФ, дГТФ, ЦТФ, АТФ, АТеФ и АДФ) способна использовать в качестве субстрата только АТФ.

С помощью очищенной btDisA проведен препаративный синтез с получением 600 мг ц-диАМФ. Синтез занял трое суток, и выход целевого соединения составил 60,4 моль%.

Список литературы

1. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP / S.M. McWhirter [et al.] // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206. – P. 1899–1911.
2. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis / D. Kalia [et al.] // Chem. Soc. Rev. – 2012. – Vol. 42 – P. 305–341.
3. C-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress / R.M. Corrigan [et al.] // PLoS Pathogens. – 2011. – Vol. 7. – P. 124–129.
4. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant / T. Ebensen [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – P. 5210–5220.
5. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP / Y. Bai [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – P. 35206–35210.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПОСЛЕ ЛИОФИЛЬНОГО ВЫСУШИВАНИЯ

Кебекбаева К.М., Джакибаева Г.Т., Алимбетова А.В.

Институт микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан,
e-mail: karla57@mail.ru

В настоящее время в работе коллекции широко используются более прогрессивные методы сохранения живых микроорганизмов. Это высушивание, лиофилизация и хранение при низких температурах [1, 2]. Лيوфилизация в течение многих лет используется для длительного хранения многих видов микроорганизмов. Этот метод обеспечивает большую стабильность, чем метод периодических пересевов для широкого круга микроорганизмов и клетки могут сохранять жизнеспособность в течение многих лет [3, 4].

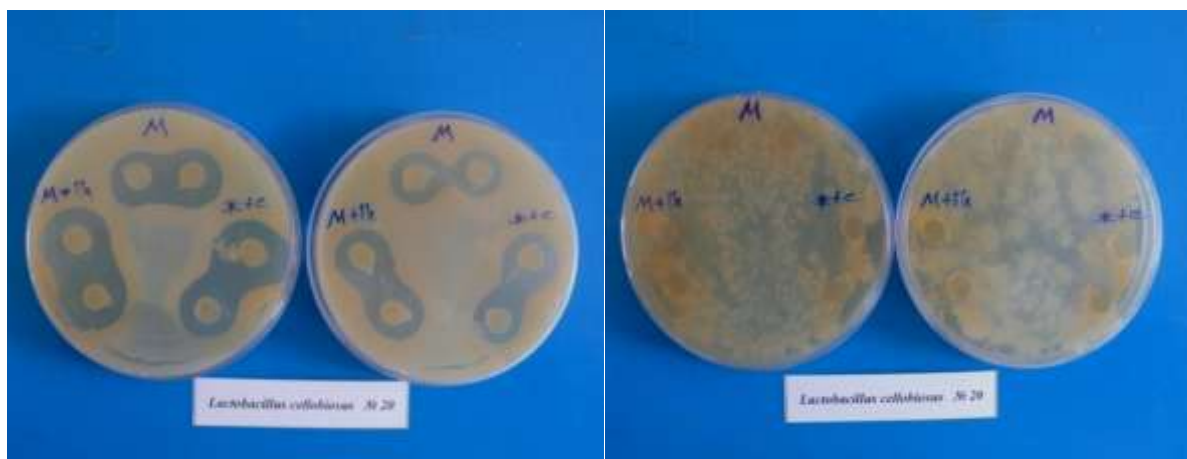
Культуры молочнокислых бактерий после хранения в лиофильно-высушенном состоянии были проверены на сохранность антимикробной активности по отношению к патогенам: *Bacillus subtilis*, *Esherichia coli* 113, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*. В качестве защитных сред использованы снятое молоко, молоко + 7% глюкоза, 10% сахароза + 1% желатин.

После двенадцати месяцев хранения антимикробная активность по отношению к *Bac.cereus* сохранилась у трех культур: *Lactobacillus curvatus* 18g, *Lactobacillus casei* 173a, *Lactobacillus cellobiosus* 20. Наибольшая антимикробная активность у молочнокислых микроорганизмов наблюдалась при использовании в качестве протектора 10% сахарозы + 1% желатина. У культуры *Lactobacillus cellobiosus* 20 диаметр антимикробной активности достигал 20,5 мм.

По отношению к *E. coli* из десяти проверенных культур после лиофильного высушивания сохранили активность восемь культур; две молочнокислые культуры: *Lactobacillus plantarum* 22, *Lactobacillus plantarum* 53H утратили антимикробную активность.

Антимикробную активность к *St. aureus* после лиофильного высушивания сохранили всего две молочнокислые культуры: *Lactobacillus casei* 139, *Lactobacillus fermentium* 27.

Необычно себя проявила после лиофильного высушивания культура *Lactobacillus cellobiosus* 20. Антимикробная активность *Lactobacillus cellobiosus* 20 по отношению к *Bac.cereus*, *Bac. subtilis*, *E.coli* была довольно высокой и превосходила исходную, но совсем не проявлена антимикробная активность по отношению к *St. aureus*. Результаты антимикробной активности к *Bac. cereus* и к *St. aureus* представлены на рисунке 1.



тест – культура *Bac. cereus*

тест – культура *St. aureus*

Протекторы: м-молоко; гл + м - 7% глюкоза + молоко; с + ж - 10% сахароза + 1% желатин

Рисунок 1– Антимикробная активность *Lactobacillus cellobiosus* 20 к тест - культурам *Bac. cereus* и *St. aureus* после лиофильного высушивания.

К *Bac. subtilis* все семь культур сохранили антимикробную активность. Все три протектора оказывали одинаковое защитное действие на сохранность активности.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что при лиофильном высушивании не все молочнокислые культуры сохраняют антимикробную активность, хотя жизнеспособность сохраняется на довольно высоком уровне.

Список литературы

1. Ефременко Е.Н., Татарина Н.Ю. Влияние длительного хранения клеток микроорганизмов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, на их выживаемость и биосинтез целевых метаболитов // Микробиология.- 2007.- Т. 76, № 3.- С. 383-389.
2. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения// Микробиология.- 2011.- Т. 80, № 6.- С. 8.
3. Сидякина Т.М., Кишковский З.Н., Кузнецова Е.В., Сахарова Т.А. Применение лиофилизации и консервации для длительного хранения культур винных дрожжей // Прикладная биохимия и микробиология.- 1986.- Т. 22, Вып.6.- С. 840-843.
4. Strasser S., Neureiter M., Gepl M., Braun R., Danner H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria// J.Appl.Microbiol.-2009.-Vol.107, № 1.-P.167-177.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК В КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

Кирпичёва Т.Е., Литвинович Н.Е., Болотник Е.В.,
Коломиец Э.И., Титок М.А.

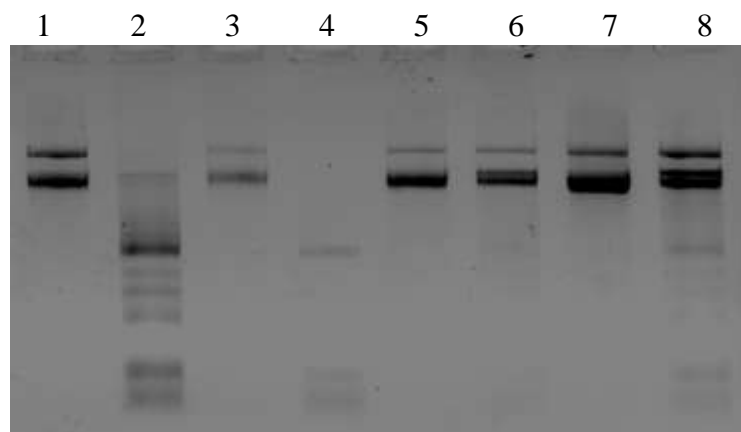
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: kolonok24@yandex.ru

Привлекательность микробиологического синтеза бутанола бактериями *C. acetobutylicum* стимулирует научные исследования, направленные на получение эффективного продуцента этого практически важного растворителя. Для повышения продуктивности сольвентогенных бактерий используют целый арсенал методов, позволяющих направлено изменять их генетический материал (инактивировать гены, либо вносить их дополнительные копии). Подобного рода генно-инженерные модификации невозможны без введения чужеродной ДНК в бактериальные клетки. В этом плане *C. acetobutylicum* имеют ряд ограничений, в первую очередь, связанных с деградацией чужеродной ДНК эндогенной рестриктазой *Cac824I*. Для решения этой проблемы используют бактерии *C. acetobutylicum* NCIMB 8052 с инактивированным геном, детерминирующем синтез эндонуклеазы [5], либо предварительно метилируют чужеродную ДНК в клетках бактерий *E. coli*, содержащих плазмиды серии рАН, которые имеют в своем составе ген метилазы фага φ3Т. Сайты-мишени нуклеазы *Cac824I*, метилированные подобным образом, не подвергались деградации [3]. Для достижения компетентности бактерий *C. acetobutylicum* используют селективные среды, содержащие ионы магния, после чего клетки подвергают действию электрического разряда (электротрансформация) [1-5].

В данной работе предлагается модифицированные методы введения чужеродной ДНК в клетки *C. acetobutylicum*. Суть методов заключается в использовании метилазы бактерий *C. acetobutylicum* для предварительной обработки чужеродной ДНК и метода электропорации для ее введения.

Ген, детерминирующий синтез метилазы, был изолирован из генома *C. acetobutylicum* с использованием полимеразной цепной реакции и встроен в плазмиду рJKS200 (репликон р15А), в которой транскрипция гена обеспечивалась регулируемым промотором лактозного оперона (плазида получила название рJQM). Плазида вводилась в клетки *E. coli* XL1-Blue, а затем в них трансформировали плазмиду рSOLAMY43, предназначенную для введения в бактерии *C. acetobutylicum* и содержащую ген теплового шока *groESL* под контролем тиолазного промотора *C. acetobutylicum*, а также ген синтеза термостабильной α-амилазы бактерий *Bacillus* sp. 406 под контролем промотора гена *p43* *Bacillus subtilis* 168. Всего на плазмиде рSOLAMY43 присутствовало 36 сайтов узнавания для рестриктазы *Cac824I*.

Бактерии *E. coli* XL1-Blue, содержащие две плазмиды (pJQM и pSOLAMY43) выращивали в полноценной среде LB с добавлением индукторов, обеспечивающих активацию транскрипции гена метилазы с промотора лактозного оперона (5% лактозу и 0,1 мМ IPTG). При этом индукторы добавляли сразу в среду культивирования, либо вносили в логарифмической фазе роста бактерий, после чего их дополнительно выращивали в течение 8 часов. Защитный эффект метилирования плазмиды pSOLAMY43 анализировали путём обработки плазмидной ДНК рестриктазой *SatI* (ThermoScientific), являющейся изошизомером эндонуклеазы *Cac824I*. Как видно из данных, приведенных на рисунке 1, наиболее эффективно метилирование плазмиды pSOLAMY43 происходило при выращивании плазмидсодержащих бактерий в среде, в которую IPTG вносили непосредственно перед выращиванием. Именно в этих условиях плазмидная ДНК практически не подвергалась рестрикции.



Плазмиды выделяли из клеток *E. coli* (дорожки 1,3,5,7) и подвергали обработке рестриктазой *SatI* (дорожки 2,4,6,8). Номера дорожек соответствуют плазмидной ДНК, выделенной из клеток, при различных условиях их культивирования: 1,2 – среда LB; 3,4 – среда LB с добавлением 0,5% лактозы; 5,6 – среда LB с добавлением 0,1 мМ IPTG; 7,8 – среда LB с добавлением 0,1 мМ IPTG в логарифмической стадии роста бактерий.

Рисунок – Рестрикционный анализ плазмид pJQM и pSOLAMY43

Наследующем этапе варьировали условия введения плазмиды pSOLAMY43 в клетки бактерий *C. acetobutylicum* 5Н. В результате проведенных экспериментов было установлено, что состав среды культивирования бактерий, титр клеток и количество вносимой ДНК не оказывало заметного влияния на частоту трансформации.

Для введения плазмидной ДНК оптимальным условием являлась предобработка клеток *C. acetobutylicum* 30% раствором ПЭГ–6000. При этом эффективность трансформации метилированной плазмиды pSOLAMY43 составила $4,5 \times 10^2$ на 1 мкг плазмидной ДНК. В аналогичных условиях плазида, не подвергавшаяся метилированию, не трансформировалась. Отбор трансформантов производился на плотной питательной среде с добавлением эритромицина в

концентрации 20 мкг/мл. Наличие плазмиды pSOLAMY43 в клетках *C. acetobutylicum* 5Н доказывали с использованием электрофоретического и ПЦР-анализа.

Список литературы

1. Electroporation Protocols for Microorganisms // Mary K. Phillips-Jones et al. - Methods in Molecular Biology, Vol. 47, 23. Recombinant DNA into Clostridium spp. - Krebs Institute for Biomolecular Research, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK. - 1995.
2. Handbook on Clostridia // Dürre P. et al. – Taylor & Francis Group, LLC. - 2005.
3. Mermelstein L.D., Papoutsakis E.T. In vivo methylation in *Escherihia coli* by the *Bacillus subtilis* Phage ϕ 3T I methyltransferase to protect plasmide from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. – Microbiology, Vol. 59 No4. – 1993.
4. Nakotte S., Schaffer S., Böhringer M., Dürre P. Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. – Biotechnology letters, Vol.14 No4. – 1992.
5. Sang Y.L., Bennett N.G., Papoutsakis E.T. Construction of *Escherihia coli*-*Clostridium acetobutylicum* shuttle-vectors and transformation of *Clostridium acetobutylicum* strains.- Biotechnology letters, Vol.14 No5. – 1992.
6. Sang Y.L., Mermelstein D.L., Bennett N.G. Vector construction, transformation and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. - Bio-Technology 10: 190-195. - 1992.

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ ДЕРМАТОМИЦЕТОВ, ЦЕННЫХ В ДИАГНОСТИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ

Кухар Е.В.

*Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Астана,
Республика Казахстан, e-mail: kucharev@mail.ru*

Промышленные штаммы микроорганизмов являются, национальным достоянием государства и подлежат строгому учету и хранению. Они представляют большую ценность и широко используются в промышленности для производства различной целевой продукции [1].

Грибы-дерматомицеты способны вызвать поражения кожи, которые представляют опасность для человека и животных. Они представлены 39 различными видами родов *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton* [2].

Большой практический интерес в диагностике дерматомикозов имеют штаммы для производства вакцинных препаратов или специфических антигенов, которые используют для получения диагностикумов и тест-систем. Чаще всего дерматомицеты закладываются на хранение в различных коллекциях как перспективные продуценты или как контрольные штаммы для проверки иммуногенности [3, 4].

Целью работы является выделение, характеристика и создание коллекции дерматомицетов – продуцентов специфических антигенов.

За период 2012-2014 гг. при выполнении НИР в рамках бюджетной 055 программы МОН РК по проекту «Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии», из патологического материала человека и животных выделено чистых культур – 167, идентифицировано, в т.ч. молекулярно-генетическими методами – 109 штаммов [5].

Полученные результаты позволили приступить к работе по созданию коллекции возбудителей дерматомикозов, ценных в диагностическом отношении, и подготовке учебных экспонатов культур [6].

Дерматомицеты депонировали в Коллекции микроорганизмов РГП «НИИ проблем биологической безопасности» РГКП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК. Для учебных целей создали экспонаты культур.

Подбор клинических и эпизоотических штаммов осуществлялся на основании характерных культурально-морфологических признаков, биохимических свойств и молекулярно-генетической идентификации штаммов. После проведения полной идентификации штаммов дерматомицетов отработывали метод хранения, готовили паспорта культур, проводили процедуру депонирования и изготовление экспонатов для учебных целей.

Проведен анализ жизнеспособности и поддержки в жизнеспособном состоянии 109 ценных штаммов микроорганизмов. Отработаны методы хранения грибов: субкультивирование с выживаемостью 95%; хранение под вазелиновым маслом – 92,5%; на голодном агаре – 85%; криохранение – 90% и лиофилизация с выживаемостью 100%.

Основанием для депонирования штаммов как продуцентов специфических антигенов служили показатели серологических реакций. Высокий уровень специфической активности указывает на возможность использовать данные штаммы как перспективные продуценты. Всего к депонированию подготовлено 36 штаммов грибов, депонировано – 17 (см. таблицу).

Таблица – Результаты инвентаризации культур микромицетов за 2012-2014 г.

Вид возбудителя	Количество штаммов	Из них лиофилизировано	Из них депонировано	Подана заявка на патент РК
<i>Trichophyton rubrum</i>	3	3	4	1
<i>T. interdigitale</i>	6	5	4	1
<i>T. tonsurans</i>	1	1	1	-
<i>T. violaceum</i>	1	1	-	-
<i>T. verrucosum</i>	2	1	3	-
<i>T. mentagrophytes</i>	1	-	-	-
<i>Microsporum canis</i>	8	8	1	1
Дрожжи	2	2	2	-
Плесени	85	4	4	-
Итого:	109	36	19	3

В дальнейшем проведена процедура депонирования штаммов с целью регистрации, хранения, защиты от неправомерного использования, выдачи образца в соответствии с установленными правилами. На три штамма подана заявка на выдачу патента РК.

Подготовлены учебные экспонаты дерматомицетов и плесеней: возбудители трихофитии: *T. verrucosum* – 1 штамм; *T. interdigitale* – 4 штамма; *T. rubrum* – 5 штаммов; *T. tonsurans* – 1 штамм; *T. mentagrophytes* – 1 штамм; возбудители микроспории: *M. canis* №13; оппортунистические возбудители дерматомикозов: *Eurotium rubrum* №152; *Scopulariopsis brevicaulis* №198 и другие. Использование экспонатов в качестве наглядного пособия позволяет длительно наблюдать визуально видимые культуральные признаки дерматомицетов, что делает их ценными в учебном процессе.

Список литературы

1. Уткина Е.А., Гаврилова Е.Б. Депонирование микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры. – М., 2011. – С. 7.
2. Тарасенко Г.В. Современные аспекты практической микологии // Росс. журнал кож. и вен. болезней. – 2006. – №6. – С. 9-61.

3. Кухар Е.В. Биотехнология препаратов для диагностики дерматомикозов. Научная монография. – Астана, 2010. – 189 с.
4. Толеутаева С.Т. Технология изготовления антигенов из культур дерматофитов для постановки серологических реакций // Актуальные вопросы диагностики болезней животных: сб. мат. II межд. конф. – Исследования и результаты. – Алматы, 2005.– С. 325-326.
5. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии (промежуточный) / Отчет о НИР. – Инв.№ 0213РК01810. – Астана, 2014. – 98 с.

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ *TRICHODERMA VIRIDE* БИМ F-578 Г

Мороз И.В., Михайлова Р.В., Лобанок А.Г., Капустина Ю.М.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: irmorz@gmail.com

Целлюлоза представляет собой линейный полимер глюкозы. Структура молекулы этого природного полисахарида обеспечивает высокую устойчивость к внешним воздействиям. Ее деструкцию катализируют ферменты целлюлазного комплекса, которые относятся к О-гликозид-гидролазам (КФ 3.2.1). Целлюлазы широко используются в пищевой, текстильной, деревообрабатывающей, фармацевтической отраслях промышленности, в производстве биоэтанола, моющих средств, в технологиях переработки различных отходов. Важной областью применения целлюлолитических ферментов является кормопроизводство.

Известно, что в природе ферменты, осуществляющие биodeградацию целлюлозы, продуцируются в основном грибами и бактериями. Однако только грибы способны в большом количестве выделять целлюлазы в среду, а получение препаратов на основе внеклеточных ферментов является экономически более выгодным. В качестве промышленных продуцентов целлюлаз наиболее часто используют различные штаммы грибов рода *Trichoderma*. Это обусловлено не только их высокой секреторной способностью, но также и разнообразием продуцируемых ферментов с различной субстратной специфичностью.

Ранее нами проведен двухэтапный скрининг продуцентов ферментов целлюлолитического действия среди коллекционных и выделенных из природной среды грибных культур. В качестве перспективного продуцента отобран штамм *Trichoderma viride* БИМ F-578 Г [1]. Образование ферментов микроорганизмами зависит не только от видовой принадлежности продуцентов, но и состава питательных сред, используемых для их выращивания. Цель данной работы – изучение влияния компонентов питательной среды на образование целлюлазы *Tr. viride* БИМ F-578 Г.

Активность целлюлазы измеряли калориметрическим методом, основанным на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии фермента на субстрат – Na-КМЦ [2].

Глубинное культивирование *Tr. viride* БИМ F-578 Г проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (180–200 об/мин) при 28 °С в течение 4 сут. Исходная среда имела солевой состав, аналогичный составу среды Чапека. Исследовали влияние на биосинтез целлюлазы грибом различных источников углерода, азота, факторов роста, а также их комбинаций. В состав среды добавляли (%): свекловичный жом, мелассу, фильтровальную бумагу, Na-КМЦ – 0,5-2,0 %; пшеничные отруби, солодовые

ростки – 0,2-0,5 %; экстракт солодовых ростков – 0,5-2,0 %; глюкозу – 0,05-0,2 %; лактозу – 0,2-0,4 %; нитрат аммония, натрий азотнокислый, аммоний сернокислый – 0,04-0,1 %; пептон – 0,05-0,15 %; мочевины – 0,015-0,3 %; дигидрофосфат калия – 1,0-3,0 %; дрожжевой экстракт – 0,05-0,5 %; холина хлорид и метионин – 0,05-1,0 мМ.

Следует отметить, что источник углерода имеет особое значение для грибов-продуцентов целлюлаз, так как он не только обеспечивает рост мицелия, но и может регулировать биосинтез ферментов. Установлено, что уровень образования целлюлазы *Tr. viride* БИМ F-578 Г в значительной степени зависит от используемого источника углерода и варьирует от 0,014 до 0,47 ед/мл. Максимальное значение активности целлюлазы выявлено при выращивании гриба на средах, содержащих свекловичный жом (2 %) совместно с пшеничными отрубями (0,5%), а также лактозу (0,2 %) и глюкозу (0,2 %).

Важным фактором, влияющим на рост микроорганизмов и синтез ферментов, является источник азотного питания. Сравнительный анализ результатов исследования влияния различных источников азотного питания на продуцирование целлюлазы *Tr. viride* БИМ F-578 Г показал, что наиболее активный синтез фермента (0,58 ед/мл) наблюдается при одновременном использовании в среде NaNO_3 (0,5 %) и мочевины (0,03 %). В качестве источника фосфора следует использовать – дигидрофосфат калия (3,0 %). Для стимуляции биосинтеза целлюлазы (в состав питательной среды для культивирования продуцента целесообразно включать в качестве источника витаминов дрожжевой экстракт (0,1 %) и аминокислоту метионин (0,5 %) (увеличение в 1,6 и 1,2 раза соответственно)

Таким образом, определен состав питательной среды для глубинного культивирования продуцента целлюлазы – *Tr. viride* БИМ F-578 Г. Полученные данные будут использованы при создании биотехнологии получения ферментного препарата целлюлолитического действия.

Список литературы

1. Мороз И.В., Михайлова Р.В., Шахнович Е.В., Лобанок А.Г. Использование экспресс-методов при скрининге грибных продуцентов целлюлаз // Фитогормоны, гуминовые вещества и другие биологически активные соединения для сельского хозяйства, здоровья человека и охраны окружающей среды: Матер. IX Междунар. конф. daRostim 2013, Львов, 07-10 октября 2013 г. / Львовская политехника; В.Новиков (отв. ред.) [и др.] – Львов: Издательство Львовской политехники, 2013. – С. 91-92.
2. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β глюкоканазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: МВИ.МН 3235–2009. – Введ. 30.09.09. – Минск : РУП «Белорус. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA TOWARDS PATHOGENIC MICROORGANISMS

Naidenko I.A., Denisenko V.V., Safonova M.E.

*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: microbio@mbio.bas-net.by*

The ability to effectively inhibit growth and reproduction of pathogenic and opportunistic pathogenic microorganisms is one of the most important criteria for evaluating the prospects of using strains of lactic acid bacteria as a basis of probiotic preparations. The antagonistic activity of these bacteria is determined by production of metabolites such as organic acids (lactic acid, acetic acid), ethanol, hydrogen peroxide, diacetyl, acetaldehyde, acetoin, reuterin, bacteriocins, lysozyme, etc. Rate of growth and reproduction of cell populations, adhesion, competition for nutrients also play a certain role in implementation of the mechanism of antimicrobial activity [1-3]. Relevant studies are aimed at selecting new strains of lactic acid bacteria showing antagonistic activity against pathogenic microorganisms.

Antagonistic activity of collection strains of lactic acid bacteria and isolates from various natural sources belonging to the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* was examined on solid nutrient media by agar diffusion method [4]. Lactic acid bacteria were maintained on a MRS medium [5]. Strains of pathogenic bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Mannheimia haemolytica* provided by researches of S.N. Vyshel'ski Institute of Experimental Veterinary Studies were used as test cultures.

Majority of investigated lactic acid bacteria displayed to some extent antagonistic activity toward six of the nine pathogenic test cultures (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium* sp.). Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from natural sources was higher than that of deposited strains.

Most studied cultures showed antagonistic activity in regard to *Salmonella typhimurium*: 58 out of 64 strains (about 91%) of lactic acid bacteria to some extent inhibited growth of the pathogen. Over half of all investigated strains exhibited antagonism to *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis* and *Clostridium* sp.: percentage with specific test culture activity was 75%, 69%, 66%, 60% and 58%, respectively. About 40% of the examined strains were antagonistically active against *Streptococcus* sp. and *Klebsiella pneumoniae*. The lowest ratio of antagonists among studied lactic acid bacteria (20%) was found in relation to *Mannheimia haemolytica* (figure).

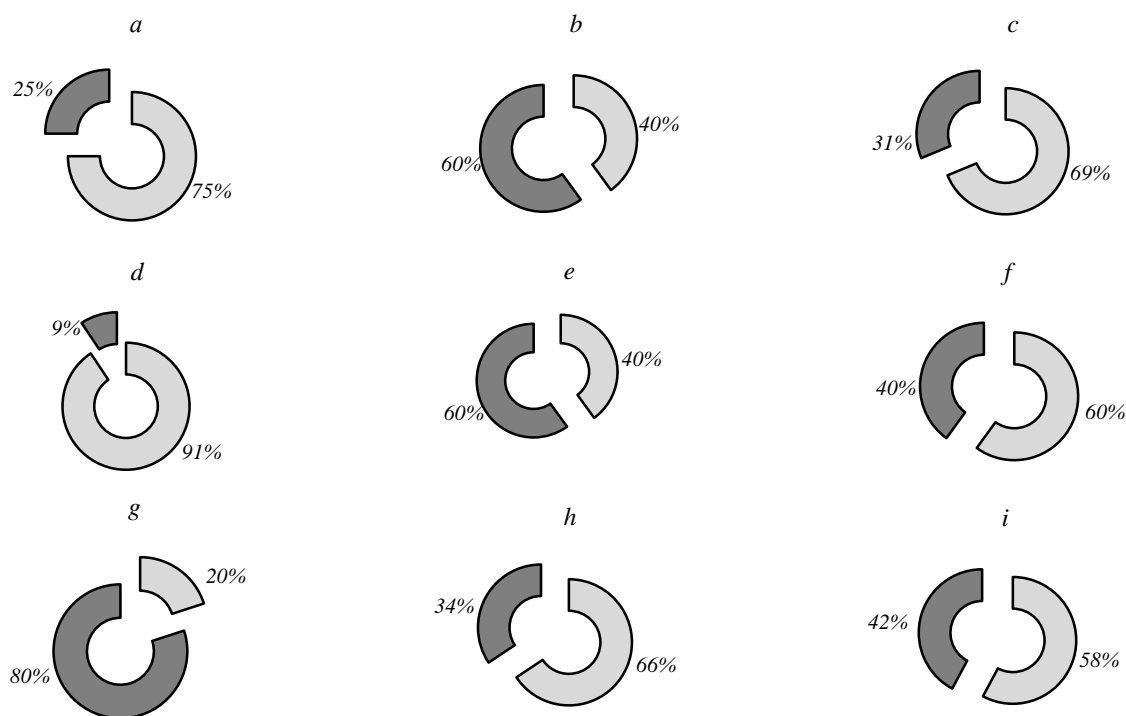


Figure – Antagonistic activity of lactic acid bacteria against pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus* (a), *Streptococcus sp.* (b), *E. coli* (c), *Salmonella typhimurium* (d), *Klebsiella pneumoniae* (e), *Proteus mirabilis* (f), *Mannheimia haemolytica* (g), *Listeria monocytogenes* (h), *Clostridium sp.* (i):
 ■ – strains with antagonistic activity, ■ – inactive strains

Bacteria of the genus *Lactobacillus* prevailed among antagonistically active strains.

The completed studies resulted in selection of promising strains of lactic acid bacteria with unique spectra of antagonistic activity, to be further used as a basis of targeted probiotic preparations.

References

1. Jack, R. W. Bacteriocins of Grampositive bacteria / R. W. Jack, J. R. Tagg, B. Ray // Microbiological Reviews. – 1995. – Vol. 59. – P. 171-200.
2. Juven, B.J. Antagonistic effects of Lactobacilli and Pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry / B.J. Juven, R.J. Meinersmannand, N.J. Stern // J. Appl. Bacteriol. – 1991. – Vol. 70. – P. 95-103.
3. Rolfe, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health / R.D. Rolfe // J. Nutr. – 2000. – Vol. 130. – P. 396S-402S.
4. Egorov N.S. Antagonistic microorganisms and biological methods for antibiotic activity assays. – Moscow: Visshaya shkola, 1965. – 211 p.
5. Man, J.C. A medium for the cultivation of Lactobacilli / J.C. Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol.23. – P.130-135.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Плотникова Д.Т., Сидоренко А.В., Новик Г.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: danochka1991@yandex.ru

В настоящее время в связи с интенсивным развитием биотехнологии и активным использованием микроорганизмов в производственных процессах большое внимание уделяется генетической паспортизации промышленных, выделенных из природных источников и коллекционных штаммов, обладающих практически ценными признаками, с целью их мониторинга и правовой защиты. Для этой цели наибольшее распространение нашли методы молекулярного типирования, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, специфичными к коротким повторяющимся последовательностям ДНК, находящимся в некодирующей области бактериального генома. Поскольку размер, количество и расположение этих последовательностей в геноме микроорганизмов индивидуально, для каждого штамма можно получить уникальный фингерпринт, состоящий из набора отличающихся продуктов ПЦР [1-3].

Бактерии рода *Lactococcus* широко используются в составе лечебно-профилактических препаратов, заквасок для молочной и мясной промышленности, в качестве продуцентов бактериоцинов (низина), витаминов, аминокислот, органических кислот. В связи с этим, выявление штаммовых генетических отличий и генетическая паспортизация данных микроорганизмов имеют большое практическое значение.

Цель работы – молекулярное типирование коллекционных и выделенных из природных источников штаммов *Lactococcus lactis* с использованием различных методов.

Объектами исследования являлись 22 штамма бактерий *Lactococcus lactis*: 9 штаммов из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и 13 штаммов, выделенных из самоквасных молочных продуктов. Молекулярное типирование проводили с помощью методов ERIC-ПЦР, BOX-ПЦР, (GTG)₅-ПЦР.

Анализ фингерпринтов лактококков, полученных с помощью различных методов молекулярного типирования, показал, что ни один из них не позволяет получить уникальные профили для каждого штамма. При этом штаммы, имеющие идентичные фингерпринты при использовании одного метода, отличались по набору ампликонов, получаемых с помощью других методов типирования. Так, анализ продуктов ERIC-ПЦР, выявил идентичность фингерпринтов 6 культур, выделенных из природных источников (продукты ПЦР размером 450 и

2500 п.н.), 5 коллекционных культур (200, 350 и 750 п.н.), а для 4 коллекционных и 7 выделенных культур лактококков были получены уникальные профили, содержащие 4–9 ампликонов размером от 100 до 4000 п.н. При проведении ВОХ-ПЦР специфичные фингерпринты были получены для 12 штаммов лактококков, остальные культуры были объединены в три группы: генетические профили 3 штаммов были представлены ампликонами размером 550 и 1100 п.н., 5 штаммов – размером 200, 400 и 1100 п.н., 2 штаммов – размером 450, 550, 600, 800, 900, 1100 п.н. Генетические профили лактококков, полученные с помощью (GTG)₅-ПЦР, были специфичными у 4 коллекционных штаммов, идентичными у 5 коллекционных штаммов (группа 1) и 13 культур, выделенных из природных источников (группа 2). Для (GTG)₅-ПЦР это может быть связано с низким процентным содержанием GC-пар в ДНК лактококков.

Полученные результаты согласуются со сведениями литературы и свидетельствуют, что для получения корректных данных о генетическом разнообразии бактерий *L. lactis* и их генетической паспортизации необходимо использовать несколько методов молекулярного типирования.

Работа выполнена в рамках задания 3.22 «Молекулярно-генетическая идентификация, таксономическая ревизия и характеристика культур микроорганизмов из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов» ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» (2011–2015 гг.).

Список литературы

1. Gevers D., Huys G., Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species // FEMS Microbiol. Let. – Vol. 205. – 2001. – P. 31-36.
2. Prodelavova J., Spanova A., Rittich B. Application of PCR, rep-PCR and RAPD-techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains // Folia Microbiol. – Vol. 50 (2). – 2005. P. 150-154.
3. Van Horde K., Vandamme P., Huys H. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses // Dairy Sci. Technol. – Vol. 88. 2008. – P. 445-455.

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНА ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS*, СЛИТОГО С ГЕНАМИ БЕЛКОВ-ПАРТНЕРОВ

Радевич Д.С.¹, Рымко А.Н.¹, Казловский И.С.², Квач С.В.¹,
Зинченко А.И.^{1,2}

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

²МГЭУ им. А.Д. Сахарова, Минск, Республика Беларусь, e-mail: info@iseu.by

Некоторые циклические динуклеозидмонофосфаты (цикло-диНМФ) являются мощными иммуностимуляторами, благодаря чему их можно использовать в качестве терапевтических агентов для лечения и профилактики ряда заболеваний, а также в качестве адъювантов для вакцин.

Одним из наиболее перспективных цикло-диНМФ является циклический 3',5'-диаденозинмонофосфат (цикло-диАМФ) – бактериальный внутриклеточный посредник, участвующий в регуляции таких важных физиологических процессов, как репарация ДНК и споруляция. В зарубежной литературе описаны адъювантные свойства этого соединения [1], а также его способность индуцировать синтез интерферонов I типа [2, 3] клетками позвоночных, что делает цикло-диАМФ перспективным соединением для лечения ряда вирусных заболеваний.

В настоящее время цикло-диАМФ получают методом химического синтеза. Однако данный метод характеризуется многостадийностью и низким выходом целевого продукта, а также требует использования токсичных и труднодоступных реагентов. Альтернативный биокаталитический способ получения цикло-диАМФ представляет собой одностадийный процесс конденсации двух молекул АТФ с использованием бактериального фермента диаденилатциклазы [4]. Суперпродукция диаденилатциклазы в клетках специально сконструированных штаммов *Escherichia coli* характеризуется низким выходом целевого продукта по причине формирования телец включения – неактивных водонерастворимых белковых агрегатов [5].

Повышать растворимость целевых белков можно путем клонирования кодирующих их генов в различные плазмидные векторы, несущие гены белков-партнеров. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось создание набора генетических конструкций, содержащих ген диаденилатциклазы *Bacillus thuringiensis*, слитый с генами, кодирующими различные белки-партнеры.

На первом этапе работы методом ПЦР амплифицировали гены белков-партнеров: *dsbC* (кодирует дисульфидизомеразу *E. coli*), *dsbA* (кодирует дисульфидоксидоредуктазу *E. coli*), *nusA* (кодирует N-утилизирующую субстан-

цию *A. E. coli*), *trx* (кодирует белок тиоредоксин *E. coli*) и *sumo* (кодирует небольшой убиквитин-подобный белок Sumo *Saccharomyces cerevisiae*); а также нуклеотидные последовательности *azuLid* и *pelB* (кодируют лидерные пептиды бактериальных белков азурина и пектатлиазы *Pseudomonas aeruginosa*, соответственно). На втором этапе исследования амплифицировали ген *disA*, кодирующий целевой белок диаденилатциклазу *B. thuringiensis*. На следующем этапе работы методом ПЦР получена линейная форма вектора pET42a(+), обозначенная pET42lin. На заключительном этапе работы на основе вектора pET42lin методом продолжительной перекрывающейся ПЦР собирали конструкции, несущие ген целевого белка в слиянии с геном белка-партнера.

Благодаря наличию в векторе pET42a(+) гена *gst*, путем линейаризации исходного вектора в одну стадию получен линейный вектор, позволяющий получать химерную конструкцию целевого белка с глутатион-S-трансферазой.

Таким образом, в результате выполненной работы, сконструирован набор генно-инженерных конструкций, содержащих ген диаденилатциклазы *B. thuringiensis*, слитый с генами, кодирующими различные белки-партнеры.

Список литературы

1. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: Strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant / T. Ebensen [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 5210–5220.
2. Parvatiyar, K. Helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response / K. Parvatiyar [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – P.1155–1161.
3. The *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced *Goldenticket* mouse mutant reveals an essential function of *sting* in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides / J.D. Sauer [et al.] // *Infect. Immun.* – 2011. – Vol. 79, N 2. – P. 688–694.
4. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates / G. Witte [et al.] // *Mol. Cell.* – 2008. – Vol. 30, N 2. – P. 167–178.
5. Papanephytou, C.P. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review / C.P. Papanephytou, G. Kontopidis // *Protein Exp. Purif.* – 2014. – Vol. 94. – P. 22–32.

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРМОПРОИЗВОДСТВА НА БАЗЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ НИЗШИХ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

Рожкова А.М.^{1,2}, Мерзлов Д.А.^{1,2}, Чекушина А.В.¹, Рубцова Е.А.¹,
Зоров И.Н.^{1,2}, Матыс В.Ю.³, Немашкалов В.А.³, Сеницын А.П.^{1,2}

¹Федеральный Исследовательский Центр «Фундаментальные Основы Биотехнологий» Российской академии наук, Москва, Россия,

e-mail: amrojkoval@yahoo.com

²Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, Московская область, Пушкино, Россия

Низшие грибы, как продуценты ферментов, используемых в различных биотехнологических процессах, являются незаменимыми объектами для генно-инженерных модификаций с целью получения ферментных комплексов, отвечающих требованиям современной биоиндустрии.

В Лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ ФОб РАН, совместно с Лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров МГУ им. М.В.Ломоносова и Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина проводятся систематические исследования возможностей микромицетов рода *Penicillium* для использования их ферментативных комплексов, в том числе, в кормопроизводстве.

Как известно, зерно, являющееся основой любых комбикормов, содержит набор некрахмальных полисахаридов (НПС), которые являются антипитательным фактором и затрудняют процесс переваривания комбикорма. Важнейшими НПС злаков являются β -глюкан и ксилан. Именно вязкие растворы β -глюканов и арабино-ксиланов, не гидролизующихся в желудочно-кишечном тракте, являются основным источником проблем при скармливании ячменя и ржи, и, отчасти, пшеницы (в зависимости от ее вязкости). Поэтому одной из основных составляющих производства современных комбикормов является использование в рецептурах ферментных препаратов целлюлаз (преимущественно, β -глюканаз) и ксиланаз для коррекции антипитательных факторов и улучшения усвояемости компонентов кормов.

Другой, не менее важной, проблемой кормопроизводства является сохранение активности ферментных препаратов при прохождении процедуры грануляции корма. Исходя из технологического процесса приготовления комбикорма, минимальным требованием является способность фермента сохранять активность при обработке в температуре 85°C. В настоящий момент ведущие производители предлагают ферменты, устойчивые при температуре 90°C.

Таким образом, используя экспрессионную систему грибов рода *Penicillium*, а также разработанную методологию создания рекомбинантных штаммов и ферментных препаратов на их основе, был получен ряд новых ферментных комплексов с гетерологичной активностью термостабильной неингибируемой ксиланазы и β -глюканазы. Прикладные тесты на субстратах ячменя и ржи показали снижение относительной вязкости растворов при применении новых ферментных препаратов в сравнении с ферментными препаратами, полученными на основе исходного штамма, а также популярного коммерческого препарата Rovabio (фирма «Adisseo», Франция).

ОСОБЕННОСТИ РОСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР В СОСТАВЕ ПОЛИВИДОВОГО КОНСОРЦИУМА

Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А., Грель М.В.

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

Поливидовые консорциумы пробиотических культур и молочнокислых стартовых заквасок широко используются при производстве ферментированных молочных продуктов и сыров. Основными компонентами поливидовых заквасок в пищевой промышленности являются лактококки, стрептококки, лактобациллы и бифидобактерии. Данные литературы свидетельствуют о том, что при совместном культивировании нескольких видов микроорганизмов возможно усиление или ослабление некоторых биологических свойств культур в смешанной популяции по сравнению с монокультурами [1-4]. Взаимодействие между различными штаммами в поливидовых консорциумах пробиотических бактерий может приводить к стимуляции, ингибированию роста и метаболической активности отдельных штаммов, или отсутствию эффекта. При использовании в многокомпонентных консорциумах бактерий со сходными пищевыми потребностями из-за различий в скорости роста, конкуренции за источники питания, присутствия антимикробных соединений, возможны изменения продукции тех или иных метаболитов, активности кислотообразования, антагонистической активности, продукции ферментов, витаминов и др. биологически активных веществ. Помимо положительных эффектов микробные взаимодействия могут приводить к нежелательным результатам при производстве и хранении ферментированных продуктов, влиять на вкусовые качества и безопасность продуктов [2], что необходимо учитывать при разработке технологий получения биопрепаратов и функциональных продуктов.

Исследование особенностей развития культур бифидо- (ББ), молочнокислых (МКБ) и пропионовокислых (ПКБ) бактерий, отобранных в состав поливидового препарата пробиотика, показало, что штаммы *B. adolescentis* Cf, *Lactobacillus* sp. 23 и *Propionibacterium* sp. активно растут на модифицированной среде MRS в условиях как отдельного, так и совместного культивирования. При отдельном выращивании бифидобактерий, молочнокислых и пропионовокислых бактерий активная кислотность составила 4,5, 4,37, 4,34; титруемая кислотность – 164⁰Т, 120⁰Т, 130⁰Т, соответственно. При культивировании смешанной культуры накопление биомассы и уровень кислотообразования увеличивались. Максимальное увеличение биомассы (более 30%) отмечено при использовании инокулята, содержащего бактерии в равном объемном соотношении. Совместное культивирование бактерий позволило также получить наиболее высокий показатель колониеобразующей активности – log КОЕ консорциу-

ма штаммов составил 10,2 – 10,32, что на порядок выше показателей монокультур бифидо- и молочнокислых бактерий и значительно выше жизнеспособности пропионовокислых бактерий (таблица).

Таблица – Рост и кислотообразование бактерий компонентов консорциума при
раздельном и совместном культивировании

Варианты	ББ	МКБ	ПКБ	ББ : МКБ : ПКБ 1 : 1 : 1	ББ : МКБ : ПКБ 2 : 0,5 : 0,5
log КОЕ	9,36	9,3	7,3	10,32	10,2
Биомасса, мг/мл	1,26	1,2	1,1	1,56	1,38
pH	4,5	4,37	4,34	4,4	4,39
Титруемая кислотность, °Т	164	120	130	176	170

В смешанной культуре установлено увеличение продукции β-галактозидазы у бифидобактерий от 670 до 745 - 810 ед. Миллера в зависимости от состава консорциума, а также повышение β-глюкозидазной и α-галактозидазной активностей.

Протеолитическая активность, связанная с гидролизом казеина, установлена у всех исследуемых культур. Пролинаминопептидаза наиболее активна в культуральной жидкости бифидобактерий, лейцинаминопептидаза – у молочнокислых бактерий. У пропионовокислых бактерий показана активность всех исследованных ферментов белкового метаболизма. В условиях совместного культивирования активность протеолитических ферментов не изменялась.

Таким образом, установлено увеличение накопления биомассы, колониеобразующей активности консорциума, α- и β-галактозидазной активностей при культивировании смешанной культуры отобранных штаммов бифидо-, молочнокислых и пропионовокислых бактерий, что имеет важное значение для разработки и совершенствования технологий получения пробиотических препаратов и комбинированных заквасок.

Список литературы

- 1 Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus? / M. C. Collado [et al.] // J. Dairy Sci. – 2007. – Vol. 90. – P. 2710–2716.
- 2 Hassan, A. Nutritional evaluation of yoghurt prepared by different starter cultures and their physicochemical analysis during storage / A. Hassan, I. Amjad // Afr. J. Microbiol. Res. – 2010. – P. 22-26.
- 3 Coculture of *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* alters their protein expression profiles and enzymatic activities / L. Ruiz [et al.] // Int J Food Microbiol. – 2009. – Vol. 133. – P. 148–153.
- 4 Enhancement of functional characteristics of mixed lactic culture producing nisin Z and exopolysaccharides during continuous prefermentation of milk with immobilized cells / F. Grattepanche [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2007. – Vol. 90. – No. 12. – P. 5361-5373.

ПОЛИМОРФИЗМ *NOD* И *BET* ГРУПП ГЕНОВ У ШТАММОВ *SINORHIZOBIUM MELILOTI*

Саксаганская А.С., Субботина А.Р., Черкасова М.Е.,
Мунтян В.С., Румянцева М.Л.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия,
e-mail: allasaksaganskaya@mail.ru, genet@yandex.ru

Симбиоз между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями формируется на основе молекулярного сигналинга [1]. Сигнальными молекулами клубеньковых бактерий (ризобий) являются Nod-факторы, синтез которых детерминируется *nod* генами. Гены *nod*-группы могут быть как «общими», представленными у всех ризобий (*nodA*, *nodB* и *nodC*), так и видоспецифичными (например, *nodH* детерминирует сульфатирование Nod-фактора у *S. meliloti*). Недавно показано, что увеличение типов синтезируемых Nod-факторов может происходить под влиянием соли [2], что позволило авторам выдвинуть предположение, что NaCl может являться непосредственным индуктором *nod* генов.

Солеустойчивость клубеньковых бактерий контролируется группой *bet* генов, детерминирующих синтез и транспорт осмопротекторов – бетаинов [3], которые, как оказалось, могут являться индукторами *nod* генов [4].

Исходя из того, что солевой стресс может оказывать влияние на активность *nod* генов, а стрессоустойчивость и жизнеспособность бактерий зависит от активности *bet* генов, представляло интерес оценить структурно-функциональную взаимосвязь двух групп генов у 109 природных штаммов *S. meliloti*, различающихся по географическому происхождению.

Сопряженный анализ полиморфизма *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC* и *nodH*) и *bet* генов (*betC*, *betB*, *betA* и *betB2*) выявил 13 типов сочетаний типовых и измененных аллелей генов у 109 природных штаммов *S. meliloti*. Эти типы были разделены на четыре группы: I (типовая структура обеих групп генов – сходная с таковой у тест-штамма Rm1021 [5]), II (структурные изменения только у *nod* генов), III (структурные изменения только у *bet* генов) и IV (структурные изменения в обеих группах генов). Доли этих групп составили 0,17, 0,36, 0,19 и 0,28, соответственно. Было проанализировано наличие неравновесия по сцеплению типовых и измененных аллелей исследуемых генов. Показано неслучайное наследование аллелей генов плазмидного *nod*-оперона с генами *betC* и *betB* хромосомного оперона и плазмидного гена *betB2*. Вместе с тем, установлено отсутствие неравновесия по сцеплению между анализируемыми группами генов у штаммов, выделенных из района экстремального засоления. Полученные данные свидетельствуют об активных рекомбинационных процессах в районе При-

аралья, обусловленных сужением спектра растений-хозяев и адаптационными процессами.

Данная работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (14-04-01441а и 15-04-09295а).

Список литературы

1. Denarie J., Debelle F., Prome J.C. *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis // Ann. Rev. Biochem. – 1996. – Vol. 65. – P.503-535.
2. Guasch-Vidal et al. High NaCl Concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2013. – Vol. 26. – P.451-460.
3. Румянцева М. Л., Мунтян В.С. Клубеньковые бактерии *Sinorhizobium meliloti* : солеустойчивость и ее генетическая детерминированность // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 263-280.
4. Cooper J.E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue // J. Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 103. – P.1355–1365.
5. Meade H.M., Signer E.R. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti* // PNAS. – 1977. – Vol. 74. – P.2076-2078.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА 16S рРНК В ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Савич В.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: savichvv@list.ru

Род *Pseudomonas* представляет собой группу микроорганизмов, занимающую разнообразные экологические ниши и распространённую повсеместно. Это обусловлено их высокой способностью к адаптации к неблагоприятным условиям и возможностью утилизировать и синтезировать широкий спектр метаболитов. В настоящее время насчитывается 222 представителя данного рода, и количество видов постоянно возрастает [1]. Фенотипические методы не могут обеспечить точную и быструю идентификацию всего многообразия видов, поэтому распространение получают молекулярно-генетические методы идентификации, такие как секвенирование по 16S рРНК. Этот ген присутствует у всех бактерий, к тому же он достаточно консервативен, что позволяет принимать число случайных мутаций за единицу времени [2].

В лаборатории “Коллекция микроорганизмов” проведена идентификация видов, предположительно относящихся к виду *Pseudomonas*. Изучаемые штаммы выделили с листьев земляники и рододендрона. Всего исследовано 8 штаммов бактерий. Все изучаемые культуры оказались представителями рода *Pseudomonas*. В результате исследования 2 штамма были идентифицированы как *P. koreensis*, 2 – как *P. reinekei*, и один – как *P. jessenii*. Для 3 культур установлена принадлежность только к данному роду. Использование секвенирования по 16S рРНК позволило определить принадлежность исследуемых штаммов до вида *Pseudomonas*, но для идентификации до вида в некоторых случаях применялись биохимические тесты.

Также дополнительно была проведена реидентификация 4 штаммов, таксономическое положение которых ранее было установлено с помощью биохимических и морфологических тестов. Родовая принадлежность была подтверждена для 3 культур. Из них 2 культуры, ранее описанные как *P. fluorescens*, реидентифицированы в *P. marginalis* и *P. moraviensis*. Оставшийся штамм (ранее *Pseudomonas* sp.) был распознан как *P. arsenicoxydans*. Четвертая культура оказалась представителем рода *Variovorax*.

Использование секвенирования по 16S рРНК может быть успешно применено для идентификации бактерий до рода и вида, но в некоторых случаях для более точного определения таксономического положения необходимо использования биохимических тестов. Так как белок-кодирующие гены эволюционируют быстрее рРНК генов [3], обеспечивая более высокую разрешающую спо-

способность, то в дальнейшем планируется использовать уже в идентификации ген *gyrB*, кодирующего субъединицу В ДНК-гиразы.

Список литературы

1. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html> (на 30 июня 2015 года).
2. Patel J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory // Mol Diagn. – 2001. – Vol. 6, № 4. – P.313-321.
3. Yamamoto S., Harayama S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. // Int J Syst Bacteriol. – 1998. – Vol.48, Pt. 3 – P.813-819.

АНАЛИЗ ПРОМОТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, РЕГУЛИРУЕМЫХ СТРЕСС-ФАКТОРАМИ

Сацункевич Н.Е., Муратова А.А., Титок М.А.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: m_titok@yahoo.com*

Генетическая инженерия представляет собой совокупность экспериментальных процедур, которые позволяют осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой. В настоящее время большое количество векторных систем разработано для бактерий рода *Bacillus*, так как данные бактерии имеют важное практическое значение: они широко используются в различных процессах ферментации при промышленном получении антибиотиков и ферментов и в этом отношении обладают рядом ценных свойств, таких как способность секретировать синтезируемый белковый продукт в культуральную жидкость, способность расти на дешёвых субстратах и обладают продуктивностью на один-два порядка выше, чем у грамотрицательных бактерий. Для получения экспрессии целевых генов важно иметь хорошо изученные регуляторные последовательности, в частности сильные конститутивные и индуцибельные промоторы. Целью настоящей работы являлся анализ промоторных последовательностей бактерий рода *Bacillus*, регулируемых стресс-факторами

Для анализа промоторных последовательностей используют репортерные гены, продукты которых легко диагностируются и позволяют качественно и количественно оценить эффективность процесса транскрипции. При выполнении настоящей работы в качестве репортерного использовали детерминанту *lacZ*, определяющую синтез β -галактозидазы. Данный фермент обеспечивает разложение хромогенного субстрата X-gal, в результате чего на плотной питательной среде формируются колонии, окрашенные в синий цвет.

Поскольку предполагали отобрать определенные типы регуляторных последовательностей, а именно, обеспечивающих транскрипцию в условиях отличных от физиологической нормы, дополнительно использовали такие стрессовые факторы, как температура и повышенная осмолярность. В итоге, полученные конструкции содержат промоторные последовательности генов, детерминирующие белки, обеспечивающие в клетке процессы углеводного и энергетического метаболизма, а также определяющие споруляцию, компетентность и образование биопленок. Они определяют транскрипцию чужеродного генетического материала в логарифмической и стационарной фазе роста при физиологической норме (например, промотор гена, детерминирующего синтез цитидиндиоксицитидин-деаминазы), либо при воздействии стрессовых факторов (например, промотор гена, детерминирующего синтез Хаа-Pro дипептидазы).

Следующий этап работы был посвящен конструированию векторных молекул, содержащих заранее определенные промоторные участки. Исходя из данных литературы, использовали промоторы генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *yruA*, поскольку их активация была обнаружена при действии антибиотиков различной химической природ и имеющих различные мишени действия.

С использованием базы данных ГенБанк были сконструированы специфические праймеры, обеспечивающие амплификацию промоторных участков генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *yruA*. В результате ПЦР были получены продукты амплификации искомого размера, далее проводили встраивание промоторов генов *yorB*, *yvgS*, *yheI*, *yruA* в состав базового вектора pALLT.

Для анализа функциональной активности промоторов в присутствии антибиотиков полученные конструкции вводили в бактерии *B. subtilis* BD 194 и добавляли растворы типовых антибиотиков на чашку с бактериями. Наблюдалась зона задержки роста и изменение окраски бактерий в синий цвет, что свидетельствует о функциональной активности клонированных промоторов.

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОДЕГРАДАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ

**Сидоренко А.В.¹, Чернявская М.И.¹, Титок М.А.¹, Глушень Е.М.¹,
Самсонова А.С.¹, Новик Г.И.¹, Синеокий С.П.²**

¹*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: a_sidarenka@mbio.bas-net.by*

²*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва, Россия*

В современных условиях интенсивного развития энергетики, промышленности и сельского хозяйства все более актуальной становится проблема охраны окружающей среды. Наиболее перспективным в экономическом и экологическом плане способом очистки окружающей среды от ксенобиотиков является биотехнологический метод, основанный на использовании микроорганизмов, способных к деградации токсических соединений различной химической структуры. К настоящему времени описаны бактерии разных таксономических групп (роды *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Bacillus* и др.), способные разлагать широкий спектр химических поллютантов. Идея практического использования специально подобранных микроорганизмов-деструкторов в процессах ремедиации природных и производственных сред привлекательна, и в этом направлении осуществляются обширные исследования по выделению и созданию специализированных коллекций таких микроорганизмов. Коллекционный фонд микроорганизмов-деструкторов, включающий идентифицированные и охарактеризованные штаммы, – удобный объект для целенаправленного поиска культур, способных утилизировать ксенобиотики определенной химической структуры; создания штаммов с заданным биодegradативным потенциалом; разработки высокоэффективных и рентабельных природоохранных технологий.

Цель работы – изучение таксономического разнообразия и биодegradативного потенциала бактериальных культур из фонда специализированной коллекции микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков, создаваемой на базе Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

В настоящее время фонд специализированной коллекции микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков включает 45 непатогенных культур бактерий, выделенных методом накопительного культивирования из природных и антропогенно загрязненных источников (почва, бытовые и промышленные стоки) различных регионов Беларуси, Ирака, Ливии, Антарктиды.

Изучение биодegradативного потенциала бактериальных культур из фонда специализированной коллекции показало, что 21 штамм (47 %) утилизирует широкий спектр индивидуальных углеводов (гексан, нонан, гексадекан, нафталин, бензол, толуол, др.), а 18 культур (40 %) способны к деградации нефти и нефтепродуктов, представляющих собой сложную смесь углеводов разной молекулярной массы. Способность к деструкции аминов – высокотоксичных производных аммиака, обнаружена у 13 коллекционных штаммов. Пять коллекционных культур (11 %) являются деструкторами аммонийного азота, 4 штамма (9 %) – эфиров фталевой кислоты, 1 штамм (2 %) – карбоновых кислот, 1 штамм (2 %) – жировых веществ. Полученные результаты свидетельствуют, что исследуемые микроорганизмы могут осуществлять деградацию широкого спектра соединений разной химической структуры, являющихся основными загрязнителями природных и техногенных сред, и имеют значительный биотехнологический потенциал для разработки эффективных микробных технологий биоремедиации.

Изучение таксономической структуры коллекционных микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, показало, что большинство исследуемых штаммов являются представителями родов *Rhodococcus* (44 %) и *Pseudomonas* (13 %), что согласуется со сведениями литературы о значительном биохимическом потенциале данных микроорганизмов, эффективно разлагающих широкий спектр химических поллютантов. Доля представителей рода *Bacillus* в коллекционном фонде составляет 9 %, *Arthrobacter* – 4 %, *Acinetobacter* – 4 %, *Brevibacterium* – 4 %, *Enterobacter*, *Nocardioides*, *Dietzia*, *Deinococcus*, *Planococcus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* – по 2 %. Точное определение видовой принадлежности большинства штаммов родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus* оказалось затруднительным из-за высокой гомологии нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК анализируемых штаммов с референтными последовательностями нескольких видов соответствующего рода, имеющих в международной базе данных GenBank. Так, из 20 штаммов родококков по 1 штамму отнесены к видам *R. wratislaviensis*, *R. fascians*, *R. zopfii*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. etherivorans*, 3 штамма – *R. pyridinivorans*, остальные 11 штаммов идентифицированы как *Rhodococcus* sp. Следует отметить, что анализируемые штаммы микроорганизмов характеризовались высокой (97–100 %) гомологией нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК не с типовыми штаммами соответствующих видов, а с некультивируемыми и культивируемыми бактериями, обнаруженными в природных источниках, загрязненных углеводородами и другими химическими токсикантами.

Работа выполнена в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (2011-2015 гг.) при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 14.М04.12.0001).

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЦИАНОБАКТЕРИЙ ИЗ ВОДОЕМОВ БЕЛАРУСИ

**Тихонова И.В.¹, Михеева Т.М.², Кузьмин А.В.¹, Сороковикова Е.Г.¹,
Ивачева М.С.¹, Белых О.И.¹**

¹*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия, e-mail: iren@lin.irk.ru*

²*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
e-mail: mikheyeva@tut.by*

Природные биологически-активные метаболиты, вырабатываемые микроорганизмами, в т.ч. цианобактериями, являются важным ресурсом для поиска и получения новых лекарственных препаратов. В последнее время интерес к продуцентам природных метаболитов смещается от актинобактерий к цианобактериям [1]. Цианобактерии являются важным источником биоактивных веществ с противовирусной, антибактериальной, фунгицидной и онкосупрессорной активностью, только за последние 20 лет учеными открыто более 200 ценных веществ пресноводных цианобактерий, и более 210 – морских цианобактерий [2, 3]. Биотехнологически значимыми являются циклические депсипептиды – пептиды со сложноэфирными связями (анабенопептилиды, цианопептолины, микровиридины), линейные пептиды (эругинозины и микрогинины) и другие. Например, циклические депсипептиды показали себя как потенциальные антибиотические агенты и ингибиторы сериновых протеаз [4].

Целью работы было выявить биологически активные пептиды цианобактерий в фитопланктоне водоемов Республики Беларусь – озер Нарочь и Мястро, водохранилищ Цнянское, Дрозды, Заславское, Чижовское, пруда г. Несвиж с помощью масс-спектрометрии. Отбор проб проведен в августе сетью с поверхности водоемов, биомасса сконцентрирована на бактериальные фильтры и высушена, пептиды экстрагировали согласно методике, описанной ранее [5]. Состав метаболитов проанализирован на масс-спектрометре MALDI-TOF/TOF (“UltrafleXtreme”, «Bruker Daltonics GmbH», Германия), MALDI-мишень MTP AnchorChip 400/384 T F (S/N 20823).

Результаты проведенного анализа показали наличие нескольких классов биологически активных соединений: ингибиторов протеаз и токсинов. Микрогинины – циклические пептиды, ингибирующие фермент, производящий активную форму ангиотензина, обнаружены в фитопланктоне озера Нарочь. Анабенопептин G – линейный пептид, ингибирующий сериновые протеазы, найден в фитопланктоне городского пруда города Несвиж. Эругинозины и микрогинины – фитопланктоне Цнянского водохранилища и Дрозды, цианопептолины – в озере Комсомольское. Наибольшее разнообразие биоактивных компонентов найдено в фитопланктоне озера Мястро и Заславское, здесь присутствовали практически все описанные классы пептидов. Полученные данные свидетельст-

вуют о наличии разнообразных биологически активных метаболитов цианобактерий, которые можно использовать в биотехнологических целях.

Список литературы

1. Singh S., Kate B.N. Banerjee U.C. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. / Crit. Rev. Biotechnol. – 2005. – V.25. – P. 73–95.
2. Abed R.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology / J. of Appl. Microbiol. – 2009. - V.106. - P. 1–12.
3. Nagarajan M. Maruthanayagam V., Sundararaman M. SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds: a review / J. Appl. Toxicol. – 2013. – V. 33. – P. 313–349.
4. Namikoshi M., Rinehart K. Bioactive compounds produced by cyanobacteria / J. of Industr. Microbiol. – 1996. – V. 17. – P. 373-384.
5. Белых и др., 2013 Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Потапов С.А., Федорова Г.А. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины / Химия в интересах устойчивого развития. – 2013. – V. 21. – P. 363–378.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Фальковская У.В., Сидоренко А.В., Новик Г.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: uliana_006@mail.ru

Оценка генетического разнообразия фитопатогенных бактерий имеет важное значение для эпидемиологии, селекции и контроля бактериозов сельскохозяйственных культур. Данные молекулярно-генетической идентификации могут быть применены для выяснения возможных источников инфекции, маркирования особо вирулентных штаммов, а также при изучении популяционной генетики и молекулярной филогении фитопатогенов [1]. Для молекулярного типирования бактерий широкое распространение нашли методы, основанные на амплификации повторяющихся межгенных палиндромных последовательностей, расположение и размер которых в геномах разных штаммов может существенно различаться, – гер-ПЦР. Одними из широко используемых вариантов метода гер-ПЦР являются ERIC-ПЦР и BOX-ПЦР, которые зарекомендовали себя как нетрудоемкие и доступные подходы для изучения генетической гетерогенности, видовой и внутривидовой идентификации микроорганизмов [2].

Цель данной работы – молекулярное типирование коллекционных и выделенных из пораженных растений культур фитопатогенных бактерий методами ERIC- и BOX-ПЦР.

На первом этапе исследований осуществляли отработку параметров ПЦР для молекулярного типирования, используя в качестве референтных коллекционные штаммы фитопатогенных бактерий *Pantoea agglomerans* БИМ В-281 и *Pectobacterium carotovorum* БИМ В-631. ПЦР проводили, применяя праймеры ERIC-1, ERIC-2, BOX, при температурах отжига 43 °С, 45 °С, 47 °С, 49 °С.

Результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР показали, что наиболее воспроизводимые и легко идентифицируемые ERIC-фингерпринты получаются при добавлении в реакционную смесь пары праймеров ERIC-1 и ERIC-2 и использовании температуры отжига 45 °С. При использовании праймера BOX оптимальная температура отжига составила 47 °С.

Оптимизированные параметры ERIC-ПЦР и BOX-ПЦР использовали в дальнейшей работе для молекулярного типирования коллекционных и выделенных из пораженных растений штаммов фитопатогенных бактерий.

При проведении ERIC-ПЦР для анализируемых коллекционных культур фитопатогенных бактерий родов *Erwinia*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Clavibacter*, получены штаммоспецифичные фингерпринты, содержащие от 2 до 7 фрагментов размером 100-5000 п.н. В BOX-фингерпринтах коллекционных штаммов присутствовало 2-8 фрагментов размером 100-5000 п.н. Для штамма *Clavibacter michiganensis* БИМ В-698 ERIC- и BOX-фингерпринты был нечетким, для штаммов *Pectobacterium wasabiae* БИМ В-88, БИМ В-90, БИМ В-561,

БИМ В-771, *P. carotovorum* БИМ В-631, БИМ В-632, БИМ В-633, *P. agglomerans* БИМ В-242, БИМ В-281, БИМ В-562, *Pantoea vagans* БИМ В-97 – идентичными. Для других анализируемых штаммов получены уникальные фингерпринты, содержащие набор отличающихся продуктов ПЦР и отражающие генетическую гетерогенность культур. Полученные результаты согласуются с данными литературы о высокой степени сходства геномных фингерпринтов разных штаммов фитопатогенных бактерий, ранее относившихся к роду *Erwinia*, что свидетельствует об их тесном филогенетическом родстве [3]. Наблюдаемый феномен затрудняет использование молекулярного типирования для выявления внутривидовой генетической гетерогенности фитопатогенных эрвиний, и открывает возможности применения данного подхода для видовой идентификации этих микроорганизмов.

При проведении ВОХ-ПЦР для выделенных из пораженных клубней топинамбура бактериальных культур родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Ewingella*, *Rahnella*, получены штаммоспецифичные фингерпринты, содержащие от 2 до 9 фрагментов размером 360-3000 п.н. В ERIC-фингерпринтах анализируемых штаммов также присутствовало 2-9 фрагментов размером 100-2200 п.н. ВОХ-фингерпринт штамма *Pseudomonas* sp. 3н-1 и ERIC-фингерпринты штаммов *Serratia* sp. 8-4, *Ewingella americana* 9-1 были нечеткими. Для штаммов *Pseudomonas* sp. 4-2, 4-3, 8-3, 9-4 ВОХ- и ERIC-фингерпринты были идентичными, что свидетельствует о том, что это один штамм, не смотря на выделение из разных клубней топинамбура. Аналогичное заключение можно сделать для культур *Serratia* sp. 5-4 и 8-у, ВОХ- и ERIC-профили которых также были идентичными. Фингерпринты других штаммов отличались по количеству и размеру ампликонов, что позволяло их дифференцировать.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования методов ERIC- и ВОХ-ПЦР видовой идентификации и выявления внутривидового генетического полиморфизма фитопатогенных бактерий с целью мониторинга и контроля бактериальных инфекций сельскохозяйственных и декоративных культур.

Список литературы

1. Goszczynska T., Serfontein J.J., Serfontein S. Introduction to practical phyto bacteriology. – Safrinet, 2000. – 92 p.
2. Savelkoul P.H., Aarts H.J. Amplified fragment length polymorphism analysis – the state of an art // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 83-91.
3. Кудина И.В. Генетическая характеристика белорусских штаммов *Erwinia amylovora* // Материалы конф. молодых ученых биол. факультета БГУ, Минск, 13-14 мая 2010 г. – Минск: БГУ, 2010. – С.40.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕХНИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДАМИ СЕЛЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУТАГЕНЕЗА И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Цурикова Н.В.¹, Костылева Е.В.¹, Середа А.С.¹, Смирнова И.А.¹, Нефедова Л.И.¹, Веселкина Т.Н.¹, Поляков В.А.¹, Рожкова А.М.², Сеницын А.П.^{2,3}

¹*ВНИИ пищевой биотехнологии, Москва, Россия,*

e-mail: nina.tsurikova@gmail.com

²*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия*

³*Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Создание высокоактивных продуцентов технических ферментов и разработка на их основе конкурентоспособных отечественных технологий производства ферментных препаратов включает проведение микробиологических исследований, направленных на повышение продуктивности штаммов, масштабирование процесса культивирования до производственных объемов, получение конечных форм ферментных препаратов и исследование эффективности их применения в различных отраслях пищевой, кормовой, перерабатывающей и других отраслей промышленности.

В связи с этим во ВНИИПБТ совместно с МГУ имени М.В. Ломоносова, ИБФМ РАН, ИНБИ РАН, рядом других институтов РАН и отраслевых НИИ проводятся научно-исследовательские работы по следующим направлениям:

- селекция микробных продуцентов с целью повышения их способности к биосинтезу целевых ферментов с использованием методов классической микробиологии;
- повышение биосинтетической активности грибных и бактериальных штаммов с применением индуцированного мутагенеза (*ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, химические соединения*);
- создание новых высокоактивных рекомбинантных продуцентов комплексов гидролитических ферментов с применением методов генной инженерии;
- разработка и оптимизация методов хранения активного посевного материала новых продуцентов;
- масштабирование технологий получения ферментных препаратов на основе новых высокоактивных продуцентов в лабораторных ферментерах, полупроизводственных и производственных условиях;
- получение высокоактивных концентрированных ферментных препаратов и исследование их физико-химических и биохимических свойств.

Разработаны различные методики, позволяющие проводить поддерживающую селекцию исходных, мутантных и рекомбинантных штаммов лабораторной коллекции, восстанавливать их активность после длительного хранения,

осуществлять отбор активных вариантов при проведении индуцированного мутагенеза.

При получении высокоактивных штаммов *B. licheniformis* 103, *A. awamori* и *A. oryzae* успешно был применен УФ-мутагенез и γ -мутагенез [1, 2, 3].

С появлением генетической инженерии широкое распространение для повышения продуктивности штаммов-продуцентов получили методы плазмидной трансформации микроорганизмов.

Трансформация штамма *A. awamori* гомологичным геном глюкоамилазы позволила увеличить активность целевого фермента в 2 раза по отношению к реципиентному штамму [4]. В результате трансформации штамма *A. awamori* плазмидами, несущими гетерологичные гены ксиланазы и эндоглюканы, были получены продуценты, с повышенным уровнем биосинтеза сопутствующих ферментов целлюлолитического комплекса [5]. Дополнительным преимуществом штаммов является возможность их культивирования в производственных условиях без внесения изменений в технологическую схему, разработанную для исходного промышленного продуцента глюкоамилазы.

На основе шт. гриба *Penicillium* созданы рекомбинантные штаммы *P. canescens* *Perp-4* – продуцент кислой аспаргатной протеазы пенициллопепсина, и *P. canescens* *RN3-11-7-7* – продуцент пенициллопепсина и лейцинаминопептидазы [6]. Новые штаммы наряду с собственным комплексом гемицеллюлолитических ферментов, продуцируют высокий уровень протеаз, что дает им преимущество при переработке растительного белоксодержащего сырья в различных областях АПК, в том числе для повышения питательной ценности кормов для сельскохозяйственных животных.

Список литературы

1. Патент РФ. 2008. № 2324734.
2. Патент РФ. 2003. № 2196821
3. Патент РФ. 2008. № 2354697
4. Патент РФ. 2012. № 2457247
5. Патент РФ. 2012. № 2457246
6. Смирнова И.А., Серeda А.С., Веселкина Т.Н., Нефедова Л.И., Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Рожкова А.М., Сеницын А.П., Цурикова Н.В., Серeda А.С., Смирнова И.А., Костылева Е.В., Нефедова Л.И., Сеницын А.П. Получение высокоактивного рекомбинантного штамма-продуцента грибных протеаз. // Сборник научных трудов. – М.:ВНИИПБТ, 2014, С 7-13.

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ХАРПИНОВ

Чеботарёв Л.Ю., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

e-mail: lev.chebotarev@gmail.com

Существуют различные по своей эффективности способы защиты возделываемых растений от патогенов бактериального происхождения. С помощью традиционных методов селекции далеко не всегда удаётся получить устойчивые сорта, обладающие достаточной урожайностью. Также известно, что использование химических средств защиты оказывает неблагоприятное воздействие на состояние здоровья человека и наносит ощутимый вред окружающей среде. Поэтому тенденцией последних десятилетий во всём мире является разработка фитопротекторных средств, активирующих защитный потенциал растений [1], в результате чего повышается общая неспецифическая устойчивость к патогенам. К настоящему времени имеется множество примеров использования харпинов [2–11], которые являются вспомогательными компонентами системы секреции третьего типа фитопатогенных бактерий, в качестве индукторов иммунного ответа, направленного не только против фитопатогенов бактериального происхождения, но и против вирусов, грибов и насекомых. Также важно отметить, что обработка харпинами оказывает влияние на ускорение развития и увеличение полезной массы растений.

Цель работы — изучение влияния харпинов на изменение общей устойчивости к заболеваниям и продуктивность растений, а на данном этапе — получение генно-инженерных штаммов-продуцентов харпинов различных фитопатогенных микроорганизмов.

В качестве источника генов, кодирующих харпины были использованы имевшиеся в коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ штаммы бактерий *Pectobacterium atrosepticum* 21А и 36А. С помощью полногеномного секвенирования по технологии компании Illumina (США), была установлена нуклеотидная последовательность хромосом этих штаммов. Последовательности харпинов *hrpN* и *hrpW* были найдены и аннотированы путём сравнения с известными последовательностями генов из базы данных Генбанк. Нами были разработаны специфические праймеры и с помощью перекрывающейся и обычной полимеразной цепной реакции гены соответствующих харпинов были амплифицированы и встроены в плазмиды рЕТ-42а(+) и рFLAG-СТС. Правильность созданных конструкций была подтверждена с помощью секвенирования.

Созданные конструкции принадлежат к различным экспрессионным системам, что позволит осуществить выбор в пользу наиболее эффективной. Также

экспрессия конструкций на основе рЕТ-42a(+) обеспечивает возможность детекции харпинов с помощью специфических антител и очистки методом металл-аффинной хроматографии. Однако, стоит заметить, что вследствие своей высокой термостабильности, харпины могут быть выделены в функционально активном виде из раствора с другими белками с помощью простого кипячения [12].

Таким образом, к настоящему моменту получено 8 экспрессионных конструкций на основе векторов рЕТ 42a(+) и рFLAG-СТС с генами *hrpN* и *hrpW* из штаммов *P. atrosepticum* 21A и 36A.

В дальнейшем планируется осуществить подбор оптимальных условий для экспрессии генов харпинов и оценить функциональную активность данных белков с помощью тестов на растениях.

Список литературы

1. Поликсенова, В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам (на примере томата) / В.Д. Поликсенова // Вестник БГУ. – 2009. – Vol. 1. – № 2. – P. 48–60.
2. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene / H. Dong [et al.] // Plant Journal. – 1999. – Vol. 20. – № 2. – P. 207-215.
3. Fontanilla, M. Effects of the foliar-applied protein “Harpin(Ea)” (messenger) on tomatoes infected with *Phytophthora infestans*. / M. Fontanilla, M. Montes, R. De Prado // Communications in agricultural and applied biological sciences. – 2005. – Vol. 70. – № 3. – P. 41-45.
4. Fontanilla, J.M. Induction of resistance to the pathogenic agent *Botrytis cinerea* in the cultivation of the tomato by means of the application of the protein “Harpin”(Messenger). / J.M. Fontanilla, M. Montes, R. De Prado // Communications in agricultural and applied biological sciences. – 2005. – Vol. 70. – № 3. – P. 35-40.
5. Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. / H.-P. Dong [et al.] // Plant physiology. – 2004. – Vol. 136. – № November. – P. 3628-3638.
6. Chuang, H. Harpin Protein, an Elicitor of Disease Resistance, Acts as a Growth Promoter in *Phalaenopsis* Orchids / H. Chuang, P.-Y. Chang, Y. Syu // Journal of Plant Growth Regulation. – 2014. – Vol. 33. – № 4. – P. 788-797.
7. Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against english grain aphid / M. Fu [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2014. – Vol. 65. – № 6. – P. 1439-1453.
8. Jang, Y.S. The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea* / Y.S. Jang, S.I. Sohn, M.H. Wang // Planta. – 2006. – Vol. 223. – № 3. – P. 449-456.
9. Expression of harpin(xoo) in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. / J.-L. Peng [et al.] // Phytopathology. – 2004. – Vol. 94. – № 10. – P. 1048-1055.
10. Сюй, Г. Индуцированная устойчивость против листовой пятнистости, вызываемой альтернарией, и ускоренное развитие трансгенных растений хриантемы, несущих ген харпина *hraG* / Г. Сюй, С. Чен, Ф. Чэнь // Физиология растений. – 2010. – Vol. 57. – № 4. – P. 589-594.

11. A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible / L. Belbahri [et al.] // *Plant Journal*. – 2001. – Vol. 28. – № 4. – P. 419-430.
12. Сравнительная характеристика харпинов HrpN бактерий *Erwinia carotovora* и *Erwinia amylovora* / Е.А. Николайчик [et al.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2007. – Vol. 51. – № 3. – P. 82-86.

ІДЭНТЫФІКАЦЫЯ ВУГЛЕВАДАРОДАКІСЛЯЮЧЫХ БАКТЭРЫЙ З ГЕАГРАФІЧНА АДДАЛЕННЫХ РЭГІЁНАЎ

Чарняўская М.І., Ціток М.А.

Інстытут мікрабіялогіі НАН Беларусі, Мінск, Беларусь, e-mail: mm-cher@tut.by

Ачыстка навакольнага асяроддзя ад забруджванняў нафтай і прадуктамі яе перапрацоўкі з'яўляецца актуальнай экалагічнай задачай. Для аднаўлення парушаных тэрыторый шырока выкарыстоўваюцца біяпрэпараты, якія маюць у сваім складзе бактэрыя-дэструктары нафты розных сістэматычных груп. Найбольшую праблему складаюць рэгіёны з халодным і гарачым кліматам, дзе працэсы біярэмедыяцыі могуць забяспечвацца мікраарганізмамі з адмысловым тыпам метабалізма. Пры гэтым неабходна ўлічваць, што забруджаныя глебы адрозніваюцца па хімічным складзе, ступені засоленасці, значэнні рН, фізічных уласцівасцях. У сувязі з гэтым актуальным з'яўляецца пошук бактэрыя-дэструктараў, здольных выжываць і акісляць вуглеводароды ў стрэсавых умовах асяроддзя. Важным этапам для эфектыўнага выкарыстання бактэрыя-дэструктараў з'яўляецца вызначэнне іх таксанамічнага статусу.

У даследаванні былі выкарыстаныя 24 штамы-дэструктары вуглеводарадаў, выдзеленыя на тэрыторыі Беларусі, Ірака, Лівіі і Антарктыды.

Для іх ідэнтыфікацыі праводзіўся малекулярна-генетычны (рэстрыкцыя і сіквенс-аналіз генаў 16S рРНК, *rpoC*, асобных фрагментаў генома) і фізіёлага-біяхімічны аналіз.

Амаль ва ўсіх рэгіёнах (акрамя Ірака) былі выяўленыя бактэрыі, аднесенныя да рода *Rhodococcus*. Было ўстаноўлена, што для больш дакладнай відавочнай ідэнтыфікацыі дадзеных мікраарганізмаў дастаткова інфарматыўныя гены *rpoC*, бо паслядоўнасці генаў 16S рРНК розных відаў могуць праяўляць вельмі высокую ступень гомалогіі (да 99 %). Ва ўзорах антарктычнага глебу былі выяўленыя бактэрыі *R. erythropolis*, якія характарызаваліся адрозненнямі ў арганізацыі генетычнага матэрыялу (паказана з дапамогай фінгерпрынта). Тады як для бактэрыі *R. pyridinivorans*, ізаляваных на тэрыторыі Лівіі, Беларусі і Антарктыды, падобнага полімарфізма не выяўлена. Для ідэнтыфікацыі бактэрыі *R. pyridinivorans*, якія маюць блізкую генетычную роднасць з *R. rhodochrous*, апроч малекулярна-генетычнага, быў выкарыстаны фізіёлага-біяхімічны аналіз (рост на пірыдзіне, рост пры тэмпературы +45 °С) [1]. На тэрыторыі Беларусі быў выдзелены таксама штама *R. opacus*, для ідэнтыфікацыі якога былі секвенаваныя ампліконы генаў 16S рРНК, *rpoC*, а таксама выпадковыя фрагменты храмасомнай ДНК.

Бактэрыі рода *Bacillus* (тры віды – *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, *B. flexus*) былі выдзеленыя з рэгіёнаў з гарачым кліматам (Лівіі і Ірака). Два віды псеўдаманад (*Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*) былі ізаляваныя з лівійскага глебу.

Апроч гэтага з узораў глебы былі адабраныя бактэрыі-дэструктары такіх сістэматычных груп, як *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp. (Беларусь), *Enterobacter cloacae* (Ірак), *Acinetobacter radioresistens*, *Dietzia* sp. (Лівія). З узору антарктычнага грунту быў выдзелены штама *Deinococcus* sp., здольны да утылізацыі нафты і алканаў з кароткім ланцужком (гексан, нанан). Штама блізкі да віда *Planococcus maitriensis* (98 % гамалогіі паслядоўнасцяў генаў 16S рРНК) быў выяўлены на тэрыторыі Ірака. Аднак, у адрозненне ад тыповага штама, выдзеленага з цыянабактэрыяльнага мата ў Антарктыцы, ён рос пры тэмпературах да 42 °С і вытрымліваў канцэнтрацыі NaCl да 14 % [2]. Гэта можа казаць альбо аб штамавых адрозненнях, альбо аб прыналежнасці да новага віда рода *Planococcus*.

Асаблівай увагі вартыя два штамы аблігатных алканатрофаў (А36-1, А36-3), выдзеленыя на тэрыторыі Антарктыды. Паколькі іх паслядоўнасці генаў 16S рРНК не выявілі дастатковай гамалогіі з вядомымі, можна меркаваць, што яны прадстаўляюць новую сістэматычную адзінку. Найбольш блізкімі да іх у сістэматычным плане (88 %) апынуліся бактэрыі *Alkanindiges illinoisensis* (Ac. NR_025254.1), якія таксама утылізуюць вузкі спектр субстратаў, уключаючы алканы з доўгім ланцужком [3].

Такім чынам, устаноўлена, што сярод 24 штамаў, выдзеленых з геаграфічна аддаленых рэгіёнаў, сутракаюцца як шырока распаўсюджаныя віды бактэрыя-дэструктараў вуглевадародаў, якія адносяцца да родаў *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, так і дастаткова нетыповыя – *P. maitriensis*, *Deinococcus* sp.. Акрамя таго, выдзеленыя два штамы аблігантных алканатрофаў, якія, хутчэй за ўсё, прадстаўляюць новы від.

Спіс літаратуры

1. Yoon J.-H. [et al.] *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – V 50. – P. 2173-2180.
2. Alam S.I. [et al.] Psychrophilic *Planococcus maitriensis* sp.nov. from Antarctica // System. Appl. Microbiol. – 2003. – V 26. – P. 505–510.
3. Bogan B.W. [et al.] *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils // Int. Journ. System. Evol. Microbiol. – 2003 – V 53. - P. 1389–1395.

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ХИМОЗИН

Чубанова С.В., Валентович Л.Н.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

e-mail: chubanova_sabina@tut.by

Стандартный процесс изготовления сычужных сыров состоит из последовательности этапов, включающей нормализацию молока, коагуляцию растворимых белков, удаление сывороточных масс, формование, прессование, ферментацию и созревание сыра [1]. На стадии коагуляции используют протеазы животного, растительного, микробного или грибного происхождения. Наиболее часто применяют химозин (реннин), который принадлежит к классу эндопептидаз (ЕС 3.4.23.4) и отвечает за коагуляцию белков молока, а именно к-казеина, составляющего 8-15% всех белков молока [2, 4].

Животные реннины, традиционно выделяемые из желудков детенышей жвачных животных, питающихся молоком, представляют собой смеси из различных протеолитических ферментов, но отличаются относительно высоким содержанием химозина по отношению к другим протеазам, что положительно сказывается на основных органолептических качествах и реологических свойствах производимых с их использованием сыров. Высокий спрос на сыры и сырные продукты, снижение доступности молодняка рогатого скота, экономическая неоправданность забоя, технологические недостатки использования препаратов животного происхождения, а также ряд социально обусловленных факторов (негуманность технологии, несоответствие потребителю категориям типа «вегетарианский продукт», «кошерный продукт») обуславливают актуальность разработки биотехнологии получения химозина на основе использования генно-инженерных методов.

По данным за 2014 год в Беларуси производится около 1,1% мирового объема молока, а по производству сыров и сырных продуктов страна занимает 34 позицию в списке крупнейших стран-экспортеров [3]. Таким образом, цель работы – получение высококачественного и доступного отечественного рекомбинантного химозина, а именно конструирование штаммов микроорганизмов-продуцентов.

На начальном этапе работы, для оценки степени различия аминокислотного состава химозинов разного происхождения, было проведено множественное выравнивание с помощью программы ClustalX 2.1 аминокислотных последовательностей данных ферментов, а также соответствующих им молекул к-казеина – субстрата химозина млекопитающих следующих видов: *Bison bison bison*, *Bos taurus*, *B. mutus*, *Bubalus bubalis*, *Camelus bacterianus*, *C. dromedaries*, *Capra hircus*, *Equus caballus*, *Homo sapiens*, *Ovis aries*, *Sus scrofa*. Исходя из литера-

турных данных и полученной информации о высоком уровне гомологии ферментов и наличии консервативных областей, что в конечном итоге выражается в способности одного фермента проявлять активность с множеством схожих субстратов, для дальнейшей работы была выбрана последовательность нуклеотидов мРНК химозина верблюда одногорбого (*Camelus dromedaries*). Последовательность была взята из базы данных GenBank NCBI [gi:746816061].

Поскольку экспрессию выбранного нами гена планируется проводить в клетках бактерий *Escherichia coli* (наиболее полно изученный микроорганизм, используемый для модификаций: имеется широкий выбор удобных для работы систем векторов, экспрессионных штаммов) и дрожжей *Kluyveromyces lactis* (эукариотический организм признанный безопасным для пищевой промышленности) последовательность гена химозина верблюда одногорбого была оптимизирована по кодонному составу с использованием программы Graphical Codon Usage Analyser v. 2.0 и таблиц частот встречаемости кодонов для организмов *E. coli* и *K. lactis*: редкоиспользуемые триплеты заменены на синонимичные, исключен ряд сайтов узнавания рестрикционных экзонуклеаз (2 сайта для ScaI, 9 для MnlI, 10 для TaqI, Acc65I, KpnI, 2 сайта HincII, 2 – PaeI, 2 – Cfr13I, EcoO109I и PvuI). Суммарно произведено 327 однобуквенных замен. Выравнивание транслированных последовательностей гена до и после кодонной оптимизации, произведенное с использованием программы ClustalX 2.1, показало 100% идентичность. Таким образом, значение индекса адаптации кодонов для *E. coli* составило 0,721, а для *K. lactis* – 0,704, где 1 – кодон используется в 100% случаев, 0 – не используется вообще [5]. Кроме того, к С-терминальной области был добавлен октапептид FLAG – Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, что позволит проводить детекцию и очистку целевого белка с помощью специфических антител.

Оптимизированная последовательность была синтезирована *de novo* (Eurofins Medigenomix GmbH) и введена в состав плазмидных векторов pFLAG-CTS, pET42a(+) (для экспрессии в *E. coli*) и интегративного вектора pKLAC2 (для экспрессии в *K. lactis*) методами перекрывающейся ПЦР или лигазного клонирования. Соответствие нуклеотидного состава клонированного гена и регуляторных элементов было подтверждено результатами секвенирующей реакции.

В дальнейшем планируется провести подбор оптимальных условий для экспрессии гена химозина и очистки целевого белка, оценить его функциональность.

Список литературы

1. Recent advances in cheese microbiology / T.P. Beresford [et al.] // International Dairy Journal. – 2001. – Т. 11. – № 4-7. – С. 259-274.
2. The milk acid proteinase cathepsin D: A review / M.J. Hurley [et al.] // International Dairy Journal. – 2000. – Т. 10. – № 10. – С. 673-681.
3. Mann, E.J. The world dairy situation / E.J. Mann // Dairy Industries International. – 2010. – Т. 70. – С. 37-38.
4. Johri, B.N. Enzymes from thermophilic fungi: Proteases and lipases / B.N. Johri, S. Jain, S. Chouhan // Proceedings: Plant Sciences. – 1985. – Т. 94. – № 5. – С. 175-196.
5. Puigbò, P. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). / P. Puigbò, I.G. Bravo, S. Garcia-Vallvé // BMC bioinformatics. – 2008. – Т. 9. – 65с.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *PENICILLIUM* И *ASPERGILLUS*

Шемшур О.Н., Бекмаханова Н.Е., Мазунина М.Н.

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан
e-mail: olgashemshura@mail.ru

Хинолиновые и дикетопиперазиновые соединения – это индольные гетероциклические соединения, обладающие ярко выраженной биологической активностью, в связи с чем, они могут представлять интерес в качестве возможных биопрепаратов для защиты растений [1-3].

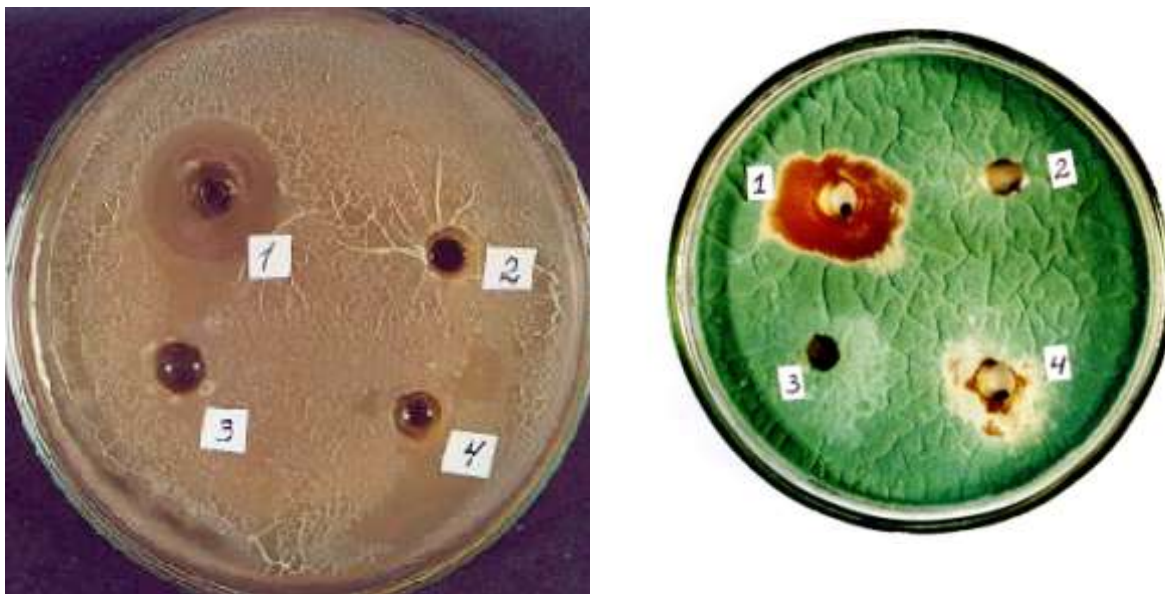
Методами ТСХ, с использованием стандартных соединений, из экстрактов культуральной жидкости 6 штаммов микроскопических грибов *Penicillium sp.*(216; 826; 340; 747) и *Aspergillus sp.* (149;127) выделено 7 компонентов близких по своим хроматографическим характеристикам к индольным соединениям дикетопиперазинового и хинолинового ряда.

Определение антимикробной и ростостимулирующей активности выделенных соединений проводили общепринятыми микробиологическими методами [4-5]. В качестве тест-микроорганизмов использовали фитопатогены: *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium dimerum*, *Penicillium casei*. В качестве тест-растений использовали проростки пшеницы сорта «Прогресс».

Испытание выделенных соединений на фитопатогенах показало избирательность их действия. Так, соединение дикетопиперазиновой природы 340-д останавливает рост *Erwinia carotovora* – возбудителя «черной ножки» картофеля и *Penicillium casei* возбудителя зеленой плесени семян – зоны подавления роста фитопатогенов составили 14 и 20 мм соответственно (рисунок 1), антимикробного действия в отношении других взятых тест-микроорганизмов не отмечено. Развитие возбудителя фузариоза *Fusarium dimerum* останавливают метаболиты, аналоги хинолина: 127-х и 747-х (зоны подавления роста гриба составили 12 и 18 мм соответственно). Поскольку исследование грибных метаболитов направлено на получение перспективных средств защиты сельскохозяйственных растений немаловажно, чтобы их действие оказалось не токсичным для растений. В связи с этим, проведены исследования выделенных метаболитов на рост проростков пшеницы.

Полученные результаты показали, что из 6 исследуемых соединений, только метаболиты 747-д и 340-д оказали небольшое стимулирующее действие на рост проростков пшеницы. Длина стебля и корня увеличилась на 6% и 4% (метаболит 747-д) и 8% и 12% (метаболит 340-д) по сравнению с контролем (вода).

Остальные метаболиты оказали либо слабое токсическое действие (826-д; 149-д), либо нейтральное (747-х; 216-х).



1 – метаболит 340-д, 2 – метаболит 127-х, 3 – метаболит 826-д, 4 – метаболит 216-д

Рисунок 1 – Антимикробная активность грибных метаболитов в отношении *Erwinia carotovora* (а) и *Penicillium casei* (б)

Таким образом, антимикробная активность, а также нейтральное или слабое рост стимулирующее действие исследуемых метаболитов дает основание для дальнейшего их изучения с целью подбора концентраций, эффективных в отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных культур и безопасных по отношению к самим растениям.

Список литературы

1. Винокурова Н.Г., Бойченко Д.М., Баскунов Б.П. и др. Микробные алкалоиды грибов *Penicillium roquefortii* thom 1906 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37, №2. – С.209-213.
2. Козловский А.Г., Жилифонова В.П., Аданин В.М. и др. Выделение из вечной мерзлоты гриба *Penicillium aurantiogriseum dierckx* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, №4. – С.446-451.
3. Козловский А.Г., Соловьева Т.Ф., Бухтияров Ю.Г. и др. Вторичные метаболиты новых почвенных штаммов микроскопических грибов *Aspergillus* и *Penicillium* // Микробиология. – 1990. – Т.59, в.4. – С.601-608.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.:МГУ, 2004. – 528 с.
5. Егоров Н.С. руководство к практическим занятиям по микробиологии. – Московский Университет, 1983. – 220 с.

СВОЙСТВА α -АМИЛАЗЫ БАКТЕРИЙ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *AMYLOLIQUEFACIENS*

Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Кулиш С.А., Лобанок А.Г.,
Тамкович И.О., Гайдук А.С., Бурвель Д.Д.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

α -Амилаза (КФ 3.2.1.1), известная также как 1,4- α -D-глюкан гидролаза или гликогеназа, катализирует гидролиз внутренних 1,4- α -D-гликозидных связей крахмала и амилопектина с образованием в первом случае мальтозы и мальтотриозы, во втором – глюкозы и декстринов (олигосахаридов). Фермент находит широкое применение в пищевой, химической, целлюлозобумажной, текстильной, фармацевтической промышленности, заменяя химический гидролиз крахмалсодержащего сырья и делая процесс более простым, рентабельным и экологически чистым [1–4]. α -Амилазы применяют также в кормопроизводстве для улучшения перевариваемости растительного корма, богатого крахмалистыми полисахаридами [5–7].

Коммерческое производство α -амилазы основано на использовании в качестве продуцентов бактерий, в основном, рода *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*) [8]. Ранее нами был отобран и запатентован штамм *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* – продуцент внеклеточной фитазы [9]. Штамм в определенных условиях синтезирует также β -глюканазу, целлюлазу, ксиланазу, протеазу и α -амилазу, которые катализируют гидролиз растительных полимеров. Знание свойств указанных ферментных белков позволит повысить эффективность использования ферментного препарата, разрабатываемого на основе названного штамма.

Цель работы – характеристика физико-химических свойств частично очищенной α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* Ф-99.

Активность α -амилазы определяли согласно [10] и выражали в относительных процентах. В качестве субстратов α -амилазы использовали декстран, декстрин, мальтозу, крахмал, амилопектин (1,0 %). Активность фермента определяли в диапазоне pH 2,0–10,0 и температуры 20–70 °C. О pH- и термостабильности α -амилазы судили по ее остаточной активности после инкубации в 0,2 М фосфатно-цитратном (pH 4,0–5,5) и Na-фосфатном буфере (pH 5,5–8,0) при 20–70 °C в течение 30 мин.

Приведенные результаты представляют собой усредненные величины 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях и статистически обработанных с использованием компьютерных программ из пакета Microsoft Excel.

Анализ полученных экспериментальных данных показал наибольшее сродство α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* к амило-

пектину и нерастворимому картофельному крахмалу. Ее способность гидролизовать указанные субстраты оказалась соответственно в 1,27 и 1,20 раза более выраженной, чем способность деполимеризовать растворимый крахмал. Фермент гидролизует декстрин в 6,6 раз менее эффективно, чем растворимый крахмал, и не разлагал декстран и мальтозу. Максимум активности фермент проявлял при концентрации крахмала в реакционной среде, составляющей 1,0–1,5 мг/мл.

α -Амилаза характеризовалась оптимумом действия в диапазоне рН 6,5–7,0 и проявляла более 80 % активности при рН 5,0–8,0. При повышении кислотности реакционной среды активность фермента снижалась, составляя при рН 4,0 менее 50 % от максимума. α -Амилаза наиболее эффективно расщепляла субстрат при температуре 55 °С и проявляла до 85 % при 50 и 60 °С.

Фермент стабилен в течение 30 мин при рН 6,5–7,0 (40 °С) и терял 15,9% активности при рН 6,0. За указанный промежуток времени его остаточная активность при 50 и 55 °С (рН 6,5) составляла соответственно 84,1 и 12,4 %.

Полученные экспериментальные данные о субстратной специфичности и свойствах α -амилазы штамма *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* свидетельствуют о возможности ее использования в составе комплексных ферментных препаратов для обработки кормов, обогащенных крахмалосодержащими ингредиентами.

Список литературы

1. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective // Biochem. – 2003. – Vol. 38, № 11. – P. 1599–1616.
2. Ito S., Kobayashi T., Hatada Y., Horikoshi K. Enzymes in modern detergents // Meth. Biotechnol. – 2005. – Vol. 17. – P. 151–161.
3. Souza P. M. de, Magalhães P. de Oliveira e. Application of microbial α -amylase in industry – A review // Braz. J. Microbiol. – 2010. – Vol. 41, № 4. – P. 850–861.
4. Sundarram A., Murthy T.P.K. α -Amylase production and applications: a review // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 166–175.
5. Gracia M.I., Aranibar M.J., Lazaro R., Medel P., Mateos G.G. Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn // Poult. Sci. – 2003. – Vol. 82. – P. 436–442.
6. Jiang Z., Zhou Y., Lu F., Han Z., Wang T. Effects of different levels of supplementary alpha-amylase on digestive enzyme activities and pancreatic amylase mRNA expression of young broilers // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2008. – Vol. 21, № 1. – P. 97–102.
7. Nozière P., Steinberg W., Silberberg M., Morgavi D.P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets // J. Dairy Sci. – 2014. – Vol. 97, № 4. – P. 2319–2328.
8. Benjamin S., Smitha R.B., Jisha V.N., Pradeep S., Sajith S., Sreedevi S., Priji P., Unni K.N., Josh M.K.S. A monograph on amylases from *Bacillus* spp. // Adv. Biosci. Biotechnol. – 2013. – Vol. 4. – P. 227–241.
9. Положительное решение о выдаче патента РБ от 19.03.2015 по заявке a20121137 от 27.07.2012 / Шляхотко Е. А., Сапунова Л. И., Лобанок А. Г. Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* – продуцент фитазы.
10. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности: ГОСТ 20264-89 / Гос. Комитет СССР по стандартам. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 24 с.

КОЛЛЕКЦИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР РИЗОБИЙ СОИ РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Якименко М.В., Бегун С.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск, Россия,
e-mail: mariy-y@yandex.ru

В 1974 году сотрудником лаборатории микробиологии ВНИИ сои Бегун С.А. из природных популяций Амурской области в чистую культуру были выделены первые штаммы клубеньковых бактерий сои вида *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), в 1978 году - вида *Sinorhizobium fredii* (Scholla, Elkan, 1984) и лаборатория сосредоточилась на изучении природных популяций клубеньковых бактерий сои Российского Дальнего Востока [1, 2]. В основу работы были положены идеи крупнейших исследователей явления симбиотической азотфиксации Доросинского Л.М., Мишустина Е.Н., Шильниковой В.К.

В результате многолетних исследований было установлено, что штаммы вида *Sinorhizobium fredii* в чашках Петри дают рост на 2...4 сутки после посева. Хорошо усваивают широкий спектр источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма кислотного характера. Большинство штаммов этого вида обладает высокой осмоустойчивостью. Выделяется группа штаммов *Sinorhizobium fredii*, обладающая универсальными способностями роста при экстремальных условиях среды обитания (высокая температура, низкие и высокие показатели рН) с различной степенью газообразования.

Обладая пониженной вирулентностью, в сравнении с видом *Bradyrhizobium japonicum*, и способностью терять вирулентность в процессе пересевов, этот вид ризобий сои может доминировать при формировании симбиотического аппарата в годы с экстремальными погодными условиями.

Штаммы вида *Bradyrhizobium japonicum* в чашках Петри дают рост на 7...10 и даже 20 сутки после посева. Усваивают ограниченный набор источников углеродного питания с выделением продуктов метаболизма в основном щелочного характера. Обладают пониженной осмоустойчивостью. Плохо переносят экстремальные условия среды обитания. Резко замедляют рост на кислых и щелочных питательных средах. Прекращают расти при высоких температурах (+37...+42°C). В тоже время, в оптимальных условиях этот вид ризобий доминирует при нодуляции растений сои, обладая высокой и устойчивой вирулентностью.

В настоящее время, в результате длительного (1974-20014 гг.) отбора штаммов клубеньковых бактерий сои из самых северных в мире природных популяций этих бактерий и изучения их свойств, в лаборатории биологических исследований ФГБНУ ВНИИ сои сформирована уникальная коллекция соевых ризобий, включающая свыше 200 наиболее ценных штаммов видов

Bradyrhizobium japonicum (*B. japonicum*) и *Sinorhizobium fredii* (*S. fredii*). На коллекционные штаммы получено 4-ре авторских свидетельства и 4-ре патента. На основе запатентованного штамма ризобий ББ-49, входящего в список "100 лучших изобретений России" 8 апреля 2014 года совместно с ЗАО "Аметис" получено Свидетельство о регистрации Микробиологического удобрения Био-БеСтА.

Список литературы

1. Бегун, С. А. Особенности свойств штаммов клубеньковых бактерий сои амурского происхождения / С.А. Бегун // Проблемы соеводства на Дальнем Востоке: Сб. научн. тр. – Новосибирск, 1992. – С. 70 - 76.
2. Бегун, С. А. Способы, приёмы изучения и отбора эффективных штаммов клубеньковых бактерий сои. Методы аналитической селекции / С. А. Бегун, В. А. Тильба. – Благовещенск: Изд-во «Зея», 2005. – 70 с.

Секция 2:
Биотехнологии для сельского хозяйства

ПРИМЕНЕНИЕ АРБУСКУЛЯРНЫХ МИКОРИЗ В ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ СОИ

Абдурашитов С.Ф.¹, Волкогон В.В.²

¹Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, АР Крым, e-mail: asuleyman83@rambler.ru,

²Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, Чернигов, Украина, e-mail: rifam@ukrpost.ua

Среди зернобобовых культур наибольшее распространение получила соя, благодаря разнообразному использованию продукции в народном хозяйстве. Соя имеет высокий продуктивный потенциал, на реализацию которого влияют симбиотические микроорганизмы. Клубеньковые бактерии обеспечивают растения биологическим азотом, ассоциативные – стимуляцию роста и защиту от фитопатогенов. На их основе сегодня разработаны микробные препараты и экологически безопасные технологии выращивания сои. Не менее важным симбионтом являются грибы арбускулярной микоризы (АМ), влияние которых на растение обусловлено улучшением минерального питания, защитой от стрессовых условий окружающей среды и патогенных грибов. В то же время, вопросы получения и применения препаратов на их основе изучены недостаточно. Нами ранее определено, что в почвах Крыма имеется представительная популяция грибов АМ, выделены их ассоциации. В связи с этим целью исследований было изучение эффективности применения ассоциаций грибов АМ в технологии выращивания сои.

Эффективность ассоциаций (в сравнении с производственным изолятом) изучали в условиях вегетационных и полевых опытов в течение 2009-2013 гг. Оценку эффективности проводили в яровых и пожнивных посевах, на разных типах почв, с разными способами внесения инокулята грибов АМ. Для обеспечения азотного питания растений сои применяли препарат клубеньковых бактерий Ризобифит.

Исследования показали, что современные сорта сои положительно отзываются на инокуляцию *Bradyrhizobium japonicum* и ассоциацией грибов АМ *Rhizophagus sp.* РЗ. Наибольший эффект отмечен у дикого сортообразца сои, где прибавка массы побегов составила 57,7%, а количества бобов – 65,0%.

В условиях многолетних полевых опытов оценена семенная продуктивность сои и качественные показатели зерна (по содержанию белков и жиров, фосфора и калия) при использовании ассоциаций грибов АМ и Ризобифита. Получены дополнительные прибавки урожая до 78,3% и 30,8% в сравнении с контролем без обработки и моноинокуляцией ризобиями, соответственно. Сбор сырого протеина увеличивался на 19,0-82,0%, жира на 15,6-80,0%. Наблюдалось небольшое увеличение содержания фосфора в семенах сои. Такие прибав-

ки урожая и его качества стали возможными благодаря хорошо развитым симбиозам клубеньковых бактерий и микоризных грибов с растениями.

В наших экспериментах исследовано состояние микробоценоза и ферментативной активности в ризосфере посевов пожнивной сои в разные фазы развития растений с применением различных способов внесения ассоциаций *Rhizophagus sp* P3 и *Rhizophagus sp*. S5. В фазы активного роста растений отмечено преобладание бактерий-аммонификаторов над аминогетеротрофами, что связано с высевом сои непосредственно после уборки пшеницы озимой и наличием большого количества органического вещества в виде стерни и корней. По завершении вегетации в ризосферной почве из вариантов с обработкой грибами АМ количество первых уменьшалось в два раза, а вторых в два раза возрастало, что может свидетельствовать о накоплении азота в ризосфере инокулированных растений сои.

Таким образом, при выращивании сои в Крыму показано более эффективное формирование симбиоза грибов АМ с растениями при использовании препарата клубеньковых бактерий. Бинарная инокуляция обеспечивает интенсивное протекание микробиологических процессов в ризосфере растений, способствует увеличению урожайности культуры и улучшению качества продукции.

ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ С УВЕЛИЧЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ 1, ПОЛУЧЕННЫЙ С ПОМОЩЬЮ МУТАНТНОГО ШТАММА *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* TW1-59-27

Беккаревич А.О.¹, Немашкалов В.А.¹, Кошелев А.В.¹, Бубнова Т.В.¹,
Окунев О.Н.¹, Осипов Д.О.², Сеницын А.П.²

¹Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Россия, e-mail: Alexandra@ibpm.pushchino.ru

²Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, e-mail: inbi@inbi.ras.ru

Грибы рода *Trichoderma* известны своими выдающимися целлюлолитическими способностями. Ферментные препараты (ФП), получаемые на их основе, широко применяются в различных отраслях промышленности и в сельском хозяйстве. В настоящей работе использовали штамм TW1 *Trichoderma longibrachiatum* из Всероссийской коллекции микроорганизмов (F-3634D) [1].

Новый мутант TW1-59-27 с увеличенной способностью синтезировать целлюлазы и ксиланазы был получен из исходного штамма в результате двухступенчатого мутагенеза. Конидии подвергали воздействию γ -излучения в дозе 1500 Гр в течение 6 час, выживаемость составляла 0,001%. Мутанты отбирали на чашках с аморфной целлюлозой (acid swollen cellulose) по наибольшим зонам гидролиза, затем активные клоны культивировали в колбах на среде, содержащей целлюлозу, и измеряли активности ферментов: целлюлазы - по отношению к карбоксиметилцеллюлозе, и ксиланазы - по отношению к березовому ксилану. Новый мутант TW1-59-27 проявлял активности в 1,8 раза выше, в сравнении с исходным штаммом.

При *fed-batch* культивировании в 1-литровых ферментерах с подпиткой лактозой, при pH – 4,5 продукция ферментов возрастала в 4-5 раз по сравнению с культивированием в колбах. Активности целлюлазы и ксиланазы у мутанта TW1-59-27 были выше, чем у TW1, в 1,8 и 2 раза соответственно, а содержание белка – в 1,5 раза.

Из культуральной жидкости, полученной в конце ферментации (144 часа) были изготовлены сухие ФП путем ультраконцентрации и лиофильного высушивания. Активность ферментов в сухих ФП у мутанта была выше в 1,3-1,8 раза по сравнению с ФП из исходного штамма (Табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов (общая в ед/г ФП и удельная в ед/мг белка) в ФП из исходного (TW1) и мутантного (TW1-59-27) штаммов.

Штамм	Целлюлаза		Ксиланаза	
	общая	удельная	общая	удельная
TW1	5550	7.4	2550	3,4
TW1-59-27	9180	13.5	3060	4,5

Была изучена температурная и pH-зависимость активности целлюлазы и ксиланазы в ФП мутанта TW1-59-27. Так, целлюлаза проявляла максимальную активность в диапазоне 55-65°C, а ксиланаза – строго при 60°C. Оптимальные значения pH - 4,5-5,0 (целлюлаза) и 5,0-6,0 (ксиланаза).

Компонентный состав ФП определяли методом FPLC. Мутагенез изменил соотношение индивидуальных ферментов, при этом общее содержание эндоглюканаз увеличилось с 7% (у TW1) до 13,5% (у TW1-59-27), в значительной степени – за счет увеличения доли ЭГ 1 (Табл. 2).

Таблица 2. Состав ФП, в % от содержания внеклеточного белка.

Ферменты (кДа)	TW1	TW1-59-27
Целлюлазы:		
ЦБГ I (65)	47	43
ЦБГ II (53)	24	23
ЭГ I (57)	2	9
ЭГ II (48)	3	4
ЭГ III (25)	2	0,5
БГЛ I (115)	0,5	0,5
Ксиланазы:		
КСИЛ I (20)	1	1
КСИЛ II (21)	1	1
КСИЛ III (30)	0,5	0,5
Другие белки:		
	19	18

Эндоглюканаза ЭГ1 *T. longibrachiatum* обладает высокой активностью по отношению к некрахмальным полисахаридам зерен пшеницы, ржи (β -глюкану, глюкоманнану, ксилану и др.) и тем самым значительно увеличивает питательную ценность кормов на основе этих злаков.

Таким образом, ФП с повышенным содержанием ЭГ1, полученный на основе нового мутанта TW1-59-27, является перспективным для использования в качестве ферментативной добавки к кормам животных и птиц в сельском хозяйстве.

Список литературы

1. Патент РФ №2195490, 2002г

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗЕМЕЛЬ, НАРУШЕННЫХ В ПРОЦЕССЕ ДОБЫЧИ ТОРФА

Булавко Г.И., Яковлев А.П.

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: A.Yakovlev@cbg.org.by*

Промышленная разработка торфяных болот сопровождается полным уничтожением природного комплекса: гибелью всех компонентов биоты и выходом на поверхность донных слоёв. Остаточный после промышленной добычи слой торфа не является почвой в общепринятом значении этого слова, поскольку не обладает естественным плодородием. Сразу же после выработки торфа начинается заселение пустующих площадей новыми видами с прилегающих к торфяному массиву территорий, но восстановление нарушенного биогеоценоза идёт очень медленно и может продолжаться несколько десятков лет, вследствие низкой биологической активности субстрата, острого дефицита биогенных элементов и кислой реакции среды, повышенного содержания закисных соединений [1, 2].

Сельскохозяйственная и лесохозяйственная рекультивация выработанных торфяников сопровождается изменением физических, химических и биологических свойств остаточного слоя торфа. При правильном восстановлении утраченного плодородия этих площадей улучшаются условия обитания микроорганизмов, усиливается биологическая активность торфа. В зависимости от характера рекультивационных мероприятий изменяется численность, разнообразие, состав комплексов микроорганизмов, что является следствием происходящих сукцессионных процессов [3-5].

В этой связи, было проведено сравнительное исследование сезонной динамики почвенной микробиоты в корнеобитаемом слое на открытом целинном участке и под экспериментальными посадками ягодных растений.

Определение биомассы физиологически активных микроорганизмов (ФАМ) в торфяном субстрате осуществляли 3-5 раз за сезон с использованием метода [6], основанного на измерении интенсивности дыхания образца, обогащенного легкоокисляемым и универсально доступным субстратом, в качестве которого использовали глюкозу, а также на предположении, что интенсивность дыхания пропорциональна суммарной биомассе микроорганизмов [7]. Значение метаболического коэффициента вычисляли как отношение микробной биомассы, заключенной в 1 г субстрата, к количеству выделенной ею в течение часа углекислоты [8]. Все измерения производили в 3-5-кратной повторности.

Биомасса физиологически активных микроорганизмов и характер ее сезонной динамики в торфяном субстрате в условиях эксперимента заметно различались, в зависимости от вида произрастающих на нем растений. К примеру, под растениями тростника обыкновенного величина микробной массы была

весьма незначительной, со слабо выраженными ее сезонными изменениями – от 332 мкг С/г в мае до 459 в июле и 369 мкг С/г в сентябре.

Под ягодными же растениями активно функционирующих микроорганизмов оказалось существенно больше. Наиболее благоприятные условия для их развития обнаружены под растениями клюквы крупноплодной, обусловившими наиболее высокие запасы микробной массы в корнеобитаемом слое (0-20 см). На протяжении вегетационного периода наблюдалось их последовательное снижение от 661 мкг С /г в мае до 476 в июле и 440 мкг С/г в сентябре.

Интегральным показателем активности микробоценоза считают метаболический коэффициент (qCO_2). Его величина, полученная в условиях эксперимента под разными растениями, свидетельствует о слабой микробной активности исследуемого субстрата, поскольку значения данного коэффициента в нем не превышали 0,15%.

Полученные результаты указывают на то, что исследуемые виды сем. *Ericaceae* в разной степени влияют на функционирование почвенных микроорганизмов. Тем не менее все они способствовали активизации жизнедеятельности эдафобионтов в корнеобитаемом слое, что должно в перспективе обусловить восстановление почвенного покрова и стабилизацию экосистемы в целом. При этом установленное в эксперименте сглаживание сезонных колебаний массы микроорганизмов и показателей их жизнедеятельности указывает на ослабление степени их зависимости от внешних факторов. Это позволяет заключить, что создание ягодных насаждений на площадях, оставшихся после торфодобычи, экологически целесообразно.

Список литературы

1. Выработанные торфяные месторождения, их характеристика и функционирование / Л.И. Инишева [и др.]. – Томск: изд-во ТГПУ, 2007. – 185 с.
2. Широких, А.А. Микрофлора и биологическая активность выработанных торфяников в процессе их рекультивации : автореф. дис... канд. биол. наук : 03.00.07 / Институт микробиологии АН БССР. – Мн., 1991. – 22 с.
3. Микробные ценозы торфяных почв и их функционирование / Т.Г. Зименко [и др.]; Под ред. Мишустина Е.Н. – Минск: Наука и техника, 1983. – 181 с.
4. Головченко, А.В. Структура и запасы микробной биомассы в олиготрофных торфяниках южно-таежной тайги Западной Сибири / А.В. Головченко, Т.Г. Добровольская, Л.И. Инишева // Почвоведение. – 1992. – № 12. – С. 1468–1473.
5. Широких, И.Г. Микробные сообщества кислых почв Северо-Востока Европейской части России : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.27, 03.00.07 / МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2004. – 44 с.
6. Мирчинк, Т.Г. Современные подходы к оценке биомассы и продуктивности грибов и бактерий в почве / Т.Г. Мирчинк, Н.С. Паников // Успехи микробиологии. – М.: Наука, 1985. – Т. 20. – С. 198–226.
7. Anderson, J.P.S. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils / J.P.S. Anderson, K.H. Domsch // Soil Biol. Biochem. – 1978. – V. 10. – P. 215–221.
8. Ананьева, Н.Д. Микробиологическая оценка почв в связи с самоочищением от пестицидов и устойчивостью к антропогенным воздействиям: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / МГУ им. М.В. Ломоносова. – М., 2001. – 50 с.

ВЛИЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Гаранович И.М.¹, Алещенкова З.М.²

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: bel.dendr@gmail.com

²Институт Микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: aleschenkova@mbio.bas-net.by

В современном питомниководстве все большее внимание уделяется качеству посадочного материала, технологиям ускоренного выращивания саженцев. В этой связи особое значение приобретают микробиологические препараты, как экологически безопасные. Их действие обусловлено активизацией процессов усвоения элементов питания, повышением содержания полезных микроорганизмов в почве и др.

Биологический препарат Гордебак предназначен для повышения урожайности зерновых культур путем предпосевной обработки семян, вегетирующих растений с целью получения экологически чистой продукции с высокими техническими свойствами и снижения доз минеральных удобрений.

Основа микробного препарата: высокоактивные штаммы азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов, обладающих комплексом хозяйственно ценных свойств. Высокая жизнеспособность *Enterobacter* sp. В-402 Д и *Enterobacter* sp. В-409Д позволяет использовать Гордебак, как жидкий, так и торфяной. Препарат стимулирует энергию прорастания и всхожесть семян, интенсифицирует процесс биологической фиксации азота и биологической трансформации фосфора, повышает урожайность. ТУ ВУ 100289066. 046 – 2009. № государственной регистрации 11–08–0009. Бинарный микробный препарат Гордебак не обладает патогенными, токсическими и раздражающими свойствами. Предоставлен лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений института микробиологии НАН Беларуси.

Микробный препарат Бактопин предназначен для предпосевной обработки семян, вегетирующих растений с целью стимуляции роста посадочного материала, повышения выхода стандартного посадочного материала и экономии минеральных удобрений, интенсифицирует процесс биологической фиксации азота и биологической трансформации фосфора. Приживаемость растений повышается до 2-х раз, средняя высота – в среднем на 10%.

Действующее начало препарата: азотфиксирующий штамм *Rahnella aquatilis* Е 10, фосфатмобилизующий штамм *Pseudomonas putida* П 2, арбускулярно-микоризные грибы (АМГ) рода *Glomus* и продукты их метаболизма.

С целью расширения сферы применения препаратов было проведено их испытание для обработки корневых систем и вегетирующих органов укорененных черенков декоративных древесных интродуцентов.

Корневые системы укорененных черенков декоративных древесных растений перед посадкой на доращивание замачивали в 2 % растворе препарата Гордебак в течение 12 часов. Второй вариант: высаженные в субстрат укорененные черенки поливали раствором препарата.

Использовали 2,5 % раствор Бактопина при той же экспозиции для обработки корневых систем декоративных растений хвойных пород и полива.

В конце вегетационного периода высота 2-х летних растений спиреи японской составляла 19,0 см (контроль 18,2), длина корневых систем достигала 21,7 см (контроль 17,0). Для форзиции европейской эти показатели соответственно равны 17,6 см (контроль 14,2) и 28,2 см (контроль 26,0). В варианте с поливом саженцы спиреи японской достигали 29,7 см (контроль 26,9), корни – 24,7 см (контроль 22,0). У форзиции европейской соответственно 19,8 см (контроль 18,0) и 26,7 см (контроль 20,0).

Как видим, при использовании Гордебака корневые системы формировались более длинными. Растения имели также большую высоту, особенно у спиреи японской при поливе. Действие препарата эффективно как в варианте с замачиванием перед посадкой, так и в варианте с поливом.

Использование Бактопина путем замачивания корневых систем у туи западной дало следующие результаты: высота растений 20,7 см (контроль 20,0), длина корневых систем 17,5 см (контроль 17,0); у можжевельника казацкого соответственно 25,5 см (21,0) и 19,0 см (17,0). При поливе саженцы туи достигали высоты 37,5 см (контроль 25,0), длина корней – 33,2 см (17,0). У можжевельника казацкого – 41,2 см (25,0) и 23,2 см (17,0).

Таким образом, в опытных вариантах у обоих видов развивалась более мощная и длинная корневая система, растения имели также большую высоту, особенно в варианте с поливом. В сравнительном плане препарат Бактопин представляется более эффективным препаратом. Оба препарата существенно влияли на качество корневой системы. Она формировалась более мочковатой, что имеет важное значение в дальнейшем при пересадке растений, создавая значительные преимущества для приживаемости, роста и развития.

Приведенные данные показывают целесообразность применения микробных препаратов для бактеризации декоративных древесных растений. Позитивный эффект от применения биопрепаратов в условиях *ex vitro*, вероятно, связан не с непосредственным действием микроорганизмов на растения, а возникает благодаря созданию благоприятных условий для роста саженцев в почвенных условиях.

НАУКОЕМКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS* И *METHYLOBACTERIUMS*, ИХ РОЛЬ В ОРГАНИЧЕСКОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ И ЭКОЛОГИЗАЦИИ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Горбунов О.П.¹, Доронина Н.В.², Ежов В.А.², Троценко Ю.А.²

¹ООО БФ «Экофарм», Пушино, Россия, e-mail: ekofarm@itaec.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Москва, Россия

Бактерии рода *Pseudomonas* являются антагонистами широкого спектра фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания зерновых и овощных культур. Наряду с антагонизмом против патогенов этот род бактерий обладает способностью стимулировать рост и развитие растений, находясь в симбиозе с ними. Более 20 лет препараты на основе данных бактерий используются в сельском хозяйстве, конкурируя с химическими средствами защиты растений.

Механизм действия препаратов Псевдобактерин-2Ж и Елена-Ж основан на выделении корневыми волосками растения углерода в виде сахаров, которые запускают механизм размножения бактерий и выработки ими комплекса феназиновых и триглицеридпептидных антибиотиков, супрессирующих рост фитопатогенных грибов. Феназины взаимодействуют с флавиновыми окислительно-восстановительными ферментами с образованием активных форм кислорода (супероксида и пероксида водорода), которые обладают цитотоксическим действием. Кроме того активные формы кислорода активизируют защитные гены растительных клеток. Штаммы способны также продуцировать сидерофоры, связывающие железо и делающие его недоступным для почвенных патогенов, синтезируют индолил-3-уксусную кислоту, являющуюся стимулятором роста растений, разлагает неорганические фосфаты, превращая их в форму, доступную для растений.

В процессе производства штамм BS1393 (Псевдобактерин-2Ж) и штамм ИБ-51 (Елена-Ж) активизируются на наличие комплексной ферментативной активности, что делает возможным в сочетании с феназинами (у Псевдобактерин-2Ж) и триглицеридпептидами (у Елены-Ж) активизировать гиперпаразитизм на личинках грызущих насекомых, живых грибах, в том числе на патогенах, а также разрушать клеточные стенки остатков грибов, ускоряя тем самым углеродный цикл за счет минерализации органических остатков; 60-70% этих остатков достаются растениям в виде хорошо усваиваемых органических форм азота, фосфора, калия (N, P, K) и микроэлементов. Известно, что 80-90% биомассы верхнего 20-сантиметрового слоя почв составляют различные виды грибов. В разных климатических условиях это составляет от 1 до 10 т/га. Клеточная стенка грибов, состоящая из полисахаридов хитина и глюкана, разлагается комплексом

ферментов, выделяемых штаммом до низкомолекулярного хитозан-глюканового комплекса, который обладает высокими иммуностимулирующими свойствами, поднимающими иммунитет и защитные свойства корневой и вегетирующей части растений.

Биопрепараты Псевдобактерин-2Ж, Елена-Ж, Азолен, имеющие государственную регистрацию в РФ, технологичны в производстве при культивировании в течение 24-28 ч на дешевых питательных средах, плотность биомассы достигает 7×10^{10} - 2×10^{11} КОЕ/мл (70-100 млрд. живых клеток в 1 мл). Это дает возможность уменьшить нормы расхода препарата до 50 г на 1 т семян и при работе по вегетации; 50 г на 1 га осенью по всходам озимых, весной 100 г на 1 га в фазе кущения и 150 г на 1 га в фазе флага. При этом стоимость препарата для данных обработок составляет 500-600 рублей (12-15 Евро) на 1 га. При выращивании пшеницы, данные расходы полностью покрывает прибавка урожая в 1-1,5 ц/га, при общей прибавке 25-30% и более, в зависимости от агрофона, что гораздо экономически выгоднее использования химических средств защиты. А если учитывать тот факт, что получаемая продукция экологически чистая, экономический эффект может быть еще большим. Использование данных биологических средств защиты позволяет сохранять и даже увеличивать гумусовую составляющую, поддерживая тем самым плодородие почв. Так же использование биопрепаратов позволяет значительно увеличивать процент усвоения (50-100%) растениями вносимых минеральных и органических удобрений, что позволяет более рационально их использовать.

Многолетние исследования по совмещению биологических препаратов Псевдобактерин-2Ж, Елена-Ж, Азолен и др., с препаратом на основе штамма *Methylobacterium extorquens* G10 показали их совместимость, не высокую конкурентоспособность между собой к специальной питательной среде, с сохранением фунгицидной активности и гиперпаразитизма к тестовым грибам в лабораторных условиях.

Штамм *M. extorquens* G10 представлен грамотрицательными подвижными неспорообразующими палочками, нейтрофил, мезофил, характеризуется высокой устойчивостью к ультрафиолету, замораживанию и высушиванию. Фитосимбионт, использующий естественные продукты метаболизма растений – метанол, метиламины, формальдегид, формиат в качестве источников углерода и энергии изоцитратлиазонегативным путем C_1 -метаболизма. Синтезирует и накапливает гранулы полигидроксибутиролатерата. Синтезирует ряд биоактивных веществ (ауксины, цитокинины, витамин B_{12}). При колонизации растений образует стабильную связь, что выявлено при микроклональном размножении растений. Стимулирует прорастание семян и развитие как двудольных, так и однодольных растений.

Испытания в ВНИИЗР г. Рамонь, ТНИИСХ Тульская обл., а также в хозяйствах черноземной зоны, республики Мордовия, и др, при нормальных, и экстремальных погодных условиях (высокая температура, недостаток влаги), показали высокую эффективность по борьбе с болезнями растений, а также повысили их устойчивость к засухе и увеличили количество и улучшили качество зерна. В зависимости от агрофона и погодных условий использование данных биопрепаратов, позволяет получить лучшие показатели по сравнению с химическими средствами защиты, как по количеству, так и по качеству урожая. Внедрение этих препаратов в сельском хозяйстве является одной из основ органического земледелия и альтернативой трансгенным технологиям.

Список литературы

1. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. «Хитиназы как один из факторов противогрибковой активности бацилл-антагонистов Материалы 9-ой Международной конференции г. Ставрополь 13-17 октября 2008 г.
2. Горбунов О.П. Бактерии рода *Pseudomonas* - углеродный цикл, защита и стимуляция растений. Вестник биотехнологии и физико-химической технологии им. Ю.А. Овчинникова Т4 №1 2008 г.
3. Горбунов О.П. «Бактерии рода *Pseudomonas* - углеродный цикл, защита и стимуляция растений» научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» г. Минск 31 мая-4 июня 2010г. (Пленарный доклад).
4. Горбунов О.П. Бактерии рода *Pseudomonas* : Углеродный Цикл, Защита И Стимуляции Растений // Иммунопатология аллергология инфектология №1 2010г. стр.97.
5. Ю.И. Ершов «Органическое вещество биосферы и почвы» стр.20-85. изд. «НАУКА» г. Новосибирск 2004г.
6. Кочетков В.В. Чигалейчик А.Г. Петрикевич С.Б. «Биопрепарат Псевдобактерин–2Ж для защиты растений от широкого спектра фитопатогенов» // Химия в сельском хозяйстве 1997г. №1 стр. 15-16.
7. Логинов О.Н. «Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии» г. Москва изд. Наука 2005 г.
8. В.В. Смирнов Е.А. Киприанова и А.Д. Гарагуля, В.М., Гораль, Н.В. Ланна. Антимикробные и Энтомонатогенные свойства штаммов *Pseudomonas Aureofaciens* // Прикладная Биохимия и микробиология 1999г. том 35 №4 стр. 413-416.
9. Широков А.Л. Автореферат диссертации «Миколитические ферменты бактерий *Bacillus subtilis* и их роль в антагонизме к почвенным микромицетам» Уфа 2004г.
10. Худяков Я.П. Литическое действие почвенных бактерий на почвенные грибы. Микробиология 1935г. Т4 №2 стр. 139-203.
11. Троценко Ю.А. Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метилобактерии, г.Пушино ОНТИ ПНЦ РАН 325 стр.2010г. Отв. ред. В.Ф. Гальченко.
12. Доронина Н.В., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А., Смолянина С.О., Беркович Ю.А. Стимуляция облигатными метилотрофными бактериями морфогенеза и антигрибной устойчивости китайской капусты. Биотехнология. 2009. №6. С. 57-61.

ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Живых А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский сельскохозяйственный центр» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, Москва, Россия, e-mail: av_zh@mail.ru

В Российской Федерации в 2014 г. пестициды были применены на площади 79553 тыс. га, из них биопестициды и энтомофаги в полевых условиях были использованы на площади 1870,5 тыс. га. В наибольшем объеме биопестициды применяли в Ставропольском (334,79 тыс. га) и Краснодарском (250,26 тыс. га) краях, Ростовской (190,74 тыс. га), Тюменской (153,66 тыс. га), Тамбовской (128,87 тыс. га), Воронежской (97,97 тыс. га) областях, Республике Татарстан (79,4 тыс. га), Орловской (68,55 тыс. га), Белгородской (59,4 тыс. га), Самарской (43,67 тыс. га) областях.

Биопестициды также применяли для протравливания семян и клубней картофеля. Всего в 2014 г. было протравлено 6868,0 тыс. тонн семян, из них биопрепаратами – 126,61 тыс. тонн. Протравлено клубней картофеля было 527,36 тыс. тонн, из них биопрепаратами – 10,3 тыс. тонн.

Объем продаж биопестицидов в России оценивается на уровне 200 млн. рублей (около 3,6 млн. долларов США) в год. Применяются они ежегодно на площади около 1,3 млн. га в открытом грунте, что составляет 1,7% от общей площади пестицидных обработок. Одним из основных производителей биологических средств защиты растений в России являются лаборатории ФГБУ «Россельхозцентр» (производство биопрепаратов организовано в 30 филиалах организации). По данным экспертов биологической лаборатории ФГБУ «Россельхозцентр» нарабатывают около 73 % биопестицидов от общего объема произведенных биопрепаратов по стране и около 52 % энтомофагов. Наличие филиалов ФГБУ «Россельхозцентр» в 78 субъектах Российской Федерации дает возможность широкой пропаганды биометода и применения биопрепаратов.

В филиалах ФГБУ «Россельхозцентр» производятся энтомофаги: трихограмма (*Trichogramma evanescens*), златоглазка (*Chrysoperla carnea*), габробракон (*Habrobracon hebetor*); из биопестицидов - в основном биофунгицид Ризоплан (на основе *Pseudomonas fluorescens*), родентицид Бактероденцид (на основе бактерий *Salmonella enteritidis* var. *Issatchenko*) и др., из агрохимикатов – Ризоторфин (на основе бактерий *Rhizobium*).

Всего в 2014 г. лаборатории ФГБУ «Россельхозцентр» произвели 937,48 тонн биопрепаратов, что на 14,37 тонн больше чем в 2013 г. и на 256,06 тонн больше чем в 2012 г. Наибольшее количество биопрепаратов было произведено в филиалах ФГБУ «Россельхозцентр» по Ставропольскому краю

(314,36 тонн), Краснодарскому краю (103,56 тонн), Республике Татарстан (88,1 тонн), Кировской области (71,8 тонн), Тамбовской области (70,67 тонн) и др.

Производство энтомофагов осуществляли 4 лаборатории ФГБУ «Россельхозцентр». Всего в 2014 г. ими было наработано 7995,71 млн. шт энтомофагов (в 2013 г. – 7279,3 млн. шт). Энтомофаги производили ФГБУ «Россельхозцентр» по Белгородской области (4800 млн. шт), Ставропольскому краю (1700,1 млн. шт), Кабардино-Балкарской Республике (1360 млн. шт), Республике Татарстан (135,6 млн. шт).

Таблица – Объемы производства биологических средств защиты растений в Российской Федерации в 2014 г

Регион	Произведено микро-биологических препаратов, тонн		Произведено энтомофагов, млн. шт	
	Всего в России	в т. ч. в филиалах ФГБУ «Россельхозцентр»	Всего в России	в т. ч. в филиалах ФГБУ «Россельхозцентр»
Российская Федерация	1270,42	937,48	15263,58	7995,71
Центральный федеральный округ	171,99	160,73	6043,05	4800,0
Северо-Западный федеральный округ	12,63	12,63	255,18	0,0
Южный федеральный округ	406,26	110,69	544,79	0,0
Северо-Кавказский федеральный округ	359,34	359,34	3060,07	3060,07
Приволжский федеральный округ	301,77	275,66	2936,9	135,64
Уральский федеральный округ	0,00	0,00	27,6	0,0
Сибирский федеральный округ	18,14	18,14	2395,99	0,0
Дальневосточный федеральный округ	0,29	0,29	0,0	0,0

В 2015 г. филиалами ФГБУ «Россельхозцентр» планируется произвести 1154,8 тонн биопрепаратов и 8,4 млрд. шт энтомофагов. За первое полугодие 2015 г. в филиалах ФГБУ «Россельхозцентр» было произведено 734 тонны биопрепаратов, 3,7 млрд. шт энтомофагов.

Важной задачей на ближайшее время в России останется расширение количества биопрепаратов в Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Биопрепараты, зарегистрированные и включенные в каталог, требуют дальнейших испытаний для увеличения спектра их применения на большее количество сельскохозяйственных культур.

ЗАВИСИМОСТЬ РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В КОРНЕОБИТАЕМУЮ СРЕДУ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* ОТ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ПОЧВОГРУНТА

Калацкая Ж.Н.¹, Ламан Н.А.¹, Молчан О.В.²,
Братанова М.А.¹, Фролова Т.В.¹

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, e-mail: kalatskayaj@mail.ru

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Широкое применение микробиологических препаратов в растениеводческой практике во многом сдерживается нестабильностью их положительного эффекта. Как известно, низкая эффективность инокуляции часто обусловлена особенностями взаимодействия микробных популяций в почве, уровнем микробно-растительной интеграции и различными агроэкологическими факторами. Реализация потенциальных возможностей интродуцированных микроорганизмов и максимальная их эффективность могут быть достигнуты при оптимизации состава и соотношения компонентов и физико-химических свойств корнеобитаемой среды. В то же время закономерности, определяющие оптимальный состав почвогрунтов для эффективного функционирования интегрированных в них микробных систем, остаются до конца невыясненными [1-5]. В лабораторных опытах исследовано влияние компонентного состава бактеризованных почвогрунтов, без содержания элементов питания, на особенности роста и развития растений салата листового (*Lactuca sativa* var. *crispa*) сорт Афицион. В состав почвогрунта включали нейтрализованный верховой и переходной торф, агроперлит или керамзит в соотношении (2:1) и инокулят спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* М 9/6 в количестве 20 мл/л субстрата, характеризующийся следующими показателями: титр КОЕ – $2,5 \times 10^9$ /мл; спор – $1,8 \times 10^9$ /мл, антагонистическая активность (оценивали методом лунок по диаметру зон ингибирования роста фитопатогенных тест-объектов *Fusarium oxysporum* и *Pseudomonas syringae*) – 29,0-31,0 и 28,0-30,0 мм соответственно. В часть бактеризованных торфосмесей добавляли бентонитовую глину (ГОСТ 28177-89), глинистое сырье (ГОСТ 9169-75) или трепел (месторождение в Могилевской обл., РБ) в соотношении 1 г минерального сырья на 1 л почвогрунта. В отдельные варианты опыта к торфосмеси добавляли сапропель (ТУ РБ 03535026.287-97) в соотношении 6:1 по объему.

Установлена высокая ростстимулирующая активность штамма М 9/6 бактерий *Bacillus subtilis* на растениях салата при их выращивании на бактеризованной торфосмеси. У растений салата на 28-й день вегетации (техническая спелость) длина листьев увеличилась на 72%, содержание фотосинтетических пигментов в пересчете на сухое вещество на 33%, а биомасса побега в 4,7 раза. Бактерилованный почвогрунт, включающий керамзит, оказал более благопри-

ятное влияние на рост и развитие растений салата в сравнении с составом, содержащим агроперлит. Однофакторный дисперсионный анализ показал, что растения, формирующиеся на почвогрунте, включающем глинистые компоненты или трепел и *Bacillus subtilis*, превосходят по морфофизиологическим параметрам растения варианта – торфосмесь с бактериальным препаратом. Добавление минеральных компонентов в бактеризованную торфосмесь способствует формированию растений салата с длиной побега на 12% больше в варианте с бентонитом, на 7% – с глиной и на – 5% с включением трепела и массой надземной части на 27%, 24% и 45% соответственно большей по сравнению с растениями на бактеризованной торфосмеси без глинистого сырья, при этом достоверных различий между вариантами с включением глины или бентонита не зарегистрировали. Применение сапропеля вызвало угнетение прорастания и в дальнейшем замедление роста и развития салата. Так масса надземной части растений уменьшилась от 25 до 55% в зависимости от компонентного состава субстрата. Инокуляция бактериальным препаратом несколько нивелировала негативное действие сапропеля, однако по морфометрическим показателям данные растений не достигали контрольных.

Таким образом, установлена высокая ростстимулирующая активность штамма спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* М 9/6 на рост растений салата листового и зависимость активности бактерий от компонентного состава почвогрунта. Показано, что введение сапропеля в торфосмесь в соотношении 6:1 по объему оказывает негативное влияние на развитие надземной части салата листового. Применение керамзита в сравнении с перлитом в качестве минерального компонента почвогрунта способствует более выраженной ростстимулирующей активности спорообразующих бактерий. Отмечен также положительный эффект введения в состав почвогрунта высокодисперсных минеральных компонентов (трепела, глинистых материалов).

Список литературы

1. Белимов А.А., Кунакова А.М., Груздева Е.В. Влияние рН почвы на взаимодействие ассоциативных бактерий с ячменем // Микробиология. – 1998. – Т. 67. – С. 561-568.
2. Шапошников А.И., Белимов А.А., Кравченко Л.В., Виванко Д.М. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями и факторы эффективности ассоциативных симбиозов // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №3. – С. 16-22.
3. Эффективность применения фосфатмобилизующих инокулянтов на посевах пшеницы на эродированных дерново-подзолистых почвах на моренных суглинках/ Н. А. Михайловская [и др.] // Почвоведение и агрохимия. – 2013. – Т.№ 1(50). – С.306-319.
4. Lugtenberg B.J.J. Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms // Antonie van Leeuwenhoek, 2002. – Vol. 81., № 1/4. – P. 373-383.
5. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Молекулярные основы конструирования высокопродуктивных экологически устойчивых агроценозов // Экологическая генетика. – 2011. – Т.9., № 3. – С. 23-26.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* BZR 336G – ПРОДУЦЕНТА БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФУЗАРИОЗА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МИНЕРАЛЬНОМ УДОБРЕНИИ

Козицын А.Е., Асатурова А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты
растений», Краснодар, Россия, e-mail: bioscontrol-vniibzr@yandex.ru

Для большого количества сельскохозяйственных культур, на данный момент, существуют эффективные средства протекции растений, рекомендуемые к совместному использованию с химическими средствами, а порой и полностью их заменяющие. Биологический способ защиты растений, в сравнении с химическим, имеет ряд преимуществ. Биологический метод защиты не нарушает микробиологический состав почвы, не способствует концентрации токсичных соединений в грунте, плодах, зерне и других частях растения, не загрязняют водоемы и грунтовые воды, не представляют угрозу для животных и человека [1].

Настоящая работа направлена на совмещение комплексных минеральных удобрений широкого спектра использования с опытным образцом биопрепарата на основе бактерии *Bacillus subtilis* BZR 336g как совместного продукта, который впоследствии, возможно, позволит решить несколько проблем: повышение плодородия почвы за счет внесения в нее дополнительных питательных элементов и защиты растений от ряда экономически значимых заболеваний.

Жидкую культуру (ЖК) опытного образца биопрепарата наносили на гранулы минерального удобрения из расчета 1:5 (6 вариантов) и 1:10 (1 вариант). Для равномерного распределения ЖК на поверхности гранул колбы встряхивали на шейкере в течение 20 мин и 180 об/мин [2]. Далее осуществляли высушивание гранул. Схема представлена в таблице.

Таблица – Схема закладки опыта

Способ высушивания гранул после нанесения жидкой культуры на основе <i>B. subtilis</i> BZR 336g	Температура высушивания, °С		
	Встряхивание	+24,0	+35,0
Сушка на фильтровальной бумаге	+24,0	+35,0	+60,0

Для определения численности адсорбированных бактериальных клеток в процессе хранения использовали метод Коха [3]. Оценку антифунгальной активности штамма-продуцента биопрепарата *B. subtilis* BZR 336g в отношении *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai в процессе хранения производили ежемесячно.

В результате проведенных исследований установлено, что динамика численности имела схожую тенденцию во всех вариантах опыта, ни в одном варианте не отмечено значительного снижения численности бактериального агента в сравнении с начальным титром. В вариантах сушки гранул удобрения на фильтровальной бумаге титр за 5 месяцев хранения несколько возрос с $9,15 \times 10^6$ до $9,72 \times 10^6$ КОЕ/мл при температуре хранения $+24,0^\circ\text{C}$, при температуре $+35,0^\circ\text{C}$ и $+60,0^\circ\text{C}$ снизился с $1,42 \times 10^7$ до $6,15 \times 10^6$ КОЕ/мл и с $1,16 \times 10^7$ до $5,44 \times 10^6$ КОЕ/мл соответственно. Снижение титра продемонстрировал вариант с количеством инокулята 1:10 с $8,30 \times 10^6$ до $7,14 \times 10^6$ КОЕ/мл. В случае сушки в термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании гранул титр снизился за 5 месяцев хранения с $1,04 \times 10^7$ до $9,90 \times 10^6$ КОЕ/мл при температуре хранения $+24,0^\circ\text{C}$, с $1,78 \times 10^7$ до $8,63 \times 10^6$ КОЕ/мл при $+35,0^\circ\text{C}$, так же наблюдалось снижение титра с $1,66 \times 10^7$ до $1,08 \times 10^7$ КОЕ/мл при $+60,0^\circ\text{C}$.

Антифунгальная активность гранул удобрения с нанесением ЖК на основе штамма *B. subtilis* BZR 336 g незначительно снизилась в процессе хранения во всех вариантах опыта. Уменьшение диаметра зоны ингибирования (зона задержки роста *F. oxysporum* var. *orthoceras* вокруг гранулы минерального удобрения на твердой питательной среде) отмечено в вариантах сушки на фильтровальной бумаге с 9 до 8 мм при $+24,0^\circ\text{C}$ (1:5), с 13 мм до 7 мм при $+35,0^\circ\text{C}$, с 9 мм до 7 мм при $+60,0^\circ\text{C}$ и с 8 мм до 9 мм при $+24,0^\circ\text{C}$ (1:10).

В результате установлено, что наиболее высокая антифунгальная активность в отношении *F. oxysporum* var. *orthoceras* наблюдалась в варианте с высушиванием на фильтровальной бумаге при температуре $+24,0^\circ\text{C}$ и с меньшей дозой инокулята, что свидетельствует о слабой зависимости антифунгальной активности от объема ЖК биопрепарата, в связи с чем можно предположить, что эффективность определяется количеством адгезированных клеток именно на поверхности гранул. При этом лучшими условиями сохранения численности адсорбированных клеток на поверхности гранул минерального удобрения «ОМУ» при высушивании по результатам исследования является способ перемешивания гранул при температуре $+60,0^\circ\text{C}$ в орбитальном шейкере.

Список литературы

1. Шакин А.П., Хрянин В.Н., Салтанова А.И., Разоренова Г.А. Применение бактериальных удобрений при выращивании сельскохозяйственных культур // Известия ПГПУ «Естественные науки». – 2006. - № 1 (5). – С. 71-73.
2. Alejandro Pérez-García, Diego Romero, Antonio de Vicente. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture // Current Opinion in Biotechnology. – 2011. – Volume 22. - № 2, - P. 187-193.
3. Нетрусов Ф.И. Практикум по микробиологии / Ф.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

РЕКОМБИНАНТНАЯ КСИЛАНАЗА *STREPTOMYCES COELICOLOR* АС-738: ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КСИЛАН-СОДЕРЖАЩЕЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЁ

Лисов А.В., Белова О.В., Андреева-Ковалевская Ж., Бударина Ж.,
Солонин А.С., Винокурова Н.Г., Леонтьевский А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия, e-mail: ssl204@rambler.ru

Клеточная стенка растений – сложноорганизованный орган, состоящий преимущественно из полимеров: целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина. Ксилан – основной компонент гемицеллюлоз, составляющих 20-30% растительной биомассы. Центральную роль в процессе его разложения играет эндо-β-1,4-ксиланаза (ЕС 3.2.1.8), которая катализирует распад ксилана до ксилоолигосахаридов различной длины. Ксиланазы широко используются в сельскохозяйственном производстве и ряде отраслей промышленности, ориентированных на переработку растительного сырья. В настоящее время ксиланазы нашли широкое применение в пищевой промышленности для повышения выхода и качества продукции в производствах хлеба, соков, вин, пива, спирта. Ксиланазы используются с высокой эффективностью в целлюлозно-бумажной промышленности для отбеливания бумажной пульпы. Они улучшают качество грубых кормов для сельскохозяйственных животных и птицы.

Из биомассы штамма *Streptomyces coelicolor* Ас-738 был получен препарат ДНК. При подборе праймеров для ПЦР за основу брали последовательность эндо-1,4-β-ксиланазы генома *S. coelicolor* А3(2). Для клонирования полученных ПЦР фрагментов и трансформации компетентных клеток *E. coli* М15[pREP4] использовали вектор pQE-30 (Qiagen). Аминокислотная последовательность XSC73 была идентична последовательности ксиланазы *S. coelicolor* А3(2) из GenBank (NCBI Reference Sequence of protein: NP_624448.1) и имела большое сходство с гидролазами семейства GH11 представителей рода *Streptomyces*. Ксиланаза XSC738 содержала только каталитический домен, углевод-связывающий домен отсутствовал.

Препарат ксиланазы получали в две стадии методами металл хелатной хроматографии и последующей гельфильтрации. Молекулярная масса составила 24 кДа. Оптимум активности ксиланазы наблюдался при значении pH 6,0, но фермент сохранял высокую активность при кислых и щелочных значениях pH. При инкубации в течение часа при температуре 50°C активность XSC738 почти не уменьшалась. При 60°C фермент достаточно долго сохранялся активным и быстро инактивировался при 70°C. Было изучено влияние ионов металлов и различных химических веществ на активность XSC738. Ингибирование наблюдалось при добавлении Cd^{2+} , EDTA и SDS, увеличение активности в присутст-

вии ионов Mn^{2+} на 36% и с Co^{2+} на 14%. Такие ионы как Fe^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} и неионный детергент Tween 100 уменьшали активность на 12–15%.

Ксиланаза осуществляла деструкцию ксилана, но не гидролизовала целлюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Продукты гидролиза ксилана древесины бука были типичны для ксилиназ семейства GH11: ксилотриоза, ксилотетраоза, ксилопентоза и ксилогексоза. Формирования ксилозы – основного продукта гидролиза ксилана, ксиланазами семейства GH10, не было обнаружено. Изучалось действие ксиланазы на растительное сырьё, применяемое для получения кормов животных. Во всех случаях наблюдалось увеличение количества восстанавливающих сахаров, что говорит о гидролизе ксилана и увеличении питательности животных кормов.

Получена рекомбинантная ксиланаза бактерии *Streptomyces coelicolor* Ac-738. Фермент обладает нейтральным оптимумом pH, умеренной термостабильностью и активен в широком диапазоне pH. Гидролиз ксилана растительного сырья под воздействием ксиланазы указывает на высокий потенциал использования фермента для улучшения питательности кормов животных.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СИНТЕЗ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНОЛА У БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* БИМ В-446

Муратова А.А., Мандрик-Литвинкович М.Н., Титок М.А., Носонова Т.Л.,
Евдокимова О.В., Валентович Л.Н., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: mandryk_maryna@tut.by

Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* играют важную роль в регуляции микробно-растительных взаимоотношений, благодаря способности синтезировать широкий спектр биологически активных соединений (пигменты, гормоны, антибиотики и др.). Среди антимикробных соединений определен интерес представляет поликетидный антибиотик 2,4-диацетилфлороглюцинол (2,4-ДАФГ), обладающий антифунгальной, антибактериальной, противовирусной и немацидной активностями [1]. У бактерий *Pseudomonas* биосинтез 2,4-ДАФГ детерминируется пятью структурными генами (*phlACBDE*), негативно регулирующимися продуктами генов *phlF*, *phlG* и *phlH* [2,3].

Целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез 2,4-ДАФГ у бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446.

Бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 являются основой биопрепарата “Экогрин”, используемого для борьбы с фитопатогенами в условиях малообъемной гидропоники [4]. Сиквенс-анализ генома данных микроорганизмов позволил выявить ряд генетических детерминант, обеспечивающих практически важные свойства. В частности, выявлен локус, включающий структурные и регуляторные гены, определяющие синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола. Филогенетический анализ белка-репрессора *PhlF* позволил установить его наибольшее родство с таковым *Pseudomonas brassicacearum* (гомология составила 99%) (рис. 1).

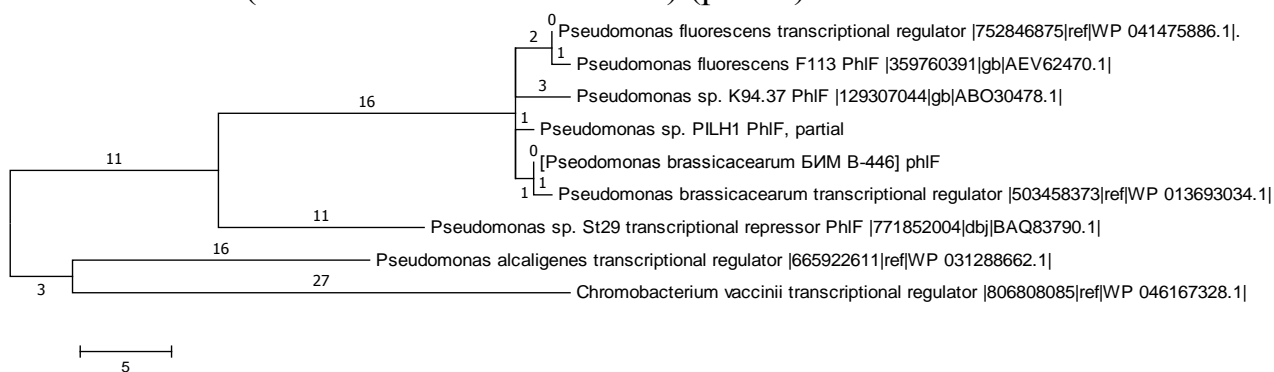


Рисунок 1 – Результаты филогенетического анализа регуляторного белка *PhlF* бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446

С использованием масс-спектрометрического анализа установлено, что культуральная жидкость после выращивания бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 в полноценной среде содержит 2,4-ДАФГ в концентрации 2,9 мг/л.

Для изучения роли 2,4-ДАФГ в антимикробном действии исследуемого штамма получены мутантные варианты с дефектным геном *phlA* (ключевая детерминанта, определяющая синтез антибиотика) и с дефектным геном *phlF* (определяет синтез репрессора). Мутанты получали путем введения в бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 суицидальных плазмид рК18mob, содержащих фрагменты генов *phlA* и *phlF*, в состав которых встроен интерпозон омега, определяющий устойчивость к стрептомицину. В результате рекомбинации между плазмидой и хромосомой были отобраны варианты с инактивацией генов *phlA* и *phlF*.

Установлено, что в культуральной жидкости мутантов с нарушенным геном *phlA* обнаруживались только следовые количества антибиотика (Рис 2, В). При этом мутанты утрачивали антимикробные свойства. В тоже время уровень продукции 2,4-ДАФГ у регуляторных мутантов с нарушенным геном *phlF* достигал 7,8 мг/л, что в 2,7 больше, чем у бактерий дикого типа (Рис 2, А, Б).

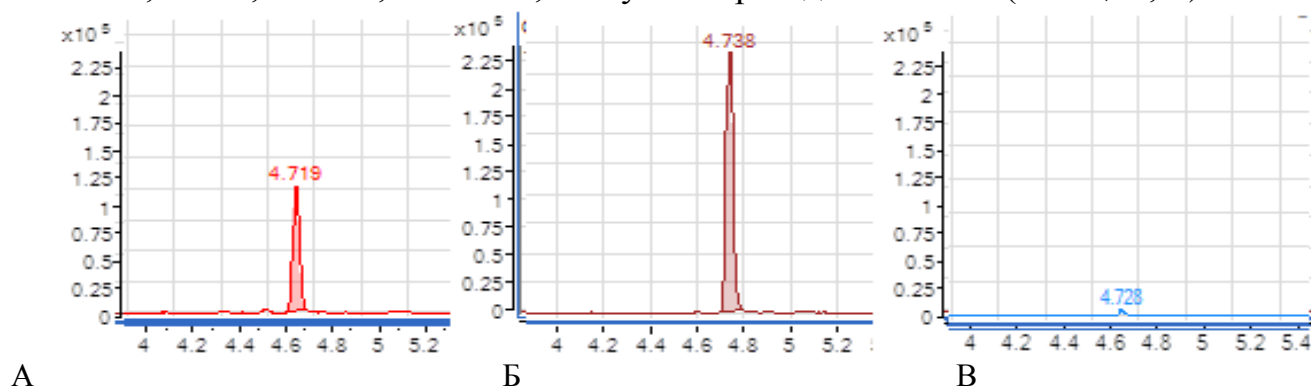


Рисунок 2 – MS-спектр 2,4-ДАФГ: А) дикий тип; Б) мутант с нарушенным геном *phlF*; В) мутант с нарушенным геном *phlA*

Таким образом, в ходе выполнения работы показано наличие в геноме штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 локуса, детерминирующего синтез белка 2,4-ДАФГ, необходимого для проявления его антимикробных свойств (мутанты по гену *phlA* утрачивают антимикробную активность). Белок PhlF, проявляющий наибольшее сходство с таковым бактерий *Pseudomonas brassicacearum*, является негативным регулятором синтеза 2,4-ДАФГ, поскольку инактивация детерминанты, определяющей его синтез, приводит к увеличению синтеза 2,4-ДАФГ в 2,3 раза.

Список литературы

1. O'Sullivan, D.J. Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant pathogens / D.J. O'Sullivan and F. O'Gara // - Microbiological Reviews.-1992.-V.56.P. 662–672.
2. Bangera, M.G. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 / Bangera M.G., Thomashow L.S. // Journal of Bacteriology -1999.-V.181. -P.3155–3163.
3. Bangera MG, Thomashow LS. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 // J Bacteriol. – 1999.-V. 181, №10, P. 3155-63.
4. Мандрик-Литвинкович М.Н. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата Экогрин для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники / Мандрик-Литвинкович М.Н., Купцов В.Н., Сверчкова Н.В., Евсегнеева Н.В., Мишин Л.Т., Войтка Д.В., Рапопорт А.И., Хрусталева Г.М. // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; под ред. Э.И. Коломиец, А.Г. Лобанка. – Минск, 2012. – Т. 4. – С. 98-107.

БИОКОНТРОЛЬ ФУЗАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ РИЗОСФЕРНЫХ И ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ

Марданова А.М., Лутфуллин М.Т., Хадиева Г.Ф., Мочалова Н.К.,
Шарипова М.Р.

Институт фундаментальной медицины и биологии КФ(П)У, Казань, Россия,
e-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Многие виды широко распространенных в почве микромицетов рода *Fusarium* являются возбудителями болезней растений. Фузариозы, проявляющиеся в виде фузариозного увядания растений и сухой гнили клубней, вызывают серьезные потери урожая [1]. Эффективной альтернативой применению пестицидов является использование биопрепаратов для контроля фитопатогенов [2, 3].

Целью данного исследования было выделение, идентификация возбудителей фузариозов картофеля и поиск бактерий-антагонистов, подавляющих рост микромицетов.

Микромицеты выделяли из клубней картофеля с признаками сухой гнили на среде Чапека. Полученные идентифицировали по гомологии нуклеотидных последовательностей ITS-области генов 5.8S рДНК с использованием алгоритма BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Бактерии-антагонисты выделяли из ризосферы и листьев картофеля. Отбирали колонии бактерий, проявляющих антагонистическую активность. Чистые культуры бактерий идентифицировали методом масс-спектропии на MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Антагонистическую активность исследовали методом агаровых блоков.

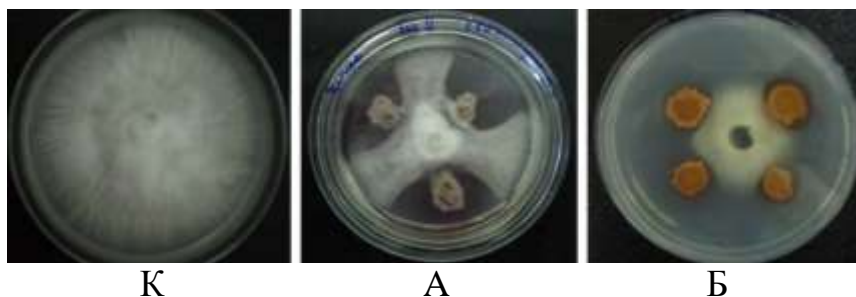
Из клубней картофеля, пораженных сухой гнилью, выделено 6 изолятов микромицетов, которые по результатам микробиологического анализа отнесены к роду *Fusarium*. Молекулярно-генетический метод идентификации позволил установить видовую принадлежность выделенных изолятов микромицетов: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* и *F. tricinctum*, *F. sambacinum* и *F. redolens* (таблица).

Таблица – Идентификация изолятов микромицетов по гомологии последовательности ITS-области генов 5.8S рДНК

№	Штамм	Перекрытие	Идентичность
1	<i>Fusarium</i> sp.1	78%	99% <i>Fusarium solani</i> isolate TVD_Fungal-Culture126
2	<i>Fusarium</i> sp.2	80%	100% <i>Fusarium oxysporum</i> strain CEF-06
3	<i>Fusarium</i> sp.3	80%	99% <i>Fusarium avenaceum</i> strain 1
4	<i>Fusarium</i> sp.4	82%	100% <i>Fusarium tricinctum</i> strain Z5
5	<i>Fusarium</i> sp.5	80%	99% <i>Fusarium sambacinum</i> , strain Fsa0555-B
6	<i>Fusarium</i> sp.6	79%	99% <i>Fusarium redolens</i> strain M11

Чистые культуры микромицетов были использованы для инфицирования клубней картофеля. Установили, что все изоляты микромицетов вызывали сухую гниль картофеля в течение 7 суток. Штаммы *F. sambacinum*, *F. oxysporum* и *F. redolens* проявляли самые высокие вирулентные свойства. Выделенные микромицеты использовали в качестве тест-культур для характеристики антагонистической активности ризосферных и эпифитных бактерий.

Из ризосферы и листьев картофеля выделили более 30 штаммов бактерий, проявляющих антагонистическую активность. Наиболее активные штаммы были идентифицированы как представители рода *Bacillus*: *B. subtilis* штаммы 1-3, *B. weihenstephanensis* и *B. pumilis*. Штаммы *B. subtilis* № 2 и 3 проявили наибольшую способность к ингибированию роста колоний микромицетов, в том числе против возбудителей сухой гнили картофеля (рисунок). Штаммы были способны расти на среде Чапека, активно выделяли коричневый пигмент, окрашивающий среду, и подавляли рост колоний микромицетов в течение всего времени наблюдения (более 3 недель).



К А Б
Время культивирования – 7 суток. К - рост микромицета на среде Чапека
Рисунок – Ингибирование роста микромицета *F. oxysporum* штаммами *B. subtilis* 2 (А) и 3 (Б)

Таким образом, выделены штаммы бактерий, ингибирующих рост и развитие различных фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*. Эти штаммы бактерий можно рассматривать как потенциальные биопрепараты для подавления роста фитопатогенов – возбудителей сухой гнили картофеля.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).

Список литературы

1. Du M., Ren X., Sun Q., Wang Yi, Zhang R. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen // *Potato Research*. – 2012. – V. 55. – P. 175-184.
2. Petatán-Sagahón I., Anducho-Reyes M. A., Silva-Rojas H. V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cárdenas-Álvarez I. O., Mercado-Flores Y. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – V. 12, №9. – P. 5522–5537.
3. Xu S.J., Hong S.J., Choi W., Kim B.S. Antifungal activity of *Paenibacillus kribbensis* strain T-9 isolated from soils against several plant pathogenic fungi // *Plant Pathol. J.* – 2014. – V. 30, №1. – P. 102–108.

NEW ENZYME PREPARATION FOR ANIMAL FEED PRODUCTION BASED ON *PENICILLIUM* RECOMBINANT STRAINS

Merzlov D.A.^{1,2}, Bushina E.V.², Shashkov I.A.², Rozhkova A.M.², Sinitzyn A.P.^{1,2}

¹*Chemistry faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation, e-mail: apsinitsyn@gmail.com*

²*A.N. Bach Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation, e-mail: dmitriymerzlov@gmail.com, amrojko@yaho.com*

Grains (barley, rye etc.) are widely used for animal feed production. However, these sources of nutrients contain nonstarch polysaccharides (NSP) which negatively effect on feed digestibility. The main barley and rye NSP are β -glucan and arabinoxylan and content of these NSP in grain reaches up to 7 and 12%, respectively [1, 2].

β -glucanases and xylanases are glycoside hydrolases (EC 3.2.1), which catalyze hydrolysis of endo- β -glycosyl bounds in polysaccharides. The application of β -glucanases and xylanases enzymatic preparations with NSP specificity in animal feed production allows to reduce antinutritive effects of NSP and increase nutrient assimilability for monogastric animals (poultry) [3]. Nevertheless, properties of glycoside hydrolases must fit requirements arising from both modern technology animal feed production and features of raw materials: used enzymes should have improved thermal stability and should not be inhibited by cereal proteinaceous inhibitors [3-4].

In this work the *eglIII* and *xylE* genes encoding of endoglucanase EG2 (36.2 kDa) *Penicillium verruculosum* and xylanase XylE (39.7 kDa) *Penicillium canescens* were cloned to *P. canescens* host. As a result, five perspective transformants were obtained and all of them were enriched with target enzymes. Also the presence of target enzymes in culture fluid was confirmed by MALDI mass-spectrometry.

Thus, the new enzymatic preparations for animal feed production based on *P. canescens* recombinant strains were obtained. It was shown that new enzymatic preparations were not inhibited by grain proteinaceous inhibitors. Also they had improved thermal stability and possessed high reactivity to NSP of cereals.

References

1. Bacic A., Fincher G., and Stone B. Chemistry, Biochemistry and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides.-N.Y.: Academic Press, 2009.
2. Collins H.M., et al. Variability in Fine Structures of Noncellulosic Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains: Potential Importance in Human Health and Nutrition // Cereal Chemistry.-2010.-Vol. 87, № 4.-P.272-282.
3. Bedford M., Partridge G. Enzymes in farm animal nutrition. 2th ed.-UK: CABI, 2010.
4. Gusakov A.V. Proteinaceous Inhibitors of Microbial Xylanases // Biochemistry (Moscow).-2010.-Vol. 75, № 10.-P.1331-1347.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ВРЕДНОСТИ ЭКОНОМИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ НА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЕ

**Надыкта В.Д., Асатулова А.М., Томашевич Н.С., Павлова М.Д.,
Жевнова Н.А., Хомяк А.И., Дубяга В.М., Козицын А.Е.,
Сидорова Т.М., Карасев С.Г.**

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия, e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru

В настоящее время фунгициды, как и другие пестициды, являются наиболее востребованным средством защиты растений. При этом высокая стойкость пестицидов, неспецифичность их действия и накопление в окружающей среде токсических остатков неизбежно приводит к глубоким изменениям в экосистемах.

Сотрудниками ФГБНУ ВНИИБЗР созданы оригинальные опытные образцы биопрепаратов полифункционального типа действия на основе аборигенных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* (BZR 336 g *B. subtilis*, BZR 517 *B. subtilis* (заявки на патенты РФ № 2013151375, 2013151377 от 20.11.2013 г.)) для защиты озимой пшеницы от возбудителей фузариоза и других болезней, адаптированные к условиям южного региона – основного производителя зерновых культур РФ.

Проведенный патентный поиск показал, что разрабатываемые биопрепараты являются охраноспособными применительно к РФ, а полученные экспериментальные данные свидетельствуют о конкурентоспособности опытных образцов биопрепаратов в сравнении с аналогичными российскими и зарубежными препаратами (Раксил, Кинто Дуо, Фитоспорин-М).

Опытные образцы новых биопрепаратов соответствуют следующим характеристикам:

– широкий спектр антифунгального действия против фузариозной корневой гнили и фузариоза колоса 23-71 % и 16-73 %, снежной плесени – 14-52 %, желтой пятнистости листьев – 38-94 %;

– высокая ростстимулирующая активность: увеличение массы побега и корня на 13 и 45 % и длины побега и корня – на 7 и 22 % соответственно;

– титр опытных образцов новых биопрепаратов в препаративной форме жидкая культура не менее $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл;

– совместимость с химическими пестицидами с целью применения в интегрированной системе защиты озимой пшеницы для снижения пестицидного пресса на агроценозы;

- биологическая эффективность против корневых гнилей 45-68 % (на фоне поражения 42 %); против бурой ржавчины – 18 % (на фоне поражения 20 %); против желтой пятнистости листьев 26-49 % (на фоне поражения 5 %);
- хозяйственная эффективность (дополнительный урожай) – 25-48%;
- отсутствие патогенности к теплокровным животным.

При этом рост производства зерна озимой пшеницы сопровождается дополнительными затратами, которые складываются в том числе и из затрат на мероприятия, связанные с защитой культуры от вредителей и болезней и уборку дополнительного урожая.

Максимальный дополнительный урожай в центральной зоне Краснодарского края в 2012-2013 гг. получен в варианте с обработкой семян биопрепаратом на основе штамма *B. subtilis* BZR 336g – 16,2 ц/га, а также с биопрепаратом на основе штамма *B. subtilis* BZR 517 – 8,4 ц/га. При ориентировочной стоимости одного литра биопрепарата 200 руб. чистый доход в расчете на 1 га посева в варианте с использованием опытного образца g *B. subtilis* BZR 336 составил 17511 руб., что превысило доходность в контроле в 1,8 раза, производственную рентабельность на 27% (стоимость товарных семян для оценки прибавки урожая принята за 750 руб./ц).

Применение новых биопрепаратов в технологиях производства озимой пшеницы обеспечивает получение экологически безопасного дополнительного урожая (25-48 %) и является экономически оправданным (рентабельность 63 и 88 %).

Введение в систему интегрированной защиты озимой пшеницы новых биопрепаратов будет способствовать увеличению урожая и повышению качества зерна, возможности отказа от использования ряда дорогостоящих пестицидов; повышению плодородия почв, оздоровлению почвенной микробиоты; возможности переориентации хозяйств на производство экологически безопасной продукции. Разработка и внедрение новых биопрепаратов будет способствовать значительному снижению хемотропной нагрузки и оздоровлению экологической обстановки в АПК России.

АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ, ОБРАБОТАННОЙ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД

Нарушко М.В., Субботин А.М., Петров С.А., Мальчевский В.А.

Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, Россия,

e-mail: narushkov@mail.ru

Одним из основных направлений повышения урожайности зерновых культур является использование минеральных удобрений и химических средств защиты растений. Их использование оказывает негативное влияние на окружающую среду и макроорганизмы. В последние годы новым направлением решения сложившейся проблемы является разработка экологически чистых технологий для повышения урожайности, основанных на применении микроорганизмов [1].

В настоящее время существует широкий спектр бактериальных препаратов, направленных на получение более высокого урожая, повышение устойчивости растений к патогенной микрофлоре, а так же их защиты от насекомых-вредителей.

Создание фитостимуляторов на основе бактерий, выделенных из многолетнемерзлых пород (ММП), является перспективным, так как они обладают высоким уровнем адаптационного потенциала, что позволяет им существовать в неблагоприятных условиях окружающей среды [2]. В связи с вышеизложенным мы пришли к предположению, что микроорганизмы из ММП могут положительно влиять на урожайность. Таким образом, актуальность исследования оценки влияния бактерий на морфометрические показатели не подлежит сомнению.

Цель работы: оценка воздействия штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из ММП на морфометрические показатели пшеницы мягкой сорта Иргина.

Было проведено биотестирование, по результатам которого отобраны 14 штаммов микроорганизмов, относящихся к роду *Bacillus*.

Полученные штаммы культивировали при температуре 26°C на питательный ГРМ-агар (Оболенск) Через 2 суток культивирования микроорганизмы смывали с поверхности питательной среды стерильной дистиллированной водой. Плотность культур в смывах доводили до 1×10^7 м.к./мл. Полученными взвешями бактериальных штаммов обрабатывали зерновки пшеницы мягкой, путём замачивания их в течение 2 часов. Зерновки пшеницы высевали в прокалённый песок. Семена были разделены на 2 экспериментальные группы: группа А проращивалась при температуре воздуха 22°C; группа В - при 4°C. В эксперименте использовалось по 100 семян для каждого штамма. Через 7 дней оценивалась всхожесть, на 20 сутки морфометрические параметры: длина побега,

длина coleoptilya, длина первого листа, максимальная длина корней, масса побега, масса корней, количество корней.

У проростков пшеницы, выращенных при 22°C (группа А), в ряде вариантов наблюдалось достоверное повышение всхожести и морфометрических показателей относительно контроля. Превышение контрольных значений морфометрических показателей наблюдалось при предпосевной обработке зерновок 8 штаммами бактерий рода *Bacillus*, 5 (60%) из которых оказали положительное влияние на большинство изучаемых параметров и проявляли фитостимулирующий эффект.

В группе В всходы наблюдались в контроле и в 5 вариантах эксперимента. В других вариантах всходов не появилось. По-видимому, проращивание семян, обработанных бактериями из ММП, при 4°C вызывает угнетение всхожести. Однако среди взошедших семян только в 2 вариантах наблюдалось достоверное повышение лабораторной всхожести по отношению к контролю. По результатам анализа морфометрических показателей проростков было установлено, что такие показатели как длина coleoptilya, длина побега, масса побега, длина, масса и количество корней достоверно превышали контрольные значения в большинстве вариантов. На основании вышеизложенного можно предположить, что данные штаммы повышают устойчивость растений к низким температурам.

Таким образом, в эксперименте было доказано положительное влияние бактерий рода *Bacillus*, выделенных из многолетнемерзлых пород на морфометрические показатели яровой мягкой пшеницы сорта Иргина. У 60% исследованных штаммов наблюдался фитостимулирующий эффект. По результатам эксперимента отобрано 5 наиболее перспективных штаммов бактерий, из которых два продемонстрировали положительное влияние как при 22°C, так и при 4°C. Предполагается провести всестороннее изучение этих штаммов бактерий для создания на их основе фитостимулирующих препаратов, повышающих адаптивные способности растений к стрессовым факторам и их продуктивность.

Список литературы

1. Ляличкин О.А. Влияние биопрепаратов и удобрений на урожайность и качество зерна ячменя // Достижения науки и техники АПК. - 2011. - №8. - С. 29-31.
2. Брушков А.В. Подземные хранилища в вечной мерзлоте: современное состояние // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2008. Т.12., №4. - С. 534-540.

ВЛИЯНИЕ ГАЛОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛЯДВЕНЕЦ (*LOTUS CORNICULATUS*) В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

Наумович Н.И., Антохина С.П., Алещенкова З.М.

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: naumovichnadezda@yandex.ru*

Проблема засоления почв носит глобальный характер, особенно остро в Беларуси она стоит в промышленном Солигорском районе. При переработке сильвинитовых руд на предприятиях ОАО «Беларуськалий» около 75 % их объема переходит в отходы. Складирование значительных объемов отходов вызывает негативные изменения всех компонентов природной среды [1].

В последние годы для защиты растений от солевого стресса активно используют микробиологические методы. С этой целью начали применять галофильные микроорганизмы, которые способны оказывать позитивный эффект на растения в условиях засоления [2].

Положительное воздействие ассоциативных галофильных бактерий затрагивает именно те процессы метаболизма растений и их взаимодействия с окружающей средой, которые нарушаются при стрессе. Можно предположить, что бактериальное воздействие потенциально ориентировано против негативных воздействий окружающей среды и может быть особенно важным для растений именно в неблагоприятных условиях [2].

Целью работы являлось изучение влияния галофильных микроорганизмов на всхожесть семян и развитие лядвенца (*Lotus corniculatus*) в условиях засоления.

При проведении лабораторных исследований в серии модельных экспериментов изучили ростостимулирующее действие галофильных фосфатсолубилизирующих и клубеньковых бактерий на всхожесть семян, рост и развитие проростков лядвенца в условиях засоления (концентрация хлорида натрия 150 мМ) (рисунок).

Из полученных данных видно, что *Bacillus* sp. 5С наиболее активно стимулирует всхожесть семян лядвенца на 23%, а длину проростков на 24% по сравнению с контролем в условиях засоления. Обработка семян лядвенца (*Lotus corniculatus*) штаммом *Rhizobium loti* Л2 в условиях засоления позволяет стимулировать увеличение всхожести и длину проростков на 7% по сравнению с контролем. Другие штаммы микроорганизмов *Bacillus* sp. 4Ф и *R. loti* 12 не оказали положительного эффекта на растения.

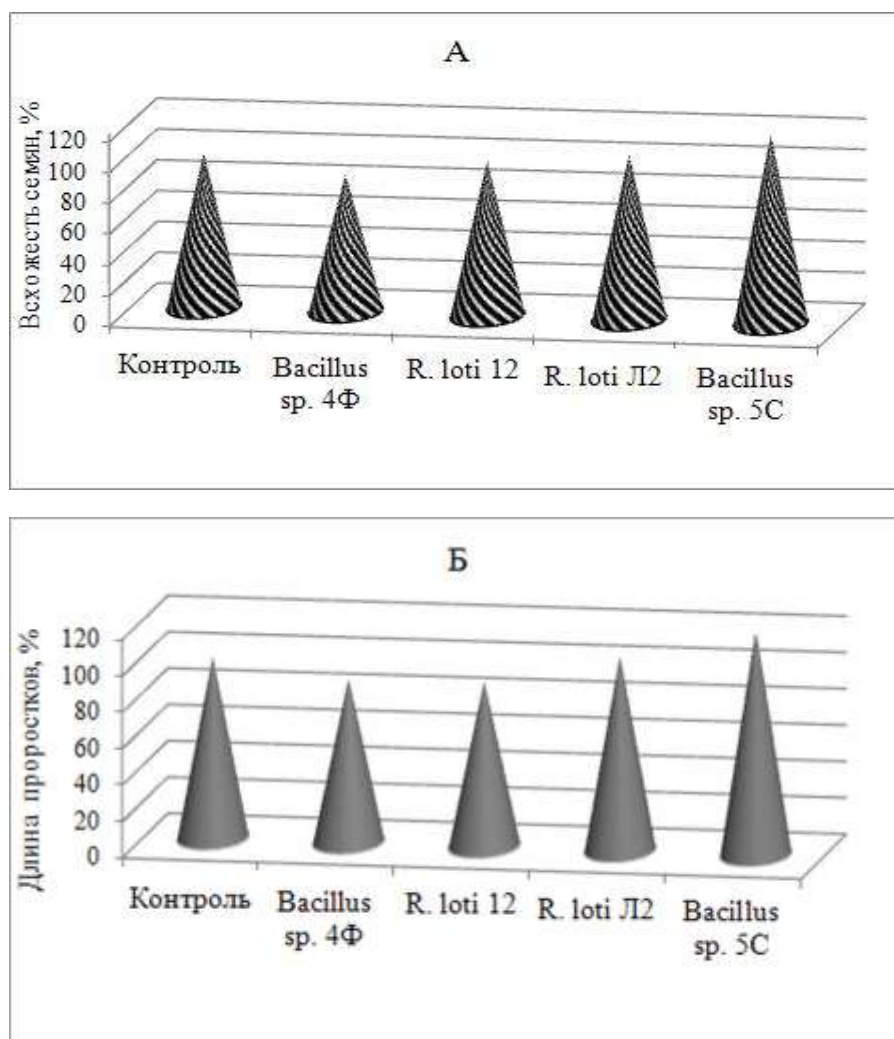


Рисунок – Влияние галофильных бактерий на всхожесть семян (А) и длину проростков (Б) лядвенца (*Lotus corniculatus*)

Выделенные штаммы азотфиксирующих и галофильных бактерий представляют интерес для создания микробно-растительной ассоциации и использования её в биотехнологии фиторемедиации засоленной почвы.

Список литературы

1. В Солигорске растут горы экологических проблем / Здоровье [Электронный доступ]. – 2014. – Режим доступа: http://www.health.ej.by/ecology/2013/09/19/v_soligorske_rastut_gory_ekologicheskikh_problem.html. – Дата доступа: 07.04.2015.
2. Защитное действие бактерий рода *Klebsiella* на газонные травы в условиях засоления почвы / В.Т. Емцев [и др.] // Почвоведение. – 2010. – №7. – С. 825-830.

НОВЫЙ ВЫСОКОАКТИВНЫЙ ЦЕЛЛЮЛАЗНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ДОБАВКИ К СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМ КОРМАМ

Немашкалов В.А.¹, Кошелев А.В.¹, Бубнова Т.В.¹, Беккаревич А.О.¹,
Матыс В.Ю.¹, Окунев О.Н.¹, Рожкова А.М.², Сеницын А.П.²

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пущино, Россия, e-mail: Voronin@ibpm.pushchino.ru

²Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия, e-mail: inbi@inbi.ras.ru

Одним из важнейших факторов рентабельности процессов биоконверсии лигноцеллюлозных материалов, наряду со стоимостью самого сырья, является эффективность гидролитического действия целлюлазных комплексов, которая, в свою очередь, определяется как свойствами индивидуальных ферментов, так и их взаимодействием в составе этого комплекса. С целью снижения затрат на получение конечного продукта (целлюлазного ферментного препарата) в лаборатории биосинтеза ферментов ИБФМ РАН вот уже более 15 лет активно ведется работа по созданию новых штаммов – суперпродуцентов внеклеточных карбогидраз, а также оптимизации состава ферментационных сред и условий их культивирования.

В настоящее время, наряду с грибами *Trichoderma* и *Aspergillus*, грибы рода *Penicillium* по праву занимают одно из главных мест в списке промышленно важных продуцентов [1], поскольку способны синтезировать ферментные комплексы целлюлаз и гемицеллюлаз (эндоглюканаза, целлобиогидролаза, ксиланаза и β -глюкозидазы) более сбалансированного состава и эффективнее расщеплять целлюлозные субстраты [2, 3], кроме того, индивидуальные ферменты комплекса *Penicillium* обладают более высокой удельной активностью и операционной стабильностью [4]. Поэтому создание с помощью методов генной инженерии новых высокопродуктивных штаммов, способных секретировать ферментные комплексы с заданными свойствами, а также получение ферментных препаратов на их основе, является весьма актуальной задачей.

Целью работы было создание нового высокоактивного ферментного препарата, обогащенного гомологичной эндоглюканазой II (Cel5A), на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum* В-221-61 для использования его в процессах биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

В рамках данного исследования были клонированы и экспрессированы различные гены целлюлаз, наиболее успешными из которых оказались в отношении эндо- β -1,4-глюканазы II *P. verruculosum* (Cel5A) – одного из ключевых компонентов мультиферментного комплекса, продуцируемого этим грибом. В результате уровень синтеза эндоглюканазы II увеличился в 3 раза по сравнению

с исходным штаммом. Подобраны условия и состав питательной среды для культивирования нового продуцента в 1,5-литровых ферментерах. Получен сухой ферментный препарат и исследована его гидролитическая (осахаривающая) способность по отношению к измельченным осине и сосне в сравнении с коммерческими целлюлазными препаратами. Показано, что новый ферментный препарат по осахаривающей способности существенно превосходит как коммерческие аналоги (на 20-35%), так и препарат, полученный на основе исходного штамма (на 15%).

Список литературы

1. Синицын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М. и др. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum* // Биотехнология. - 2013.- №5 - с. 40-53.
2. Morozova VV, Gusakov AV, Andrianov RM, Pravilnikov AG, Osipov DO, Sinitsyn AP. Cellulases of *Penicillium verruculosum* // Biotechnol J. - 2010. - 5 (8). - p. 871-80.
3. оловьева И.В., Окунев О.Н., Вельков В.В. и соавт. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз // Микробиол. – 2005. - Т. 74. - №2 - с. 172-178.
4. Скомаровский А.А. Компонентный состав и гидролитическая способность ферментного комплекса *Penicillium verruculosum*: диссертация на соискание ученой степени канд. хим. наук. / А.А. Скомаровский; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. - Москва, 2006. - 170 с.

ДНК-ИНСЕКТИЦИДЫ – НОВЫЙ ПОДХОД К РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ ЛИСТОГРЫЗУЩИХ НАСЕКОМЫХ

Оберемок В.В.¹, Гниненко Ю.И.²

¹*Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского,
Симферополь, Россия, e-mail: genercr@mail.ru*

²*Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации
лесного хозяйства, Пушкино, Россия, e-mail: gninenko-yuri@mail.ru*

Совершенно новые подходы разрабатываются в настоящее время для контроля численности листогрызущих насекомых. Одним из них является создание инсектицидов на основе нуклеиновых кислот, в частности инсектициды на основе коротких одноцепочечных фрагментов ДНК антиапоптотических (IAP) генов вирусов ядерного полиэдроза, гомологичных антиапоптозным генам хозяина [1], а также препараты на основе длинных двухцепочечных фрагментов РНК [2]. Идея разработки и применения таких препаратов основывается на методах блокировки экспрессии генов важных для жизни насекомых-вредителей, используя механизмы РНК-интерференции, ДНК-интерференции, а также применение антисмысловых технологий. Первые практические результаты в этом направлении отображают высокий потенциал инсектицидных препаратов на основе нуклеиновых кислот. В частности было показано [1], что ДНК-инсектициды на основе антиапоптозного гена IAP-3 вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда могут быть использованы для создания безопасных, относительно доступных и быстрых в действии ДНК-инсектицидов для контроля численности популяций непарного шелкопряда.

Однако ДНК-инсектициды не всегда оказывают инсектицидное действие на незаражённых бакуловирусом гусениц непарного шелкопряда, но всегда в наших экспериментах действуют на заражённых бакуловирусом насекомых. Это привело к мысли, что бакуловирусы активизируют систему апоптоза-антиапоптоза в клетках хозяина и увеличивают концентрацию целевых молекул мРНК антиапоптозных генов бакуловирусов. В такой ситуации применение антисмыслового фрагмента бакуловирусного антиапоптозного гена, по-видимому, приводит к инактивации экспрессии определённого антиапоптозного гена бакуловируса через комплементарное взаимодействие с целевой мРНК и заражённой клетке при этом легче пойти по пути апоптоза. Если много клеток претерпевают апоптоз, то погибает и всё насекомое. Эта гипотеза подтверждается тем фактом, что фрагменты IAP-3 гена бакуловируса непарного шелкопряда влияют на снижение биомассы насекомого и увеличивают экспрессию его проапоптотических генов (Оберемок В., Лайкова Е., Зайцев А., Скороход А., Гушин В., неопубликованные данные). Полученные результаты показывают возможность совместного применения бакуловирусных препаратов и антисмысловых фраг-

ментов антиапоптозных генов бакуловирусов в практике сельского и лесного хозяйства с целью повышения эффективности первых. Немаловажно и то, что сегодня технологии синтеза одноцепочечных фрагментов ДНК становятся всё дешевле, что позволит в будущем сделать доступность ДНК-инсектицидов сравнимой с доступностью химических инсектицидов.

Оценивая безопасность ДНК-инсектицидов, мы обнаружили, что короткие одноцепочечные фрагменты гена IAP-3 вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда являются безопасными для нецелевых насекомых, таких как каролинский бражник, совка-ипсилон, плодовая мушка и амбарный долгоносик [1,3]. Кроме этого, исследуя уровень глюкозы, активность щелочной фосфатазы и накопление биомассы проростков пшеницы [4] и яблони (неопубликованные данные) после обработки их ДНК-инсектицидами на основе одноцепочечных фрагментов гена IAP-3 вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, мы показали их безопасность для растений.

Стоит отметить, что идея ДНК-инсектицидов уникальна и имеет свои особенности, такие как наружное применение, небольшие размеры олигонуклеотидов, применение одноцепочечных молекул ДНК и концепция использования вирусных антиапоптозных генов, что отличает их от других известных постгеномных подходов в защите растений, разрабатываемых в настоящее время.

Список литературы

1. Oberemok V.V., Skorokhod O.A. Single-stranded DNA fragments of insect-specific nuclear polyhedrosis virus act as selective DNA insecticides for gypsy moth control // Pest. Biochem. Physiol. – 2014. – V.113. – P. 1–7.
2. Gu L., Knipple D.C. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies // Crop Protec. – 2013. – V. 45. – P. 36–40.
3. Oberemok V.V., Nyadar P.M., Zaytsev O.S., Levchenko N.N., Shiyntum H.N., Omelchenko O.V. Pioneer evaluation of the possible side effects of the DNA insecticides on wheat (*Triticum aestivum* L.) // Intern. J. Biochem. and Biophysics. – 2013. – V. 1. – P. 57–63.
4. Oberemok V.V., Laikova K.V., Zaitsev A.S., Nyadar P.M., Shumskykh M.N., Gninenko Yu.I. DNA insecticides based on iap3 gene fragments of cabbage looper and gypsy moth nuclear polyhedrosis viruses show selectivity for non-target insects. Archives Biol. Sci. – 2015. – V. 67. – DOI:10.2298/ABS141230037O.

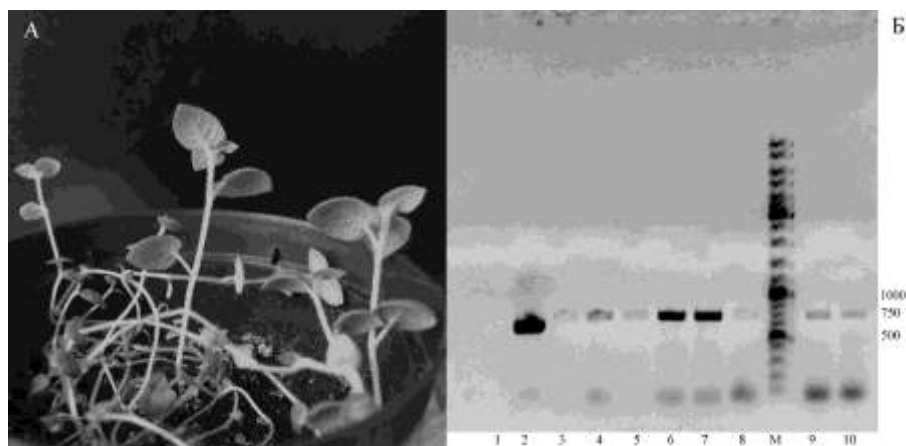
ВРЕДНОСНОСТЬ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ И ПУТИ ЕЕ СНИЖЕНИЯ В АГРОЦЕНОЗАХ ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР

Пасалари Х.М., Евтушенко А.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
e-mail: hpasalary@yahoo.com

Сорняки отнимают у растений пространство, питательные вещества, воду и свет. Засорённость полей приводит к значительным потерям урожая. Сорняки ухудшают качества сельскохозяйственной продукции, загрязняя урожаи и снижая ценность кормов для скота [1]. Примерно на 20-25% потенциальный мировой урожай продовольственных культур снижен из-за вредителей и сорняков. Так что роль защиты растений трудно переоценить. Был предложен ряд методов защиты растений: агротехнический, биологический, химический, механический (новые методы орошения и вспашки), биофизический, а также интегрированные методы. Практически все эти методы являются профилактическими, так как они дают наилучший результат [2-5].

Использование трансгенных технологий позволяет ускорить процессы селекции новых сортов различных видов растений, устойчивых к сорнякам, вредителям и болезням и с высокой продуктивностью [3]. В работе Хоссейна и Евтушенкова методом агробактериальной трансформации уже получен трансгенные растения картофеля (см. рисунок), устойчивые к гербициду глифосату, что позволит более эффективно защищать их от сорняков [6].



Дорожки 1 и 2 (положительный контроль, отрицательный контроль и плазмидная ДНК PZH 501), 3 – 7 – образцы ДНК, 8, 9, 10 - образцы кДНК, М – маркерная ДНК (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas).

Рисунок – Трансформированные растения картофеля, выросшие на среде с канамицином (А); электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к гену *aroA*, полученных с ДНК и кДНК выделенных из трансформированного картофеля (Б)

Кроме трансгенных технологий в качестве пути снижения вредоносности сорных растений, используются различные химические средства. Например,

против сорной растительности используются гербициды, против сорной древесной растительности – арборициды. Также применяется механическая защита с использованием новых методов орошения и вспашки с целью ограничения вредоносности сорных растений. В настоящее время агрономы пытаются заменить использование гербицидов на нехимические методы борьбы с сорняками [4].

Список литературы

1. Кузнецов Н. И. Опыт изучения сообществ сорной растительности // Труды Владимирского общества любителей естествознания. – Владимир- 1904. - В. 2. - Т. 1. - С. 1-9.
2. Ghanbari. M, Zaboli. G. R, and Mir. B. 2013. Comparing Irrigation Methods and Weed Control on Yield of Garlic (*Allium sativum*L.) Cultivars // World of Sciences Journal. 2013[03]. pp 70-78.
3. Grover, A. Rapid method for isolation of PCR amplifiable genomic DNA of *Ralstonia solanacearum* infested in potato tubers / A. Grover, A. Swarup, K. Chakrabarti, M. Wamik Azmis, P. Khurana // Advances in Microbiology.– 2012. – № 2. – P. 441–446.
4. Grichar, w.J , D.C.Sestak, K.D.Brewer and B.A.Besler, 2001. Sesam(*Seamum indicum* L.) tolerance and weed control with soil- applied herbicides // Crop Protection 20:389-394.
5. Сорные растения: справочное и учебно-методическое пособие // М.: Печатный Город, 2010. – 272 с.
6. Пасалари Х., Евтушенков А.Н. получение трансгенного картофеля с геном *aroA* // Международная научно-практическая конференция “Современное состояние и перспективы инновационного развития овощеводства”- 2014.- с. 186-190.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БИОЦЕНОЗАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Прищепа Л.И.

Институт мясо-молочной промышленности НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: prischepa-2625@yandex.ru

Основными продуцентами бактериальных препаратов в настоящее время являются энтомопатогенные бактерии вида *Bacillus thuringiensis*, которые способны синтезировать во время вегетативного роста ряд биологически активных веществ, обуславливающих вирулентность бацилл по отношению к широкому кругу насекомых-вредителей. Начиная с 1962 года, когда бактерия *Bacillus thuringiensis Berliner* вошла в мировую номенклатуру как самостоятельный вид, поиск новых разновидностей штаммов кристаллоносных бацилл продолжается в различных климатических зонах мира и благодаря их широкому распространению в природе спектр насекомых-мишеней постоянно расширяется [1]. Выделение из природных источников активных штаммов энтомопатогенов, регуляторов численности фитофагов, остается актуальной проблемой не только с позиции совершенствования микробиологической защиты, но и с точки зрения выявления их естественного разнообразия, далеко не полно изученного к настоящему времени, в том числе и в Республике Беларусь.

Работа по формированию коллекции штаммов кристаллоносных бацилл в Белорусском Институте защиты растений проводилась в 1979-2008 гг. Впервые изолят кристаллоносной бактерии выделили из погибших ложногусениц зернового листового пилильщика *Dolerus haemotodes* Schr., собранных на посевах ячменя в период эпизоотии (Ляховичский район, Гродненская область), который был идентифицирован французскими учеными Де Баржак и Бонфуа (в Институте Пастера, Париж) как *Bacillus thuringiensis. dendrolimus* H_{4a4b}. Впоследствии на штамм-продуцент получен патент [2] и создан первый отечественный инсектицидный биопрепарат Дендролин (ТУ РБ 035035144.002-95).

Благодаря высоким адаптивным возможностям энтомопатогенные бациллы широко распространены в экосистемах. Исследования ученых разных стран показали, что основным источником их скрининга являются погибшие насекомые природных популяций. Значение насекомого как специфической среды существования бацилл проявляется в способности бацилл циркулировать в среде обитания насекомых в естественных экосистемах. Поисковые работы по выделению новых разновидностей энтомопатогенных бацилл в биоценозах республики, изучение инсектицидных свойств и формирование коллекции проводилось на протяжении 29 лет на территориях, где не использовались биологические препараты, чтобы избежать получения известных штаммов.

Основная часть коллекции базируется на основе изолятов, полученных из погибших насекомых, собранных в Национальном парке «Беловежская Пуща». Богатство флоры и фауны, разнообразие экосистем определяют ценность пуши как объекта исследований в области изучения биологии, экологии, биологического разнообразия. В сборе патологического материала для выделения энтомопатогенов принимала участие Н.В. Евсегнеева [3], за что автор выражает ей благодарность. Исследования проведены в 29 кварталах пуши с разным типом растительности, изучены места локализации погибших насекомых и показано их присутствие в подстилке, травостое, поверхностном слое почвы, под корой на стеблях деревьев. Всего в пуше собрано 147 экземпляров погибших насекомых и выделено 22 изолята.

Многолетние исследования природных популяций зимней пяденицы (*Operophtera brumata* L.), пяденицы обдирало (*Eranis defoliaria* Cl.), яблонной плодожорки (*Laspeyresia pomonella* L.), капустной совки (*Mamestra brassicae* L.), жука-носорога (*Oristes nasicornis* L.), уховертки обыкновенной (*Forticula auricularia* L.), шелкоунов (*Agriotes* sp.), плодового долгоносика (*Phyllobius oblongus* L.), яблонного цветоеда (*Antonomus pomorum* L.), волнянки античной (*Orgia antiqua* L.), жукелиц (*Carabidae* spp.) позволили выделить 5 новых изолятов.

Изоляты окрашивали по Граму, что служило диагностическим признаком при определении заражения насекомых кристаллоносными бактериями. Диагностика серовариантов (по Н-антигену и физиолого-биохимическим свойствам) проведена совместно с сотрудниками лаборатории патологии насекомых и грызунов ВНИИСХМ (Санкт-Петербург). В результате были идентифицированы 27 штаммов *Bacillus thuringiensis*, идентичных разновидностям серотипов Н₁, Н_{3а3в}, Н_{4а4в}, Н₁₀, которые имеют практическое значение при создании биологических препаратов. Всего в коллекции содержится 28 штаммов кристаллоносных бацилл.

Первичный отбор по признаку вирулентности штаммов проводили на гусеницах чешуекрылых вредителей, личинках жуков, ложногусеницах пилильщиков, так как реакция фитофагов на патогенное действие определенных разновидностей серотипов *Bacillus thuringiensis* специфична. Скрининг 11 коллекционных штаммов на широком круге тест-насекомых показал гетерогенность кристаллоносных бацилл по признаку вирулентности (таблица).

Таблица – Биологическая активность штаммов *Bacillus thuringiensis*, изолированных из погибших насекомых природных популяций.

	Штамм	Серо-	Серовариант	Гибель тест-насекомого, %
--	-------	-------	-------------	---------------------------

Источник выделения, систематическое положение насекомого		тип по Н-антигену		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Byturus tomentosus</i> F.	<i>Mamestra brassicae</i> L.	<i>Abraxas grossulariata</i> L.	<i>Dolerus haemotodes</i> Schr.	<i>Operophtera brumata</i> L.
Кистехвост <i>Orgia antiqua</i> L.	12-91	H ₁	<i>thuringiensis</i>	100,0	-	81,6	-	48,0	87,2
Жук-рогач (куколка) сем. <i>Lucanidae</i>	15-91	H _{4a4b}	<i>dendrolimus</i>	69,9	76,6	16,6	90,0	48,8	74,9
Жук-рогач (личинка) сем. <i>Lucanidae</i>	16-91	H _{3a3b}	<i>kurstaki</i>	81,6	100,	36,0	75,0	-	88,2
	13-91	H _{3a3b}	<i>kurstaki</i>	38,3	63,3	65,3	21,0	-	67,6
Жук-рогач (имаго) сем. <i>Lucanidae</i>	18-91	H _{4a4b}	<i>dendrolimus</i>	91,3	26,0	30,3	38,4	32,2	89,7
Жук-усач <i>Taxotus cursor</i> L.	24-91	H ₁₀	<i>darmstadiensis</i>	96,7	60,0	63,3	56,2	39,7	67,6
Жужелица сем. <i>Carabidae</i>	22-91		<i>darmstadiensis</i>	91,3	60,0	67,0	64,6	48,6	62,2
Капустная совка <i>Mamestra brassicae</i> L.	25-91	H _{4a4b}	<i>dendrolimus</i>	80,8	73,3	82,7	-	12,0	56,9
Щелкун <i>Agriotes sp.</i>	26-91	H _{4a4b}	<i>dendrolimus</i>	69,6	83,3	74,2	28,8	75,8	70,3
Зерновой илильщик <i>Dolerus haemotodes</i> Schr.	4-C8	H _{4a-4b}	<i>dendrolimus</i>	45,0	56,8	86,6	64,2	-	65,8
Зимняя пяденица <i>Operophtera brumata</i> L.	C19	H ₁	<i>thuringiensis</i>	80,9	84,0	68,8	-	81,4	74,9

Таким образом, результаты многолетних исследований по поиску, выделению, оценке вирулентности природных штаммов *B. thuringiensis* показали их широкое распространение в среде обитания насекомых различных биоценозов Республики Беларусь, и возможность использования коллекционных штаммов-продуцентов для создания биологических препаратов.

Список литературы

1. Кандыбин, Н.В. Микробиологический контроль численности насекомых и его доминанта *BACILLUS THURINGIENSIS* / Н.В. Кандыбин, Т.И. Патыка, В.П. Ермолова, В.Ф. Патыка // Санкт-Петербург, Пушкин. – 2009. – 244 с.
2. Король, И.Т., Прищепа Л.И. Штамм для изготовления энтомопатогенного бактериального препарата./ И.Т Король, Л.И Прищепа // Изобретение N1116566. – 1984.
3. Прищепа, Л.И. Распространение серотипов *Bacillus thuringiensis* в Республике Беларусь и перспективы их использования для защиты растений. / Л.И Прищепа, Н.В Евсегнеева. // Тезисы. докл. конф. «Защита растений в условиях реформирования агропромышленного комплекса: экономика, эффективность, экологичность» – 1995. – Санкт-Петербург – С.359-360.

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОПЕСТИЦИДА «БЕТАПРОТЕКТИН» В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Просвиряков В.В.¹, Свиридов А.В.¹, Купцов В.Н.²

¹УО «Гродненский государственный аграрный университет», Гродно, Беларусь,
e-mail: vlodi@tut.by

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: kuptsov@hotmail.com

Любая система защиты сельскохозяйственных культур должна экономически обосновываться. Каждый технологический прием заслуживает внимания лишь тогда, когда он экономически оправдан. Стоимость сохраненной продукции корнеплодов сахарной свёклы должна покрывать дополнительные затраты на проведение того или иного защитного мероприятия. В связи с этим целью нашей работы явилось определение экономической эффективности применения биопестицида «Бетапротектин», ж. против кагатной гнили сахарной свеклы в производственных условиях.

Производственные испытания эффективности действия препарата в сезоне хранения 2013-2014 гг. проводили на кагатах ОАО «Городейский сахарный комбинат». Для применения биопестицида на буртоукладочную машину был установлен аэрозольный генератор холодного тумана. Норма расхода биопестицида - 0,5 л/т корнеплодов. В результате было обработано 700 тонн свекломассы. Контролем служила сахарная свекла, прошедшая через БУМ, но не обработанная препаратом, закладываемая в это же время. Анализ образцов был проведен через 60 суток после закладки на хранение при разборке кагата. Биологическую и хозяйственную эффективность препарата рассчитывали по общепринятым в защите растений методикам [1]. Вредоносность заболевания рассчитывали по разработанной нами методике, утвержденной на Научно-техническом совете УО «ГГАУ» [2]. Общее содержание сахара в снятых с хранения корнеплодах мы подсчитывали по формуле предложенной Д. Шпаром [3]. Дополнительный сбор сахара, в результате проведенных защитных мероприятий рассчитан по следующей формуле:

$$ДС = ((СМд \times ОССо) + СМк \times (ОССо - ОССк)) \div 100,$$

где ДС – дополнительный сбор сахара, кг;
СМд – дополнительно сохраненная свекломасса, кг;
ОСС – общее содержание сахара, %;
индекс о – опыт; к – контроль

Расчет прибыли, дополнительного чистого дохода, окупаемости проводили по общепринятым в экономическом анализе формулам [4].

Расчеты экономической эффективности применения Биопестицида «Бетапротектин», ж. против кагатной гнили корнеплодов сахарной свеклы при хранении в ОАО «Городейский сахарный комбинат» представлены в таблице.

Таблица – Экономическая эффективность применения Биопестицида «Бетапротектин» против кагатной гнили корнеплодов сахарной свеклы при хранении в условиях ОАО «Городейский сахарный комбинат», 2014 г.

Показатели	Единица измерения	Обработка Биопестицидом «Бетапротектин», ж.	
		ожидаемый эффект	фактический эффект
Обработано корнеплодов	тонн	700	700
Хозяйственная эффективность	%	5,7	8,2
Всего сохранено свекломассы	тонн	527,8	575,1
Дополнительно сохранено свекломассы	тонн	38,2	47,3
Сахаристость	%	16,1	16,41
ОСС	%	13,7	14,01
Дополнительно полученный сахар	тонн	8,63	11,2
Стоимость 1 т сахара (за вычетом торговой надбавки 15,2%)	млн. руб.	7,8	7,8
Прибыль (стоимость дополнительно полученного сахара)	млн. руб.	67,3	87,1
Стоимость обработки препаратом	млн. руб.	13,4	13,4
Затраты на подвоз, подогрев, обработку био-препаратом, электроэнергия, ГСМ, зарплата и т.д.	млн. руб.	7,1	7,1
Всего дополнительных затрат.	млн. руб.	20,5	20,5
Чистый доход всего	млн. руб.	46,8	66,6
Чистый доход с 1 тонны	тыс. руб./т	66,9	95,14
Окупаемость проведения защитного мероприятия	раз	2,28	3,25

Примечание – расчет проведен в белорусских рублях в ценах 2014 г.

Установлено, что защита корнеплодов сахарной свеклы биопрепаратом является экономически целесообразным приемом. В условиях ОАО «Городейский сахарный комбинат» использование Биопестицида «Бетапротектин», ж. позволило получить чистый доход в размере 95,14 тыс. руб./т хранящихся корнеплодов, что окупило затраты связанные с защитой корнеплодов в 3,25 раз. Использование при хранении сахарной свеклы в производстве отечественного Биопестицида «Бетапротектин», ж. даст возможность получать экологически чистую

продукцию и снизить валютные затраты на приобретение импортных препаратов для защиты корнеплодов от гниения.

Список литературы

1. Поляков, И. Я. Прогноз развития вредителей и болезней сельскохозяйственных культур / И.Я. Поляков, М.П. Персов, В.А. Смирнов. - Л.: Колос, 1984. – 318 с.
2. Свиридов, А. В. Методические указания по оценке поражения корнеплодов сахарной свеклы кагатной гнилью при хранении: методические указания / А. В. Свиридов, В. В. Просвиряков. – Гродно, 2009. – 10 с.
3. Шпаар, Д. Сахарная свекла (Выращивание, уборка, хранение) / Д. Шпаар [и др.]; под общ. ред. Д. Шпаар. – Мн.: ЧУП «Орех», 2004. – 326 с.
4. Савицкая, Г. В. Методика комплексного анализа хозяйственной деятельности: учебное пособие / Г. В. Савицкая. – Москва: Инфра-М, 2007. – 383 с.

ТЕХНОЛОГИЯ МАЛОТОННАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА ВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ РЫЖЕГО СОСНОВОГО ПИЛИЛЬЩИКА

Сергеева Ю.А., Долмонега С.О.

Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, Пушкино, Россия, e-mail: sergeeva@vniilm.ru

В России в рамках Платформы БиоТех2030 расширены научные разработки, направленные на создание эффективных биологических средств, технологий их производства и применения для защиты лесов от вредителей. Против рыжего соснового пилильщика *Neodiprion sertifer* Geoff. эффективно использовали препарат Вирин-диприон, однако с 2009 года он был снят с производства. В результате в очагах фитофага для защиты от повреждений используют различные химические инсектициды, что наносит ущерб лесным экосистемам и их компонентам.

С 2011 года начаты работы по созданию нового вирусного препарата для защиты сосняков от рыжего соснового пилильщика.

В результате лабораторных и полевых испытаний 9 изолятов вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) в популяциях фитофага, проведенных в 3 регионах страны, отобран наиболее эффективный штамм-продуцент, проведено его депонирование в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского».

С 2013 года на основе штамма-продуцента приступили к разработке технологии малотоннажного производства вирусного препарата против рыжего соснового пилильщика с использованием устоявшейся методологии выполнения микробиологических исследований, световой микроскопии, биотестирования вирусных препаратов.

В процессе работ созданы и полностью оснащены современным оборудованием пилотная лаборатория во ВНИИЛМ и региональная биотехнологическая лаборатория по выпуску эталона вирусного препарата в Южно-европейском филиале ВНИИЛМ (станция Вешенская Ростовской области).

Составлена Технологическая схема малотоннажного производства вирусного препарата, включающая последовательный подробный перечень технологических процессов, и на основе которой в течение 2-х лет проводилось ее апробирование в пилотной лаборатории. Получены экспериментальные данные, позволяющие скорректировать и оптимизировать этапы технологии. В результате проведения исследований по получению вирусной биомассы, установлено, что при использовании минимальных норм расхода не происходит пролонгации развития болезни и накопления большего числа полиэдров в организме насекомых. Эффективная норма расхода суспензии при наработке вирусной биомассы составляет 1,5-2 мл/ на 1 литр. Оптимальным является срок обработки личинок

в 3-4 возрасте, что позволяет избежать потери биоматериала в результате выживания насекомых и получить максимальное накопление полиэдров.

В 2014 году наработано 9,5 л вирусного препарата, полученный объем может быть использован при проведении опытно-производственной проверки эффективности препарата при наземных или авиационных обработках в очагах массового размножения рыжего соснового пилильщика.

Для снижения бактериальной обсемененности определена эффективная добавка антибиотика к препарату, позволяющая снизить количество контаминантов в 10 раз.

Определена полная нуклеотидная последовательность генома 6 штаммов ВЯП рыжего соснового пилильщика. Между собой российские штаммы имеют не более 1% различий, так же как и с американским изолятом, генетический код которого есть в ГенБанке. Проводится анализ полученных данных и определение генетических маркеров, ответственных за проявление разных биологических свойств изучаемых штаммов.

На основе полученных в процессе исследований данных разработан проект Технических условий на вирусный препарат. Выполнен расчет себестоимости препарата. Определены направления работ по внедрению в практику нового вирусного препарата и возможности его коммерциализации.

В результате проведенных работ будет зарегистрирован в качестве разрешенного для применения новый вирусный препарат и включен в Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. В итоге будет организовано его производство для нужд лесного хозяйства.

Реализация полученных результатов позволит организовать в стране малотоннажное производство вирусного препарата против рыжего соснового пилильщика, начать возрождение экологически безопасных средств защиты леса и восполнить их отсутствие.

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Синицын А.П.^{1,2}

¹Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия

²Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия,

e-mail: apsinitsyn@gmail.com

Основу комбикормов в России и Беларуси составляют зерновые культуры (пшеница, рожь, тритикале, овес, ячмень). Применение этих кормов отрицательно влияет на усвоение питательных веществ и продуктивность животных и птицы из-за высокого содержания в них некрахмалистых полисахаридов (НПС): целлюлозы, бета-глюканов, пентозанов (ксиланов), пектиновых веществ. НПС в пищеварительном тракте образуют вязкий раствор, обволакивающий кормовую массу и препятствующий доступу собственных ферментов животных и птицы к питательным веществам кормов и их перевариванию, что приводит к значительной потере продуктивности при повышении затрат кормов. Выходом является применение соответствующих фуражу ферментных препаратов (ФП), разрушающих НПС.

Проведено сравнительное исследование активности и свойств российских и зарубежных коммерческих карбогидразных ФП, используемых в качестве кормовых добавок, имеющих целлюлазную, бета-глюканазную и ксиланазную активность. Карбогидразные ФП являются в большинстве случаев комплексными, имеющими в своём составе несколько ферментов, их можно разделить на две группы – одна характеризуется преобладанием целлюлазной и бета-глюканазной активности над ксиланазной, другая имеет повышенную ксиланазную активность. В некоторых случаях карбогидразы смешаны с фитазой. Определены оптимальные значения pH и температуры целлюлазной, бета-глюканазной и ксиланазной активности ФП, изучена стабильность этих активностей при разных условиях. Проведены *in vitro* кормовые испытания ФП с точки зрения уменьшения вязкости кормов, а также степени ингибирования активности ФП белковыми ингибиторами злаков. Сформулированы требования к свойствам кормовых ФП нового поколения.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ВСХОЖЕСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ ДОННИКА

Смирнова И.Э.¹, Саданов А.К.¹, Джамантиков Х.Д.², Галимбаева Р.Ш.¹

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» г. Алматы, Казахстан,
e-mail: iesmirnova@mail.ru

²ТОО «Казахский НИИ рисоводства им. И. Жахаева», г. Кызылорда,
Казахстан, e-mail: abai95@mail.ru

Сдерживающим фактором развития растениеводства в Казахстане является засоленность почв [1, 2]. Площадь засоленных почв в Республике составляет 94 млн. га., что почти 40% от общей территории [3]. Одним из путей решения этой проблемы является подбор сельскохозяйственных культур, способных расти и давать высокие урожаи на засоленных почвах. Наиболее перспективной культурой является донник, который может расти на полях с высоким засолением почв. Кроме того, культура является активным фитомелиорантом, после ее выращивания содержание солей в почве уменьшается на 5-15 % [4]. Корма из донника по качеству не уступают кормам из люцерны и однолетних бобовых трав [5]. Однако при его культивировании существует серьезная проблема плохой всхожести семян, что обусловлено их твердой оболочкой. Часто поля, засеянные донником, остаются пустыми на 1/4, так как из посеянных семян всходит только 30-40% [6]. Существуют различные способы повышения всхожести семян растений: физические химические и механические. Наиболее часто используют скарификацию, то есть нарушение целостности семенной оболочки механическим путем. Этот способ вызывает повреждение самих семян и требует существенных затрат энергии [7]. Биологические методы повышения всхожести, основанные на использовании микроорганизмов, являются экологически чистыми и отвечают требованиям охраны окружающей среды. Ранее было показано, что целлюлолитические бактерии повышают всхожесть семян и стимулируют рост различных сельскохозяйственных культур [8, 9]. Задачей исследования явилось отбор штаммов целлюлолитических бактерий, повышающих всхожесть и продуктивность донника, и разработка на их основе биопрепарата.

Из лабораторной коллекции был отобран один штамм – 21N. В лабораторных и мелкоделяночных полевых опытах, проведенных на почвах со степенью засоленности выше средней (содержание солей 1,0-1,2%), было установлено, что штамм 21N повышает всхожесть семян до 70-75% и стимулирует рост донника. Штамм является не токсичным и не патогенным для человека и животных. Проведение молекулярно-генетических исследований показало, что штамм относится к роду *Bacillus*, к виду *Bacillus cytaseus*. При детальном изучении установлено, что штамм эффективно повышает всхожесть семян донника за счет синтеза ферментов целлюлаз. Способность штамма активно

стимулировать рост растений, связана с синтезом биологически активных веществ (витамины группы В и свободные аминокислоты). Также показано, что *B. cytaseus 21N* способен фиксировать молекулярный азот атмосферы и снабжать им растения. Изучено, что активность азотфиксации штамма на разных источниках углерода варьирует от $15,6 \times 10^{-5}$ до $60,2 \times 10^{-5}$ мг N₂/мл среды/ч.

Установлен механизм действия штамма: при предпосевной обработке семян бактериями под действием целлюлаз происходит частичное расщепление плотной оболочки, заменяющее процесс механической скарификации (на твердой оболочке семян появляются микротрещины). При этом усиливается транспорт воды и растворенных в ней минеральных и питательных веществ к зародышу семени. Кроме того, биологически активные вещества и дополнительный азот, стимулируют рост растений и повышают устойчивость к болезням. Все это способствует повышению всхожести семян и высокому накоплению зеленой массы донника. Полевые испытания показали высокую эффективность штамма. При предпосевной обработке семян целлюлолитическими бактериями *B. cytaseus 21N* всхожесть возростала до 75%, в контроле – 32%. Урожайность зеленой массы донника повысилась по сравнению с контролем на 8-10 т/га.

На основе штамма *B. cytaseus 21N* разработан новый биопрепарат «Фитобацрин». В настоящее время биопрепарат производится на заводе Института микробиологии и вирусологии и успешно реализуется фермерским хозяйствам.

Список литературы

1. Bilgili A.V. Spatial assessment of soil salinity in the Harran Plain using multiple kriging techniques // Environ. Monit. Assess. - 2013. - № 185(1). – С. 777-795.
2. Zhou D., Lin Z., Liu L., Zimmermann D. Assessing secondary soil salinization risk based on the PSR sustainability framework // J. Environ. Manage. - 2013. - № 128. - С.642-654.
3. Aidarov I.P., Pankova E.I. Salt accumulation and its control on the plains of Central Asia // Eurasian. Eurasian Soil Science. – 2007. - № 40(6). - С. 608-615.
4. Сарсенова А.А. Влияние химмелиорантов на химические свойства и производительность малых черноземных солонцов Северного Казахстана // Вестник науки Казахского агротехнического университета. - 2008. - № 1(48). - С.74-79.
5. Израильсон В.Ф. Физиологические и анатомические особенности люцерны и донника / Проблемы развития солонцов Кулундинской и Барабинской. Новосибирск: Наука. - 1997. - С. 167-178.
6. Юрина Л. И. Улучшение мелиоративного состояния малопродуктивных почв ростовской области // Мелиорация и водное хозяйство XXI века. Наука и образование: Мат. междунар. науч.-практ. конференции, посвященной 170-летию Белорусской государственной сельскохозяйственной академии – Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия – 2010. – С. 197-200.
7. Бехлярова Г.А. Химические, биологические методы защиты и стимуляции растений. М.: Наука. - 2009. - 142 с.
8. Смирнова И.Э., Галимбаева Р.Ш., Кузнецова Т.В., Айткельдиева С.А. Целлюлолитические бактерии, стимулирующие рост растений сои // Материалы V съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент. - 2012. - С. 89-90.

9. Смирнова И.Э., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Галимбаева Р.Ш., Мауи А.А. Целлюлолитические бактерии, перспективные для защиты и повышения урожайности сахарной свеклы // Вестник Кыргызского Национального аграрного университета. - 2013. -№2 (29). - С. 176-179.

**ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ
CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS БИМ Y-228 Д
В СОСТАВЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «КРИПТОЛАЙФ-С»
Тамкович И.О.¹, Гайдук А.С.¹, Сапунова Л.И.¹, Кулиш С.А.¹,
Шарейко Н.А.², Долженкова Е.А.²**

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

²Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь,
e-mail: sharejko@mail.ru

В последние годы в рационах животных увеличилось использование кормовых добавок на основе дрожжей. На рынке предлагают продукты, включающие живые и инактивированные дрожжевые клетки и/или их метаболиты, а также содержащие клеточные стенки дрожжей или их гидролизаты. Указанные добавки обладают про- и пребиотическим эффектом, антиоксидантными и детоксикационными свойствами, что повышает устойчивость животных к патогенам и их воздействию, улучшает пищеварение, повышает метаболический, биохимический, иммунологический и репродуктивный статус животных [1].

Ранее на основе дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ Y-228 Д, продуцирующих олиго- и полисахариды [2–3], разработана [4] и зарегистрирована жидкая форма биологически активной кормовой добавки «КриптоЛайф», создан способ кормления сельскохозяйственных животных [5]. Установлено, что добавка обладает пребиотическим эффектом, увеличивает среднесуточные привесы телят, поросят и цыплят-бройлеров на 3,7-14,7%, снижает расход кормов на 1,3-6,8% [6–8]. Недостатком продукта является его небольшой срок хранения.

Цель настоящей работы – исследование стабильности сухой формы кормовой добавки «КриптоЛайф-С», полученной лиофильной и конвективной (воздушно-температурной) сушкой смеси культуральной жидкости дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ Y-228 Д и различных наполнителей [9].

Образцы кормовой добавки хранили при 18–22 и 4–8°C. Титр дрожжей (N) определяли методом предельных разведений на среде Сабуро, используя для расчетов формулу: $N = \sum C / m \times 1,1 \times d$, где $\sum C$ – сумма колоний, выросших на чашках Петри в двух последовательных разведениях; m – количество кормовой добавки, взятой для посева на чашку, г; d – коэффициент разбавления, соответствующий первому учитываемому разбавлению.

Приведенные результаты представляют собой усредненные величины 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях и статистически обработанных с использованием компьютерных программ из пакета Microsoft Excel.

Анализ полученных данных показал, что жизнеспособность дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ Y-228 Д в образцах кормовой добавки «Крипто-

Лайф-С», полученных лиофильной и конвективной сушкой с использованием в последнем случае трепела, талька и доломитовой муки в качестве наполнителей, сохраняется практически полностью (95-100 %) при температуре (4–6 ... 20-22)°С в течение не менее 12 месяцев.

Полученные данные будут использованы при разработке опытно-промышленной биотехнологии получения сухой формы кормовой добавки «КриптоЛайф-С» пребиотического действия, содержащей живую культуру дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ У-228 Д.

Список литературы

1. Лобанок А.Г., Сапунова Л.И., Шарейко Н.А., Долженкова Е.А. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 1. – С. 17–22.
2. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г. Штамм дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ У-228-Д – продуцент биологически активных веществ // Положительное решение от 04.06.2015 на выдачу патента РБ по заявке а20121015 от 09.06.2012
3. Скрининг и селекция штамма дрожжей – основы получения кормовой добавки пребиотического действия // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – М.: ВНИИПБТ, 2014. – С. 60–74.
4. Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Кулиш С.А., Костеневич А.А., Гайдук А.С., Шарейко Н.А., Долженкова Е.А., Микуленок В.Г. Оптимизация условий получения кормовой добавки с использованием дрожжей *Cryptococcus flavescens* 1, продуцирующих β-галактозидазу // Инновационные подходы в области науки : Матер. Междунар. Молодежной конф., 5-7 декабря 2014 г., г. Цахкадзор, Армения. – Цахкадзор: Нац. центр инноваций и предпринимательства Минэкономки РА, 2014. – С. 129–135.
5. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г., Шарейко Н.А., Разумовский Н.П., Жалнеровская А.В., Синцерова А.М., Сандул А.В., Долженкова Е.А. Способ кормления цыплят-бройлеров и телят // Заявка а20121472 от 22.10.2012 на выдачу патента РБ.
6. Сапунова Л.И., Костеневич А.А., Лобанок А.Г., Шарейко Н.А., Жалнеровская А.В., Долженкова Е.А. Получение и оценка эффективности кормовой добавки, содержащей галактоолигосахариды // Труды БГУ. «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 224–229.
7. Шарейко Н.А., Долженкова Е.А., Сапунова Л.И., Ерхова Л.В., Костеневич А.А. Биологически активная кормовая добавка «КриптоЛайф» и оценка эффективности ее использования в рационах телят // Зоотехнічна наука: історія, проблеми, перспективи: матеріали III міжнародної науково-практичної конференції, 22-24 травня 2013 / Подільський державний аграрно-технічний університет; за ред. професора М.Г. Повознікова – Кам'янець-Подільський: видавець ПП Зволейко М.Г., 2013. – С. 132–133.
8. Шарейко Н.А., Микуленок В.Г., Долженкова Е.А., Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Кулиш С.А. Использование новой кормовой добавки «КриптоЛайф» в рационах свиней // Зоотехнічна наука: історія, проблеми, перспективи: матеріали IV міжнародної науково-практичної конференції, 21-23 травня 2014 року / за ред. професора М. Г. Повознікова / Подільський державний аграрно-технічний університет. – Кам'янець-Подільський: Видавець ПП Зволейко Д.Г., 2014. – С. 175-176.
9. Гайдук А.С. и др. Отработка условий получения сухой кормовой добавки КриптоЛайф-С // МОЛОДЕЖЬ В НАУКЕ – 2014: Матер. XI. Медунар. науч. конф., Минск, 18-21 ноября 2014. – Минск, 2014. – С. 96.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ МИКРОБНЫХ УДОБРЕНИЙ «БАКТОПИН» И «ПОЛИФУНКУР» ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОДНОЛЕТНИХ ЦВЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Тимофеева В.А.¹, Алещенкова З.М.², Головченко Л.А.¹, Савчиц Т.Л.², Дуброва О.Н.¹, Ярук И.В.¹, Белазарович А.В.¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: luda_gol@yahoo.com

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: microbio@mbio.bas-net.by

При выращивании посадочного материала однолетних цветочных культур для озеленения городских территорий большое значение имеет совершенствование агротехники выращивания рассады растений на основе эффективного использования удобрений. В настоящее время во всем мире набирают популярность бактериальные удобрения, которые увеличивают содержание в почве мобильных биологически доступных форм макро- и микроэлементов, стимулируют рост растений [1, 2]. Наряду с традиционным применением в декоративном растениеводстве минеральных и органических удобрений, существенное значение в обеспечении растений азотом отводится роли микробных удобрений. В Институте микробиологии НАН Беларуси создан ряд микробных удобрений для стимуляции роста, развития растений и освоен их выпуск в Биотехнологическом центре института.

В Центральном ботаническом саду НАН Беларуси проведена оценка влияния микробных удобрений Бактопин и ПолиФунКур на рост и развитие рассады растений *Salvia splendens* cv. Scarlet Piccolo.

«Бактопин» ТУ ВУ100289066.104-2013 – включает бактериальный компонент на основе штамма *Rahnella aquailis* E10 с количеством жизнеспособных клеток $(2,97 \pm 0,058) \times 10^9$ КОЕ/мл и бактериальный компонент на основе штамма *Pseudomonas putida* П2/1 $(2,35 \pm 0,071) \times 10^9$ КОЕ/мл. Содержание АМГ в препарате микробном Бактопин – 1,0%.

«ПолиФунКур» ТУ ВУ100289066.098-2012 – включает бактериальный компонент на основе штамма *Brevibacillus* sp. 11-А с количеством жизнеспособных клеток штамма $5,4 \times 10^{11}$ КОЕ/г. Массовая доля в субстрате-носителе для микроорганизмов, не менее: органических вещества – 60%, азота (N) – 1,5%, фосфора (P₂O₅) – 1,5%, калия (K₂O) – 1,0%.

Удобрения вносили в прикорневую зону растений через неделю после пикировки рассады, повторно – через 3 недели, в период активного роста. Фон – жидкое комплексное удобрение «Флоровит», Ж (универсальный). Анализиро-

вали высоту растений, развитие корневой системы, листового аппарата, продуктивность цветения.

Применение микробных удобрений привело к ускорению роста и развития растений *Salvia splendens*, повышению их декоративности. Анализ полученных данных показал, что при подкормке растений удобрениями прирост растений *Salvia* на 20,2 и 13,2% превышал показатели в контроле (11,4 см). Наиболее эффективно для формирования высоких растений внесение микробного удобрения ПолиФунКур.

В вариантах внесения микробных удобрений количество листьев на растениях *Salvia* на 167,2 и 212,5% превосходило контрольные показатели (6,4 листьев/растение). Наибольшее влияние на формирование листьев оказало удобрение Бактопин.

Установлено, что внесение микробных удобрений способствовало увеличению в 7,6 и 8 раз массы корневой системы растений, по сравнению с контролем (0,5 г). Наиболее эффективно для развития корневой системы внесение микробного удобрения ПолиФунКур.

Отмечено повышение продуктивности цветения растений в вариантах применения микробных удобрений. Количество сформировавшихся цветоносов на 42,9% превышало контрольные показатели (0,7 шт./растение). Высота цветоноса на 120,8 и 149,1% превышала показатели в контроле (5,3 см). Наибольшее влияние на формирование высоких цветоносов оказало удобрение Бактопин.

Таким образом, двукратное внесение микробных удобрений Бактопин и ПолиФунКур способствовало формированию высоких густо облиственных растений с хорошо развитой корневой системой, с высокими цветоносами.

По результатам проведенных испытаний микробные удобрения Бактопин и ПолиФунКур рекомендуются к государственной регистрации для применения при выращивании рассады однолетних цветочных культур в специализированных хозяйствах, а также для применения и розничной продажи населению на территории Республики Беларусь.

Список литературы

1. Михеева Г.А., Сомова Л.А. Влияние полифункционального биопрепарата на продуктивность овощных культур // Агрoхимия. – 2013. – № 5. – С. 66–72.
2. Бактериальные удобрения для бобовых // АгрoXXI. Растениеводство [Электронный ресурс]. – 24.10.2012. – Режим доступа: <http://www.agroxxi.ru/zhurnal-agromir-xxi/stati-rastenievodstvo/bakterialnye-udobrenija-dlja-bobovyh.html>. – Дата доступа: 10.11.2013.

ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ КАК АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ФУЗАРИОЗА ПШЕНИЦЫ

Треножникова Л.П., Саданов А.К., Айткельдиева А.С., Галимбаева Р.Ш.,
Балгимбаева А.С., Ултанбекова Г.Д.

РГП Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан,
e-mail: barahitian@yandex.ru

Среди опасных фитопатогенных грибов - возбудителей болезней зерновых культур особое место занимают представители рода *Fusarium*, потери урожая от которых могут достигать 20-50%. Поэтому, создание и применение в растениеводстве биопрепаратов микроорганизмов, защищающих растения от фузариозов является актуальным направлением. Площадь засоленных земель в Казахстане составляет 15,2% от всей площади сельхозугодий, разработка биопрепаратов для таких сложных природных условий должна иметь свои особенности, биопрепараты должны обладать универсальным действием в разных типах почв. Актиномицеты, как антагонисты возбудителей грибковых болезней растений, являются перспективными агентами биологического контроля. Экстремофильные актиномицеты способны вырабатывать биологически активные вещества не только в нейтральных условиях, но и осуществлять биоконтроль фитопатогенных агентов в условиях засоленных и защелаченных почв, чем определяется их значимость в составе биопрепаратов, разрабатываемых для растениеводства Казахстана.

Целью работы являлось исследование антифунгальной активности экстремофильных актиномицетов в отношении возбудителей фузариозов пшеницы.

Объектами исследований были 50 штаммов экстремофильных актиномицетов, выделенных из экосистем Северного и Южного Казахстана (солонцов, солончаков, засоленных такыровидных почв и такыров).

Экстремофильные актиномицеты вырастили на модифицированном агаре Беннета в нейтральных (среда 1, pH 7,0), соленых (среда 2 с 2,5% NaCl, pH 7,0) и щелочных (среда 3 с 0,25% Na₂CO₃, pH 8,0) условиях. В качестве тест-культур использовали коллекционные штаммы и дикие изоляты: *F. oxysporum* АСП-3 и КЛР-1, *Fusarium heterosporum* АЛП-1, *Fusarium solani* АЛП-2, *Fusarium sporotrichiella* № 5. Антифунгальные свойства актиномицетов изучали методом агаровых блоков. Диаметр зоны ингибирования роста возбудителей фузариоза пшеницы измеряли после инкубирования при температуре 28°C в течение 72 часов.

31 штамм (62,0%) экстремофильных актиномицетов проявили активность в отношении используемых тест-грибов рода *Fusarium*. Установлено, что 18 штаммов (58,1%) экстремофильных актиномицетов обладают выраженной антифунгальной активностью в отношении тест-культур при росте на среде 1

(диаметр зоны подавления роста 12-45 мм); 27 штаммов (87,1%) обладают подобной активностью на среде 2 (диаметр зоны подавления роста 12-48 мм); 23 штамма (74,2%) проявили широкую антифунгальную активность в отношении штаммов фитопатогенных грибов на среде 3 (диаметр зоны подавления роста 11-41 мм). Штаммы *F. oxysporum* АСП-3, КЛР-1 и *Fusarium sporotrichiella* № 5 были более устойчивы по отношению к антагонистам, чем штаммы *Fusarium heterosporum* АЛП-1 и *Fusarium solani* АЛП-2.

Наибольший интерес представляли штаммы, показавшие высокую фунгицидную активность в отношении фитопатогенных грибов во всех изученных экологических нишах (нейтральной, соленой и щелочной): К6-1, БХ-31, К58-22, КZ045G, К67-15. Диаметр зоны подавления роста грибов рода *Fusarium* данными актиномицетами при росте в нейтральных, соленых и щелочных условиях составляет 20-48 мм.

Таким образом, экстремофильные актиномицеты, выделенные из почв Казахстана, проявили антифунгальную активность во всех изученных средах обитания, более выраженную в соленой и щелочной экологических нишах. Отобранные экстремофильные актиномицеты с высокой антифунгальной активностью являются перспективными для разработки биопрепаратов с целью биоконтроля фузариозов зерновых культур в разных экологических условиях.

ВЛИЯНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* SPB2137 НА АЛЮМОУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

**Шапошников А.И., Макарова Н.М., Баганова М.Е., Азарова Т.С.,
Пухальский Я.В., Белимов А.А.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург – Пушкин, Россия,
e-mail: ai-shaposhnikov@mail.ru*

Повышенная кислотность приводит к снижению плодородия почвы и урожайности многих сельскохозяйственных культур до 30-40 % [1]. Это связано с мобилизацией ионов трехвалентного алюминия (Al^{3+}) [2] и проявляется в первую очередь в ингибировании роста корневой системы уже на ранних этапах развития растений [3]. Многие ризосферные бактерии, в том числе *Pseudomonas fluorescens* SPB2137, содержат фермент АЦК дезаминазу, который способствует снижению концентрации стрессового фитогормона этилена, биосинтетическим предшественником которого является АЦК, в корнях и стимулирует рост растений [4]. Другим механизмом ростстимулирующего эффекта таких ризобактерий является продукция ауксинов [5].

Результаты экспериментов показали, что под действием 90 мкМ хлорида алюминия у пшеницы *Triticum aestivum* var. *lutescens* сорта Воронежская 6 отмечалось сильное угнетение корневой системы – длина корней относительно контрольных растений, не подвергавшихся токсическому действию ионов Al^{3+} , составляла 58%. У пшеницы *T. aestivum* сорта Курьер угнетение роста корневой системы по фону Al^{3+} было менее выражено и составило 20%. При инокуляции проростков пшеницы алюмочувствительного сорта Воронежская 6 штаммом SPB2137 токсический эффект ионов алюминия на рост растений заметно снижался. Длина корней у сорта Воронежская 6 по фону Al^{3+} в присутствии ризобактерий увеличивалась в среднем на 26% и составляла 84% от контроля. У слабо чувствительного к действию алюминия сорта Курьер при инокуляции ризобактериями достоверно значимого ингибирования развития корневой системы практически не наблюдалось.

Численность интродуцируемого штамма SPB 2137, при стартовом значении 10^5 КОЕ/мл, за 5 суток роста пшеницы сорта Воронежская 6 увеличивалась в растворе на три порядка и составляла $5,7 \times 10^8$ КОЕ/мл. По фону алюминия численность бактерий была ниже, чем в варианте без алюминия и составляла $2,7 \times 10^8$ КОЕ/мл. Тем не менее, численность бактерий достигала количественных значений, при которых ризобактерии могут оказывать влияние на рост растений [6]. На корнях пшеницы сорта Воронежская 6 ризобактерии обнаруживались как в контроле ($1,0 \times 10^7$ КОЕ/корень), так и по фону алюминия ($0,5 \times 10^7$ КОЕ/корень).

Численность штамма SPB2137 при инокуляции пшеницы сорта Курьер также увеличивалась на три порядка, достигая в среднем $2,4 \times 10^8$ КОЕ/мл. По фону алюминия титр штамма-инокулянта составлял в среднем $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Бактерии активно заселяли корни пшеницы сорта Курьер как в контрольных вариантах ($3,40 \times 10^7$ КОЕ/корень), так и при выращивании растений в присутствии токсических ионов алюминия ($1,11 \times 10^7$ КОЕ/корень).

Проведенный анализ не выявил наличия АЦК в стерильных корневых экзометаболитах 5-ти суточных растений исследуемых сортов пшеницы. Можно предположить, что положительное действие ризобактерий на рост растений в данном случае не связано со способностью бактерий утилизировать АЦК за счет АЦК-деаминазной активности. Анализ содержания L-триптофана показал, что у пшеницы сорта Воронежская 6 оно составляло 140 нг/растение, а у сорта Курьер – 330 нг/растение, что сравнимо с его количеством у высокоотзывчивого на инокуляцию редиса [5]. Однако, отсутствие заметной стимуляции роста корней в контрольном варианте без внесения ионов алюминия показывает, что продуцирование ИУК штаммом SPB2137 может не играть значительной роли в общем антистрессовом действии ризобактерий.

Таким образом, полученные результаты показали возможность снижения алюминиевого стресса у пшеницы путем интродукции в ризосферу растений ростстимулирующих ризобактерий рода *Rseudomonas*. Выяснение механизма наблюдаемого бактериально-растительного взаимодействия требует более детального изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-09023-а).

Список литературы

1. Haug A. Molecular aspects of aluminum toxicity. CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 1983 (1), 345-373
2. Hede A.R., Skovmand B., Lypez-Cesati J. Acid soils and aluminum toxicity. In: Reynolds, M.P., J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab (eds.). Application of Physiology in Wheat Breeding. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2001, 172-182
3. Пухальская Н.В. Проблемные вопросы алюминиевой токсичности. Агрехимия, 2005, 70-82.
4. Белимов А.А., Сафронова В.И. АЦК деаминаза и растительно-микробные взаимодействия (обзор). Сельскохозяйственная биология. 2011, 3, 23-28.
5. Кравченко Л.В., Азарова Т.С., Макарова Н.М., Тихонович И.А. Роль триптофана корневых экзометаболитов при фитостимулирующей активности ризобактерий. Микробиология, 2004, 73(2), 195-168
6. Кравченко Л.В., Шапошников А.И., Макарова Н.М. и др. Видовые особенности состава корневых выделений растений и его изменение в ризосфере под влиянием почвенной микрофлоры. С.-х. биол., 2011, 3: 71-75.

УСИЛЕНИЕ РОЛИ МИКРОБНЫХ АГЕНТОВ БИОКОНТРОЛЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Штерншис М.В., Беляев А.А., Шпатова Т.В., Лемяк А.А.

Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия,
e-mail: ngau-smv@ngs.ru

Усиление роли микробных агентов биоконтроля в защите растений от фитофагов и фитопатогенов требует исследований по расширению функций микроорганизмов, составляющих основу потенциальных биопрепаратов. В частности, важно одновременное проявление одним штаммом инсектицидных и фунгицидных свойств [1, 2], антагонизма к возбудителю болезни растений наряду с ростостимулирующим эффектом [3], способности индуцировать устойчивость растений к действию повреждающих факторов [4].

В данной работе изучены полифункциональные свойства микробных агентов биоконтроля на примере энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* и бактерий-антагонистов рода *Bacillus*.

Антагонистическая активность энтомопатогенного гриба *in vitro* продемонстрирована в отношении трех видов фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* и *Alternaria alternata*. При этом степень фунгицидного влияния *B. bassiana* варьировала в зависимости от концентрации тестируемой суспензии и вида фитопатогенного гриба, максимальная ингибирующая активность достигала 67%. В сибирских условиях актуально использование биоагентов при защите ягодных культур. Модельные полевые опыты по влиянию *B. bassiana* на комплекс вредителей и болезней черной смородины, повреждающих ягодную культуру в природных условиях, выявили полифункциональные свойства энтомопатогенного гриба. Наблюдали одновременное действие гриба на вредителей (побеговая тля и крыжовниковая огневка) и болезни (септориоз и антракноз). Более высокая биологическая эффективность *B. bassiana* продемонстрирована в отношении септориоза (около 70%) по сравнению с антракнозом.

В условиях Сибири другая ягодная культура – земляника поражается серой гнилью, вызываемой грибом *B. cinerea*. *In vitro* три сибирских штамма антагонистических бактерий *B. subtilis* ВКПМ В-10641, *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-10642 и *B. licheniformis* ВКПМ В-10562 при использовании суспензии в концентрации 10^5 КОЕ/мл в разной степени подавляли рост фитопатогенного гриба *B. cinerea*. В модельных полевых опытах на землянике все три местных штамма *Bacillus* проявили способность усиливать рост и развитие растений земляники помимо их одновременного супрессивного влияния на рост возбудителя серой гнили. Взаимодействие этих бактериальных штаммов с фитопатогеном и растениями земляники привело к улучшению показателей их роста и развития. Наи-

лучший результат по подавлению болезни наряду с увеличением параметров роста и развития растений земляники наблюдался для *B. subtilis*.

С целью изучения вклада бактериальных штаммов в индукцию устойчивости растений земляники к серой гнили оценили влияние обработок корневой системы в первый год жизни растения на поражение ягод серой гнилью и продуктивность тех же растений во второй год жизни. Результаты показали, что растения, корневая система которых перед посадкой подверглась обработке бактериальными штаммами, были более устойчивыми к возбудителю серой гнили во второй год жизни. Пораженность ягод грибом *B. cinerea* уменьшалась, если корневая система растений земляники первого года жизни обрабатывалась каждым из изучаемых штаммов *Bacillus*. Наиболее эффективным оказался штамм *B. subtilis* (снижение поражения ягод серой гнилью более чем в 3 раза). Этот же штамм в наибольшей степени повлиял на продуктивность растений земляники (увеличение массы ягод на 20%). Данные подтверждают вклад бактерий рода *Bacillus* в индукцию устойчивости растений земляники к серой гнили [5].

На основании полученных результатов можно полагать, что изученные штаммы микробных агентов биоконтроля фитофагов и фитопатогенов перспективны в качестве потенциальной основы биопрепаратов для защиты ягодных культур, конкурентоспособных с химическими пестицидами.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-16-00101).

Список литературы

1. Kim J.J., Goettel M.S., and Gillespie D.R. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus *Sphaerotheca fuliginea* // Biol. Control. – 2007. – Vol. 40. – P.327-332.
2. Романовская Т.В., Коломиец Э.И., Молчан О.В., Сверчкова Н.В. Подходы к повышению биологической эффективности и стабильности биологических препаратов на основе бактерий-антагонистов и энтомопатогенов // Инф. Бюлл. ВПРС/ МОББ. – 2007. – №38. – С.197-199.
3. Новикова И.И. Биологическое обоснование использования полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов в защите растений от болезней // Защита и карантин растений. –2005. – №2. – С. 5-9.
4. Kloepper J.W., Ryu C. M., and Zhang S. A. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* // Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* // Phytopathology. - 2004. – Vol. 94. – P. 1259-1266.
5. Иммунитет растений / Под ред. В.А. Шкаликова .- М.: КолосС, 2005.- 190 с.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Щетко В.А., Грель М.В., Головнева Н.А., Сергеенко Ю.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: shchatko@mbio.bas-net.by

Современные тенденции развития микробных биотехнологий для пищевой промышленности предусматривают создание новых заквасок на основе чистых культур микроорганизмов, обладающих заданными свойствами, с улучшенными органолептическими, технологическими характеристиками, оказывающими положительное воздействие на здоровье человека.

Для поддержания заквасок в наиболее активном состоянии необходимо постоянно производить замену заквасочных штаммов, что связано с изменением биологических свойств заквасочных микроорганизмов при их длительном культивировании и хранении. В связи с этим особое значение имеет выделение, селекция и изучение свойств штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для практического применения в пищевой промышленности.

Выделение молочнокислых бактерий осуществляется из различных источников (самоквасные кисломолочные продукты, растения, овощи, фрукты и др.) и включает ряд этапов, в том числе, отбор образцов, посев на жидкие и плотные питательные среды для обогащения молочнокислой микрофлорой и выделения чистой культуры, поддержание чистой культуры, исследование биологических свойств выделенных штаммов, их идентификация и определение производственной эффективности.

Наибольшую практическую ценность для использования в производстве молочных продуктов питания имеют бактерии, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*.

Объектами исследований в данной работе служили изоляты молочнокислых бактерий, выделенные цельного молока от здоровых коров частных подворий Гродненской области.

Накопительные культуры бактерий получали путем сквашивания образцов молока в термостате при различных температурах: 28, 37 и 43°C. На следующем этапе проводился посев истощающим штрихом на плотную среду MRS с агаром и молоко с дрожжевым экстрактом для получения изолированных колоний. Отбирали отдельные колонии с характерными внешними признаками для молочнокислых бактерий. Полученные изоляты молочнокислых бактерий поддерживали на среде MRS с 1% лактозы.

Морфологию молочнокислых бактерий изучали на препаратах живых и фиксированных окрашенных клеток с использованием светлопольной и фазово-контрастной микроскопии.

В результате получено 46 изолятов, из которых 30 проявляли максимальную активность роста при 37°C, 4 – при 43°C, 12 – при 28°C.

Изучение морфологических признаков показало, что клетки всех выделенных культур неподвижны, не образуют спор, окрашиваются по Граму положительно, по морфологии клеток являются кокками. Определение жизнеспособности культур после 3-х месяцев хранения показала хорошую сохранность полученных изолятов.

Кислотообразующую активность полученных изолятов на среде MRS с лактозой определяли при различных температурах культивирования (28°C, 37°C, 43°C). Среди исследуемых культур можно выделить несколько активных кислотообразователей, которые к 24 ч роста снижали pH среды до 4,2-4,4. Большинство изолятов проявляли среднюю кислотообразующую активность (pH 4,6 - 5,1). Следует отметить, что все выделенные культуры активнее образовывали кислоту при оптимальной температуре роста, за исключением четырех изолятов, для которых отмечено усиление кислотообразования при повышении температуры культивирования.

Для определения сквашивающей способности изолятов было использовано обезжиренное молоко без внесения дополнительных ростовых факторов. Установлено что 26 изолятов из 46 способны сквашивать молоко при 28, 37 и 43°C в течении пяти пересевов, 4 изолята сквашивают молоко только при 28°C, 12 изолятов способны к сквашиванию при 28 и 37°C, а 4 при 37 и 43°C.

Так же изучали влияние различных концентраций NaCl на рост и кислотообразующую активность выделенных изолятов. Показано, что содержание NaCl в среде культивирования в концентрации 4% снижает активность роста выделенных культур на 3-25%. Исключением является один изолят, на рост которого данная концентрация соли не оказала влияния. При увеличении концентрации соли до 6,5% 14 изолятов не растут, у остальных исследуемых культур снижается накопление биомассы на 50-80%.

Таким образом, проведен первичный отбор культур молочнокислых бактерий, обладающих производственно ценными свойствами, для получения ферментированных молочных продуктов: высокой активностью роста, кислотообразования, устойчивостью к NaCl.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ СИЛЬНО МИКОТРОФНОГО РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА

Юрков А.П.^{1,2}, Якоби Л.М.¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: yurkovandrey@yandex.ru

²Российский государственный гидрометеорологический университет, Санкт-Петербург, Россия

Арбускулярная микориза (АМ) – один из самых распространенных растительно-микробных симбиозов, формируемый большинством видов наземных растений с грибами отдела *Glomeromycota* [1]. АМ как мутуалистическая биотрофная внутриклеточная ассоциация представляет собой одну из наиболее успешных эволюционных стратегий: она существует уже более 400 млн. лет и является одним из самых распространенных растительно-микробных симбиозов [2]. Показано, что образование АМ способствует усилению роста и питания растений, изменяет их гормональный статус, способствует повышению адаптации к неблагоприятным факторам среды. В условиях низкого уровня доступного для питания фосфора в почве АМ обладает наибольшей симбиотической эффективностью вследствие того, что АМ-грибы в первую очередь способствуют усилению поступления этого элемента в ткани растений.

Вследствие того, что симбиотическая эффективность АМ-грибов является комплексным показателем и имеет сложный генетический контроль, механизмы регуляции АМ-эффективности во многом остаются неясными. В настоящее время изучается контроль эффективности АМ как со стороны растения-хозяина, так и со стороны микобионта. Облигатно микотрофный статус АМ-грибов не позволяет им развиваться без участия фитобионта. С другой стороны, показано, что наибольшим полиморфизмом по эффективности АМ обладают растения, а не грибы [3-7], что в совокупности свидетельствует о том, что генотип растения-хозяина является определяющим в формировании эффективного АМ-симбиоза. В связи с этим перспективным подходом к исследованию механизмов АМ-эффективности является подбор модельной пары: 1) высокоотзывчивого на микоризацию растения-хозяина и 2) высокоэффективного АМ-гриба, а также получение мутантов растений по регуляции АМ-эффективности. Авторами была разработана модельная система с применением селектированной сильно микотрофной в условиях низкого уровня фосфора в почве при комнатной температуре воздуха (+25°C) линии MIS-1 люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.) и высокоэффективного штамма АМ-гриба RCAM00320 *Glomus intraradices*. На данной растительной линии проведен мутагенез с получением мутантов по АМ-эффективности (слабоэффективных и неэффективных,

образующих дистрофную микоризу) [8]. Дальнейший анализ температурочувствительности линии MIS-1 по AM-эффективности показал, что увеличение температуры приводит к существенному снижению симбиотической эффективности и показателей микоризации, которые приближаются по своим значениям к показателям микоризации мутантной линии Ш-1-18, образующей дистрофную AM. Продолжается фенотипический анализ микоризы исходной и мутантной линий с применением электронной и конфокальной микроскопии. С другой стороны, авторами проводится выделение грибов арбускулярной микоризы из различных природных зон России с последующей оценкой их симбиотического потенциала на тест-линии MIS-1 люцерны хмелевидной. Результаты исследований могут иметь существенную практическую значимость для разработки новых растительно-микробных агроэкосистем.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-5964.2013.4), гранта РФФИ 15-29-02753 офи_м и с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” СПбГУ (проект №109-98) и оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ВНИИСХМ.

Список литературы

1. Karatygin I.V., Snigirevskaya N.S., Demchenko K.N. Species of the Glomites as plant mycobionts in Early Devonian ecosystems. // *Paleontol. J.* – 2006. – V. 40, N5. – P. 572-579.
2. Проворов Н.А., Штарк О.Ю. Направленная эволюция грибов и растений в симбиотических системах. // *Микология и фитопатология.* – 2014. – Т. 48. – С. 151-157.
3. Martensson A., Rydberg I. Variability among pea varieties for infection with arbuscular mycorrhizal fungi. // *Swedish J. Agric. Res.* – 1994. – V. 24. – P. 13-19.
4. Якоби Л.М., Кукалев А.С., Ушаков К.В., Цыганов В.Е., Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Полиморфизм форм гороха посевного по эффективности симбиоза с эндомикоризным грибом *Glomus sp.* в условиях инокуляции ризобиями. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2000. – №3. – С. 94-102.
5. Юрков А.П., Якоби Л.М., Степанова Г.В., Дзюбенко Н.И., Проворов Н.А., Кожемяков А.П., Завалин А.А. Эффективность инокуляции форм люцерны хмелевидной грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* и внутрипуляционная изменчивость растений по показателям продуктивности и микоризообразования. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2007. – №5. – С. 67-74.
6. Юрков А.П., Якоби Л.М., Дзюбенко Н.И., Шишова М.Ф., Проворов Н.А., Кожемяков А.П., Завалин А.А. Полиморфизм популяции Павловская люцерны хмелевидной по показателям продуктивности, микоризации и эффективности симбиоза с *Glomus intraradices*. // *Сельскохозяйственная биология.* – 2011. – №3. – С. 65-70.
7. Юрков А.П., Гапеева Н.Е., Якоби Л.М. Симбиотическая эффективность грибов арбускулярной микоризы: модельная система. // *Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов Северной Евразии: тез. Всерос. конф. с межд. уч., Екатеринбург, 20-24 апреля 2015г.* – Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2015. – С. 291-294.
8. Юрков А.П., Якоби Л.М. Получение мутантов люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) с изменениями развития арбускулярной микоризы. // *Естественные и технические науки.* – 2011. – №6(56). – С. 127-134.

ЭНТОМОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ КАК ОСНОВА БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ В БЕЛАРУСИ

Янковская Е.Н., Войтка Д.В.

РУП «Институт защиты растений», Прилуки, Беларусь,
e-mail: helena-yan@yandex.ru

Энтомопатогенные грибы представляют собой широко распространенную в природных популяциях членистоногих группу патогенов и являются экологически и практически значимым фактором регуляции численности фитофагов. В Беларуси исследования микопатогенов как агентов биологического контроля проводятся в лаборатории микробиологического метода защиты растений от вредителей и болезней РУП «Институт защиты растений». Диапазон проводимых экспериментов охватывает все этапы создания биопрепаратов, начиная от поиска, выделения и скрининга изолятов грибов и до разработки технологий получения и применения итогового продукта. Коллекционный фонд штаммов энтомопатогенных грибов формировался в лаборатории, начиная с 1977 г., и на данный момент включает 42 штамма энтомопатогенных грибов pp. *Isaria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Pochonia*, *Nomurea*, *Evlachovaea*. На начальном этапе проведения исследований основным объектом являлся вид *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. На основе штамма *B. bassiana* 10E-79 создан биопрепарата боверин зерновой-БЛ, получаемый способом поверхностного твердофазного культивирования, ориентированный для условий производственных биолaborаторий. В этот период были определены перспективные сферы применения грибных биоинсектицидов: сельскохозяйственное производство с повышенными эколого-гигиеническими требованиями к регламентам защитных мероприятий (овощеводство закрытого грунта, картофелеводство, водоохранные территории, лесное хозяйство).

С 90-х гг. прошлого столетия начата разработка новых направлений в исследованиях микопатогенов: 1) оценка в качестве потенциальных продуцентов других видов энтомопатогенных грибов, относящихся к родам *Isaria* (= *Paecilomyces*), *Metarhizium*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*); 2) разработка технологий промышленного производства грибных биопрепаратов способом глубинного жидкофазного культивирования для биотехнологических производств республики; 3) получение более удобных в применении препаративных форм (жидкость, паста); 4) расширение спектра целевых объектов биоконтроля (корнеобитающие вредители, вредители лесных культур, растительноядные клещи, карантинные виды). Ассортимент разработанных грибных биопрепаратов для защиты растений от вредителей включает 6 наименований и охватывает широкий спектр вредных объектов на овощных, плодовых, декоративных, лесных культурах, картофеле (таблица).

Для уточнения оптимальных условий практического применения оценено влияние на энтомопатогены других средств защиты растений: химических и биологических препаратов. Определены параметры совместимости энтомопатогенных грибов при применении в межштаммовых смесях, а также характер влияния на энтомоакарифагов при сочетании в системах защитных мероприятий.

Таблица – Препараты на основе энтомопатогенных грибов, разработанные в РУП «Институт защиты растений»

Название	Основа препарата	Целевые объекты	Культура
Боверин зерновой-БЛ	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill., штамм 10E-79	Колорадский жук, тепличная белокрылка, трипс табачный, короед-типограф, личинки корнеобитающих вредителей	Картофель, огурец защищенного грунта, еловые насаждения, хвойные
Препарат «Melobass», пс.	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill., штамм 10-06 БИМ F-369Д	Колорадский жук, личинки двукрылых вредителей, личинки майских хрущей	Картофель, огурец защищенного грунта, подвой и саженцы плодовых культур
Энтолек, Ж	<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimmerm.) Zare & W.Gams, штамм BL-2 БИМ F-456Д	Паутинный клещ, тепличная белокрылка	Огурец, роза, тоmat защищенного грунта
Леканицилл	<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimmerm.) Zare & W.Gams, штамм BL-1	Тли (персиковая, бахчевая)	Огурец защищенного грунта
Мускардин-Л, пс.	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin, штамм 8/1-01	Пяденицы зимняя и обдирало, комплекс листоверток	Дуб и другие листовенные
Пециломицин-Б, ПС	<i>Raecilomyces fumosoroseus</i> (Wize) Brown et Smith, штамм 3/1 БИМ F-328Д	Тепличная белокрылка, личинки двукрылых вредителей	Огурец и тоmat защищенного грунта

Перспективными на данный момент направлениями дальнейших исследований энтомопатогенных грибов как основы биологических средств защиты растений представляется изучение способностей штаммов продуцировать ферменты и токсины, оптимизация технологий получения и применения микоинсектицидов, совершенствование форм биопрепаратов, расширение спектра как используемых грибных биоагентов (род *Ophiocordyceps*), так и целевых объектов (подотряд *Coccoidea*).

Секция 3:
Биотехнологии для медицины и промышленности

РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Ануарбекова С.С., Абитаева Г.К., Бекенова Н.Е., Алмагамбетов К.Х.

Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан,

e-mail: rkm_zavlab@list.ru

Проблема терапии дисбактериозов, гепатитов, острых кишечных инфекций и других хронических заболеваний ЖКТ является одной из актуальных в современной медицине.

В последнее время внимание специалистов привлекают растения, непосредственно используемые для коррекции дисбактериоза, различных инфекций ЖКТ в совокупности с пробиотическими микроорганизмами. Растения являются незаменимым источником получения лекарственных средств с различным спектром фармакологической активности [1, 2].

Целью работы является разработка биопрепарата на основе пробиотически активных штаммов лактобацилл и сухого СО₂-экстракта салсоколлина.

Объектом исследований являются 84 молочнокислые бактерии, выделенные из различных экологических ниш и 17 коллекционных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*.

Показатель жизнеспособных клеток соответствовал 10⁷ и более.

Проведен скрининг пробиотически активных штаммов, в результате которого отобраны 22 культуры как наиболее активные, среди них 6 коллекционных штаммов. Дана оценка их биосовместимости [3].

Нами было проведено генотипирование отобранных в результате скрининга пробиотически активных культур молочнокислых бактерий с целью родовой и видовой идентификации методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена.

Исследовано влияние экстрактов салсоколлина и оксим пиностобина на нормальную микрофлору кишечника и пробиотически активные культуры лактобацилл в различных дозировках: 0,02, 0,004, 0,0008, 0,00016 и 0,000032 г/мл. Оценивали показатель жизнеспособности, антагонизм и адгезию.

В результате установлено, что оксим пиностробин существенно подавляет антагонизм пробиотически активных штаммов в дозировке 0,02 г/мл: по отношению к *S. aureus* 12,4±1,15 до воздействия растения и 1,9±1,04 (p<0,001) после воздействия; *E. coli* - 18,4±1,72 и 5,9±2,7 (p<0,01), *Serr. marcescens* - 17,9±1,57 и 2,86±1,33 (p<0,001), *Pr. vulgaris* - 19,9±2,08 и 1,82±0,75 (p<0,001), *S. pyogenes* - 10,45±1,3 и 2,95±1,32 (p<0,001).

Препарат салсоколлин не оказывает подавляющего влияния на нормальную микрофлору кишечника и пробиотически активные культуры лактобацилл,

а наоборот, стимулирует антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам, и может быть использован для разработки комбинированного пробиотического препарата.

В результате создан пробиотический консорциум, состоящий из *Lactobacillus brevis* 4LB, *Lactobacillus rhamnosus* 11 LB, *Lactobacillus fermentum*, иммобилизованный на сорбенте «Тагансорбент» (ТОО «Сорбент», РК) [4].

При подборе консорциума учитывался показатель жизнеспособности, пробиотический потенциал и биосовместимость культур лактобацилл. Штаммы между собой совместимы, показатель выживаемости составляет 10^8 , проявления антагонизма и адгезии высокой степени.

В качестве растительного начала предложен экстракт солянки холмовой, стимулирующий антагонизм при различных дозировках экстракта и обладающий гепатопротекторным действием [5].

В результате моделирования антибиотикового дисбактериоза [6] и токсического гепатита с CCl_4 [7] нами установлено, что данный пробиотический комплекс обладает коррегирующим действием при дисбактериозе и токсическом гепатите.

Исходя из этого, одним из актуальных направлений современной биотехнологии является разработка экспериментально-теоретической базы для создания лечебно-профилактических лекарственных препаратов природного происхождения на основе микроорганизмов-пробионтов и растительного сырья. Дополнительным фактом является то, что на территории Казахстана имеется сырье в достаточном количестве.

Список литературы

- 1 Ушкалова Е.А Место эссенциальных фосфолипидов в современной медицине // Фарматека. – 2003. - № 10. – С. 40-46.
- 2 Адекенов С.М. Итоги фитохимического и фармакологического исследований растительного сырья и организация производства оригинальных лекарственных препаратов // Фармация Казахстана. - 2005. - Спец. выпуск. - С. 4-9.
- 3 Глушанова Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: Автореф. дисс. ... д. м. н. – Москва, 2005. – 24 с.
- 4 Zbao Y.X., Ding X.B. Studies on the alkaloids from *Salsola collina* Pall // *Phytother. Res.* - 2004. – Vol. 18, P. 598-600.
- 5 Демаков В.А., Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты // Биотехнология. - 2008. - № 2. - С. 30.
- 6 Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками // Вестник Санкт-Петербургского унив. – 2009. – Серия 11. – Вып. 1, С. 157-167.
- 7 Венгеровский А.И., Маркова И.В. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости Фармакологического комитета. – 1999. - № 2. – С. 9- 13.

РОДОВАЯ И ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ КИШЕЧНЫХ СТРЕПТОКОККОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ

Богдан В.К.¹, Тимошко М.А.¹, Кодреану С.Н.²

¹Институт физиологии и Санокреатологии АНМ,

e-mail: victoriabogdan@gmail.com

²Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ.

Известно, что кишечная микрофлора представлена множеством разнообразных видов бактерий (более 500), принадлежащих к облигатным, факультативным или транзитным родам микроорганизмов. До настоящего времени лучше всего изучены представители облигатной микрофлоры. Этот факт послужил основанием для настоящих исследований по определению распространенности различных родов и видов кишечных стрептококков в зависимости от состояния здоровья организма человека и животных.

Исследования проводились в два этапа: 1) изучение кишечной микрофлоры поросят (клинически здоровых и больных как дисбактериозом, так и кишечными расстройствами); 2) - детей (3-8 лет).

На первом этапе, из содержимого кишечника клинически здоровых поросят (первая группа) 0-30-дневного возраста были выделены 85 штаммов стрептококков, а 31-60-дневного – 97. После идентификации к роду *Enterococcus* отнесены соответственно 67 и 72 из них, а к роду *Streptococcus* – 18 и 25. Вместе с тем, определялась видовая принадлежность выделенных стрептококков. В результате установлено, что на первом месте были представители вида *E. faecium*, составляющие 78,82 и 74,22%, а на втором – *Str. suis* (21,17 и 25,77%). Подобные исследования выполнялись в таких же возрастных группах поросят с дисбактериозом кишечника. Были выделены 58 и 63 штамма кишечных стрептококков. Первый род был представлен 42 и 43, а второй - 16 и 14 штаммами, что составило 72,41; 68,25 и 27,58 ; 22,22% соответственно. В качественном отношении, у таких животных (вторая группа) выявлены два вида энтерококков (*E. faecium* и *E. faecalis*) по 21,30 и 51,30% каждый. У больных животных (третья группа) видовая принадлежность кишечных стрептококков различалась больше чем у здоровых. При этом в содержимом кишечника животных с симптомами кишечных расстройств превалировал вид стрептококков *E. faecalis* (68,11%), затем обнаруживались те, что принадлежали виду *Str. suis* (20,45%) и лишь в конце вида *E. faecium* (11,44%). Как видно, видовая принадлежность кишечных стрептококков находится в прямой зависимости с состоянием здоровья организма.

На втором этапе, дети в возрасте 3-4; 5-6 и 7-8 летнего возраста были разделены на три такие же группы.

В результате исследования содержимого кишечника детей первой группы (практически здоровых) выделены соответственно 64, 53 и 48 штамма стрептококков. В результате идентификации выявлено, что они относятся к трем родам, а именно *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Lactococcus*. Определение их видовой принадлежности установило, что у детей контрольной группы (I) эти бактерии представлены четырьмя видами: *L. lactis*, *L. cremoris*, *Str. termophilus* и *E. faecium*, составляя в среднем 12,53; 7,84; 15,42 и 64,21% соответственно. У детей указанных возрастов в случае кишечного дисбактериоза (вторая группа) были выделены соответственно 72, 43 и 39 штаммов стрептококков, представляющие следующие виды *E. faecalis*, *Str. termophilus* и *E. faecium* (по 42,35; 34,63 и 23,02% каждый). Одновременно у тех с симптомами кишечных расстройств (третья группа) выявлена качественная картина, показавшая, что первый вид (*E. faecalis*) составлял около 68,44, второй – 22,75 и третий – 8,81%. Следовательно, у больных детей виды стрептококков *L. lactis* и *L. cremoris* не выявлены, вероятно, будучи представителями транзитной кишечной микрофлоры, попадая в пищеварительном тракте с кисломолочными продуктами и находясь в не благоприятных условиях в дальнейшем не размножались.

Полученные данные показывают, что стрептококки широко распространены в природе, а их специфичность для кишечника человека и животных постоянно зависит от состояния здоровья организма. Подтверждением этому являлась родовая и видовая принадлежность выявленных кишечных стрептококков.

Таким образом, установлена целесообразность рекомендации использования количественных показателей кишечных стрептококков с их родовой и видовой характеристикой в качестве высоко информативного критерия оценки эффективности, применяемых в медицинской и ветеринарной практике лечебно-профилактических мероприятий, которые могут быть дифференцированными или специфическими как при дисбактериозе, так и при кишечных расстройствах.

ПОКАЗАТЕЛИ ЧИСЛЕННОСТИ КИШЕЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДОВ *ESCHERICHIA* И *PROTEUS*, КАК СИГНАЛ О НАРУШЕНИИ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОРГАНИЗМА

Велчу А.И., Тимошко М.А., Струтинский Ф.А.

Институт Физиологии и Санокреатологии АНМ, Кишинев, Молдова,

e-mail: alionavelciu@mail.ru

В предыдущих наших работах нами показано, что количественные показатели микроорганизмов рода *Escherichia* в содержимом кишечника клинически здоровых детей и животных находились в пределах от $5,46 \pm 0,11$ до $7,49 \pm 0,13$ log/г. Также было установлено, что представители рода *Proteus* не были характерными для здорового кишечника, т. к. не выявлялись. Отмеченное послужило обоснованием продолжить исследования, целью которых было изучить изменения показателей численности кишечных микроорганизмов родов *Escherichia* и *Proteus* при различных состояниях здоровья организма.

Исследования проводились в двух сериях опытов, по 3 группы в каждой. Первая серия выполнена на модельных животных (морских свинках), а вторая – на детях раннего возраста (1-3 года). В обеих сериях опытные группы под номером I были контрольными (клинически здоровыми), а II и III – экспериментальными (соответственно, без симптомов расстройств, но с нарушениями численности кишечной микрофлоры, а также с симптомами кишечных расстройств).

Полученные результаты показали, что количественный состав микроорганизмов рода *Escherichia* находился в прямой зависимости от состояния здоровья организма как животного, так и человека. Подтверждением тому явился уровень их численности, который в кишечнике клинически здоровых животных (первой группы) находился в пределах $5,98-6,92$, а детей в возрасте одного года – $5,77-5,97$; двух – $5,27-5,67$ и трехлетних – $5,67-6,07$ log/г числа микробных клеток в 1 г. В кишечнике здоровых детей и животных бактерии рода *Proteus* не обнаружены. Вместе с тем, у детей и животных с дисбактериозом количественный уровень эшерихий был выше, составляя соответственно до $6,97$; $8,52$; $8,74$ и $8,63$ log/г. У данной категории детей и животных выявлен и рост протеев, достигающий достаточно высокого уровня (в среднем до $3,68$; $2,90$; $2,69$ и $2,50$ log/г). Обращено пристальное внимание на численность изучаемых бактерий в случае кишечных расстройств, которая была сравнительно еще выше. При этом, эшерихии составляли $8,95$; $9,57$; $9,71$ и $9,51$ log/г, а протей – $5,48$; $3,49$; $3,68$ и $3,28$ log/г, что представляет повышенную опасность для здоровья организма, потому что этим микроорганизмам свойственно синтезировать такие вредные веще-

ства, как индол, скатол, путресцин и кадаверин, а также специфические токсины, которые способствуют интоксикации организма. Хотя это относится к пищевой интоксикации, следует считать, что воздействие является неблагоприятным, потому что способствует отрицательным изменениям как в поведенческой реакции организма, так и в количественной численности микроорганизмов родов *Escherichia* и *Proteus* в содержимом кишечника. Это и является главным в проблеме роли последних в поддержании здоровья на оптимальном уровне для каждого организма включительно, с учетом воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, которые также способствуют отрицательному влиянию – увеличению численности бактерий родов *Escherichia* и *Proteus*.

Таким образом, установлена роль показателей численности кишечных микроорганизмов родов *Escherichia* и *Proteus*, количественный уровень которых может быть рекомендован в качестве предварительного экспресс-сигнала саногенного или патологического состояния организма (в виде дисбактериоза или расстройства кишечника). Эти параметры позволяют быстро оценить существующее состояние и определить степень нарушения здоровья организма детей и животных, а также методы его укрепления.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SPIRULINA PLATENSIS*, ОБОГАЩЕННОЙ ГЕРМАНИЕМ

Джур С.В., Кирияк Т.В., Чепой Л.Е., Рудь Л.И., Кодряну С.Н., Лосева Л.П.,
Рудик В.Ф.

*Институт микробиологии и биотехнологии академии наук Молдовы,
Кишинев, Молдова, e-mail: djurlana@hotmail.com*

Из-за загрязненности окружающей среды и неправильного питания практически все люди страдают из-за недостатка многих микроэлементов, жизненно важных для их организма. Этим и объясняется, что в настоящее время наблюдается растущая потребность в новых источниках тех или иных микроэлементов в биодоступной форме.

В последние десятилетия значительно возрос интерес к органическим соединениям германия. Исследование химического состава растений, традиционно используемых в народной медицине для профилактики и лечения многих заболеваний человека (женьшень, чеснок, алоэ) показало, что они обладают повышенным содержанием германия (до 0,02%). Японские ученые считают, что широкий спектр биологической активности чеснока и женьшеня связан с повышенным содержанием германия в этих растениях, благодаря их способности абсорбировать германий и его соединения из почвы. Германий обладает такими важными биологическими свойствами как способностью обеспечивать перенос кислорода в тканях организма; повышать иммунный статус организма; проявлять противоопухолевую активность и др. Но неорганические соединения германия весьма токсичны, поэтому важно найти источник германия природного происхождения.

В своей работе мы использовали цианобактерию *Spirulina platensis* как фикобиотехнологический объект для биотрансформации неорганической формы германия в органически связанный элемент. Эта цианобактерия способна включать необходимые элементы в свои биокомплексы в процессе роста, аккумулируя их в нетоксичной форме и в заданных дозах при естественном росте биомассы. При этом важно отметить, что легко перевариваемая клеточная оболочка этой микроводоросли обеспечивает высокую биодоступность и усвояемость введенного в ее состав микроэлемента.

Целью работы являлось получение биомассы цианобактерии *S. platensis*, обогащенной германием.

Объектом исследования является штамм цианобактерии *Spirulina platensis* (*NORDST.*) *CNMN-CB-11*, хранящийся в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Республики Молдова. Для культивирования была использована питательная среда Зарроук с определенным соотношением макро- и микроэлементов.

Культивирование осуществлялось в колбах Эрленмейера с объемом культуральной жидкости 100 мл, в течение 144 часов при температуре 30°C. Соединение GeSe₂ вводилось в среду в первый или на третий день культивирования в следующих концентрациях: 5, 10, 15, 20, 25, 30 мг/л.

Согласно полученным данным, с увеличением концентрации селенида германия возрастает процент накопления германия в биомассе, но учитывая продуктивность и все биохимические параметры, наиболее оптимальной концентрацией оказалась 20 мг/л при добавлении в 1-й день культивирования. При этом в биомассе накапливается 48,5 мг% германия.

Таким образом, соединение GeSe₂ может быть использовано для получения биомассы спиролины, обогащенной германием, с дальнейшим её использованием для получения различных антиоксидантных, противоопухолевых препаратов, используемых в медицине, фармацевтике, косметологии.

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ САНИТАРНО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

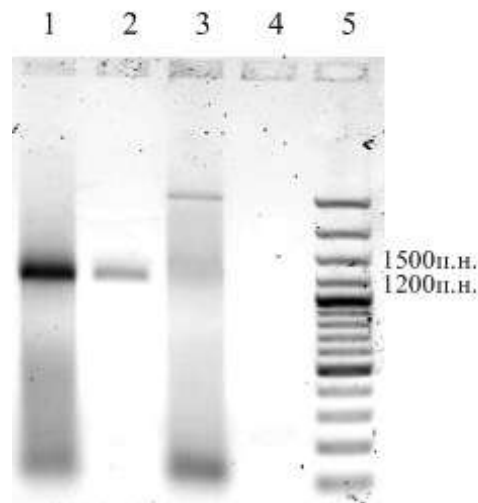
Землянский В.А., Дедюля К.Л., Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь, e-mail: labsanvir@gmail.com*

Важным элементом санитарно-эпидемиологического мониторинга окружающей среды является контроль вирусной контаминации питьевой воды. Вспышки и эпидемии заболеваний, связанных с источниками водоснабжения, регулярно регистрируются в различных странах [1-2]. Популярным методом выявления вирусов-контаногенов является полимеразная цепная реакция. Проблемой данного метода является отсутствие приемлемой системы контроля для оценки качества всех этапов исследования: концентрирования пробы, выделения нуклеиновых кислот и ПЦР. Перспективным решением этой проблемы может быть использование для этих целей контролей, созданных на базе армированных нуклеиновых кислот – неинфекционных генно-инженерных конструкций. Технология создания таких контролей предполагает включает получение плазмиды, содержащей гены матуразы и белка оболочки бактериофага MS2, сайт упаковки в капсид, а также последовательности, комплементарные фрагментам геномов исследуемых вирусов. При экспрессии данной конструкции в *Escherichia coli*, образуется рекомбинантная РНК, упакованная в капсид фага [3-5].

Описанная технология легла в основу разработки набора контрольных образцов для процедуры выделения и детекции норо- и энтеровирусов в питьевой воде. Было произведено клонирование фрагмента генома фага MS2 и геномов соответствующих вирусов в плазмиду pET20b(+). Полученными конструкциями pET20b/MS2/EV и pET20b/MS2/NoV, трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3), инкубировали 16 часов при 37°C в среде с ампицилином, затем экспрессировали 4 часа при 25°C с изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом. Клетки разрушали ультразвуком, суспензию обрабатывали РНКазой и ДНКазой. Электрофорез показал наличие РНК продукта, устойчивого к действию нуклеаз, результаты представлены на рисунке.

Параллельно была проведена ПЦР с праймерами, использованными для клонирования, которая подтвердила наличие фрагментов геномов исследуемых вирусов. Было показано, что полученные псевдовиральные частицы сорбируются при пропускании через фильтр с оксидом алюминия, что соответствует поведению реальных вирусов.



1 – культура, содержащая плазмиду с фрагментом генома MS2 без обработки; 2 – содержащая плазмиду культура, обработанная ДНКазой и РНКазой; 3 – не содержащая плазмиду культура, без обработки; 4 – обработанная ДНКазой и РНКазой культура, не содержащая плазмиду; 5 – 100–3000 п. н. маркер молекулярного веса.

Рисунок – Результаты электрофореза культуры, содержащей армированную РНК

Таким образом, контроли на основе армированной РНК полностью имитируют вирус на всех этапах исследования: концентрации исследуемых образцов, выделении нуклеиновых кислот, обратной транскрипции и ПЦР. При том эффективность контролей не снижается при их хранении в течение 2 месяцев при комнатной температуре, что указывает на высокую стабильность РНК, защищённой капсидными белками, и делает полученные конструкции крайне удобными в применении.

Список литературы

1. Lopman B, Vennema H, Kohli E et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant // Lancet.– 2004.– Vol. 363, № 9410.– P.682-688.
2. Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed.// WHO, Geneva,– 2008,– P.247– 258.
3. Pasloske LB, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, et al. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards// J. of Clinical Microbiol. – 1998.– Vol.36,– № 12.– P.3590–3594.
4. Wei Y, Yang C, Wei B, et al. RNase-resistant virus-like particles containing long chimeric RNA sequences produced by two-plasmid coexpression system// J. of Clinical Microbiol. – 2008.– Vol.46,– №.5.– P.1734–174.
5. Villanova GV, Gardiol D, et al./ Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR// J. of Clinical Microbiol.– 2007.– Vol.45,– № 11.– P.3555–3563.

VITAMIN CONTENT IN MEDICINAL MUSHROOMS *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* AND *TRAMETES VERSICOLOR* CULTI- VATED ON BREADCRUMB

Ivanova T.S.¹, Bisko N.A.², Titova L.O.³, Megalinska G.P.⁴

¹*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
e-mail: ivanova_tatiana_wat2@bigmir.net*

²*M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

³*National Technical University of Ukraine "KPI", Kyiv, Ukraine*

⁴*National Pedagogical M.P. Dragomanov University, Kyiv, Ukraine*

Mushrooms are considered to be a good source of B group vitamins and can be cultivated on the cheap wastes of food production. The purpose of the present work was to investigate thiamine, riboflavin, niacin, and folic acid content in mycelia of *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor* cultivated in submerged conditions on the waste of bread production – breadcrumb.

Mycelial cultures of *S. commune* 1768 and *T. versicolor* 353 were kindly donated by the Culture Collection of Mushrooms from the M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (IBK). Waste bread (breadcrumb) was supplied by Bread Plant № 12 of the public company "Kyivkhib", Kyiv, Ukraine. The concentration of breadcrumb in liquid nutrient media with water was optimized for maximal bioconversion efficiency, and it was established at 60 g/l for *S. commune* and 50 g/l for *T. versicolor*. Mycelial mass of *S. commune* and *T. versicolor* was harvested after 4 and 5 days of submerged cultivation accordingly for achieving maximal biomass. The mycelia were separated from the cultured broth by filtration, washed with water, desiccated at 60 °C, and milled.

The method of vitamin B₁ (thiamine) evaluation was based on oxidation of thiamine to thiochrome, extraction thiochrome into organic solvent, and measurement of fluorescence [1]. Vitamin B₂ (riboflavin) content was determined using riboflavin binding apoprotein from chicken eggs [2]. The method of vitamin B₃ (PP, niacin) estimation was based on hydrolysis, quantitative obtaining of colored glutaconic aldehyde derivate, and further colorimetric determination [3]. Vitamin B₉ (folic acid) content was analyzed by the change in fluorescence intensity before and after oxidation of folates previously purifying them from interfering compounds [4].

The results of comparative analysis have shown that vitamin content increased 3-43 times depending on the vitamin in mycelia of both mushrooms after bioconversion of the substrate breadcrumb (Table). The highest rise was observed in folic acid content, and the lowest augmentation was registered in thiamine content. Two species had similar pattern of vitamin accumulation, but *T. versicolor* mycelium had higher vitamin content. Generally, from 100 g of breadcrumb (which contain 1.3 ± 0.1 mg of vitamins under study) after 4 days of cultivation we harvested 44.5 ± 2.0 g of

S. commune mycelium which contained 4.33 ± 0.16 mg of investigated vitamins. Alternatively, from 100 g of breadcrumb after 5 days of cultivation we obtained 35.9 ± 1.2 g of *T. versicolor* mycelium which contained 4.56 ± 0.29 mg of investigated vitamins.

Table. Vitamin content in mycelia and breadcrumb (mg%)

Sample	Thiamine	Riboflavin	Niacin	Folic acid
Breadcrumb	0.095 ± 0.005	0.038 ± 0.003	1.13 ± 0.07	0.0130 ± 0.0002
<i>S. commune</i>	0.290 ± 0.025	0.890 ± 0.024	8.29 ± 0.29	0.27 ± 0.02
<i>T. versicolor</i>	0.390 ± 0.005	1.080 ± 0.020	10.67 ± 0.77	0.56 ± 0.02

The results of our investigation have shown similar vitamin content of two mushroom species grown on the same substrate. Vitamin content in fungal mycelia was higher than in substrate breadcrumb, especially in *T. versicolor*. Consequently, *S. commune* and *T. versicolor* have an ability to synthesize investigated vitamins de novo using breadcrumb as a substrate. *T. versicolor* mycelium has higher vitamin content, but cultivation of *S. commune* on the breadcrumb is more efficient because of shorter cultivation period and higher biomass accumulation.

References:

1. Experimental Vitaminology / Ed. by Yu.M. Ostrovsky. – Minsk: Nauka i tekhnika, 1979. – 551 p (Ru).
2. Kodentsova V.M., Vrzhesinskaja O.A., Risnik V.V., Sokolnikov A.A., Spirichev V.B. Isolation of riboflavin-binding apoprotein from chicken egg protein and its use for determining riboflavin in biological samples // Applied Biochemistry and Microbiology. – 1994. – Vol. 30, Iss. 4-5. – P. 603-609 (Ru).
3. Stepanova E.N. On the colorimetric determination of nicotinic acid in food products and biological matter // Voprosu Pitaniya. – 1963. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 66-70 (Ru).
4. Grigoreva M.P., Stepanova E.N., Sapozhnikova G.A. Fluorometric method for determining folic acid in food products // Voprosu Pitaniya. – 1969. – Vol. 28, Iss. 3. – P. 65-69 (Ru).

СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*, УСТОЙЧИВЫХ К БУТАНОЛУ

Кирпичёва Т.Е., Литвинович Н.Е., Болотник Е.В.,
Титок М.А., Коломиец Э.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: kolonok24@yandex.ru

Ключевым фактором, лимитирующим накопление бутанола в процессе ацетоно-бутилового брожения, является ингибирование сольвентогенных бактерий *C. acetobutylicum* продуктами собственного метаболизма и прежде всего бутанолом. При концентрации 9-10 г/л бутанол нарушает жизнедеятельность данных микроорганизмов, а при концентрации 13 г/л – вызывает их гибель [1].

Для повышения устойчивости исследуемых бактерий *C. acetobutylicum* БИМ В-466 к бутанолу использовали несколько методических подходов, а именно метод адаптивной селекции, химического мутагенеза и генно-инженерного конструирования. В результате адаптивной селекции был отобран штамм *C. acetobutylicum* БИМ В-709 Д, способный расти в присутствии 17 г/л бутанола. Анализ толерантных бактерий позволил установить, что у них произошло изменение липидного состава клеточных мембран в сторону увеличения количества насыщенных жирных кислот. В частности, содержание пальмитиновой кислоты (C_{16:0}) увеличилось вдвое. При этом фиксировали достоверное увеличение соотношения насыщенных кислот к ненасыщенным (S/U-коэффициент), которое для исходного штамма *C. acetobutylicum* БИМ В-466 составляло 0,09, а для бутанолтолерантного – 0,16 (в 1,8 раз больше). Известно, что увеличение количества насыщенных жирных кислот обеспечивает стабилизацию мембранных структур и уменьшает их проницаемость для бутанола [2, 3].

В результате мутагенеза бактерий *C. acetobutylicum* БИМ В-709 Д с использованием N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина были отобраны варианты, способные расти в присутствии 25 г/л бутанола. Один из таких вариантов *C. acetobutylicum* 5Н был отобран для дальнейших исследований. Анализ состава мембран у этих бактерий позвлил выявить наличие насыщенных жирных кислот, содержащих циклопропановое кольцо, которые не обнаруживались у штамма *C. acetobutylicum* БИМ В-709 Д, отобранного в результате адаптивной селекции и использованного для мутагенеза. В остальных компонентах клеточной мембраны отличий не было выявлено, а также не изменялся коэффициент S/U. В этой связи необходимо отметить, что увеличение устойчивости бактерий к растворителям, возможно при изменениях в генах, определяющих состав клеточных мембран. В частности, показано, что введение гена *cfal*, детерминирующего образование входящей в состав мембран циклопропановой кислоты,

повышает устойчивость генетически модифицированных бактерий *C. acetobutylicum* к бутанолу [4].

Известно, что в стрессовых условиях, в том числе в ответ на воздействие бутанолом, синтезируются белки теплового шока (БТШ), обеспечивая рефолдинг и/или деградацию нарушенных клеточных белков. Показано, что в результате введения в клетки *C. acetobutylicum* дополнительных копий генов *groESL*, *grpE*, *hspG*, детерминирующих синтез белков теплового шока, выживаемость бактериальной популяции в среде с бутанолом в концентрации 20 г/л повышалась и составляла 45%, 25% и 56%, соответственно. Помимо вышеуказанного эффекта, бактерии, содержащие гены *groESL*, характеризовались повышенной продукцией *n*-бутанола [5].

Для эффективной экспрессии генов *groESL* использовали промоторный участок гена *thi*, детерминирующего синтез тиолазы. На основе нуклеотидной последовательности тиолазного промотора *Pthi* и оперона *groESL* бактерий *C. acetobutylicum* (данные ГЕНБанка NCBI *Pthi* Ac. U08465.1, *groL*:NC_015687.1, *groES*: NC_017295.1) были сконструированы праймеры, обеспечивающие их копирование. Поскольку данные функциональные единицы расположены в разных локусах генома *C. acetobutylicum* для их изоляции использовали технику перекрывающейся ПЦР. Полученную экспрессионную каскаду встраивали в вектор pCB20-Blue (конструкция обозначена как pCB20Pg), который вводили в бактерии *C. acetobutylicum* 5Н, отобранные в результате химического мутагенеза.

Полученные генно-модифицированные бактерии характеризовались повышенной устойчивостью к бутанольному и температурному стрессам, что может обеспечить увеличение у них продукции сольвентов.

Список литературы

1. Moreira, A. R., D. C. Ulmer, and J. C. Linden. 1981. Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*11:567-579.
2. Vollherbst-Schneck, K. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 / J. A. Sands, B. S. Montencourt // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – Vol. 47, No. – P. 1193-1194.
3. Ezeji, T. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms / Caroline Milne, Nathan D. Price, Hans P. Blaschek // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 85. – P. 1697–1712.
4. Eleftherios T. Papoutsakis Transcriptional Analysis of Butanol Stress and Tolerance in *Clostridium acetobutylicum* / Christopher A. Tomas, J. Beamish // *Journal of Bacteriology.* – 2004. – Vol. 186, No7. – P. 2006–2018.
5. Papoutsakis E. T. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program / Tomas C. A., Welker N.E. // *Appl Environ Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, № 8. – P. 4951-4965.

ЛИТИЧЕСКАЯ ЭНДОПЕПТИДАЗА Л5 *LYSOBACTER SP. XL1*: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИМЕДИЦИНЕ

Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Васильева Н.В.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия, e-mail: kudryakovairina@yandex.ru

Образование внешнемембранных везикул является распространенным процессом среди грамотрицательных бактерий [1, 2]. Они выполняют важную роль в процессах жизнедеятельности бактерий: конкурентоспособность, добыча питательных веществ, выживание в стрессовых условиях, вирулентность для патогенных бактерий и др. [3, 4]. Несмотря на то что к настоящему времени накоплено много экспериментальных данных относительно формирования везикул разными таксонами бактерий, этот процесс до конца не понят.

Грамотрицательная бактерия *Lysobacter sp. XL1* образует внешнемембранные везикулы и секретирует с их помощью один из синтезированных ею белков, литическую эндопептидазу Л5. Ранее было показано, что в нормальных физиологических условиях бактерия образует две группы везикул, одна из которых формируется под действием собственно секретируемого белка Л5. Образование гетерогенных везикул одним таксоном бактерии может быть обусловлено особенностями их биогенеза, в частности действием нескольких факторов на внешнюю мембрану бактерии. Изучение других факторов, обуславливающих биогенез везикул *Lysobacter sp. XL1*, дополнит представления о биогенезе везикул грамотрицательных бактерий.

Поскольку везикулы образуются из внешней мембраны, внутренний слой которой представлен фосфолипидами, можно предположить и их участие в этом процессе. Фосфолипидный анализ был проведен во внешних мембранах и везикулах *Lysobacter sp. XL1* методом двумерной тонкослойной хроматографии. Было установлено, что внешние мембраны содержат целый спектр фосфолипидов: кардиолипин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, неидентифицированные фосфолипиды. Интересный результат был получен для везикул: в их составе обнаружено лишь два мажорных фосфолипида – кардиолипин и неидентифицированный фосфолипид, причем первый преобладает. Все это свидетельствует в пользу формирования везикул преимущественно в участках внешней мембраны, обогащенных кардиолипином. На основании полученных результатов предложена модель биогенеза везикул *Lysobacter sp. XL1*.

Кроме вопросов, затрагивающих проблемы формирования везикул, для нас представляет интерес и биомедицинские исследования. В настоящее время перспективным является создание антимикробных препаратов на основе отдельных литических ферментов. Был сконструирован рекомбинантный штамм *Pseudomonas fluorescens Q2-87/B*, синтезирующий литическую эндопептидазу

Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Рекомбинантный белок Л5 поступает в окружающую среду таким же путем, что и у родительского штамма, то есть посредством внешнемембранных везикул. При изучении спектра литического действия препарата везикул Q2-87/В было установлено, что он обладает хорошим литическим эффектом по отношению ко многим условно-патогенным бактериям, а также к грамположительным патогенным бактериям, в том числе и к множественноустойчивым штаммам. Необходимо отметить, что очищенный фермент обладает более слабым литическим действием. Полученный результат свидетельствует о перспективности использования везикулярной формы фермента в качестве антимикробных препаратов. Однако в силу сложной биохимической структуры данный препарат не может быть использован для инъекции. Конструирование искусственных везикулярных структур (липосом) на основе бактериолитических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 может в дальнейшем решить эту проблему.

Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-01937-а и Министерством Образования и Науки № 14.607.21.0013.

Список литературы

1. Kadurugamuwa JL & Beveridge TJ. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release // *J Antimicrob Chemother.* – 1997. – Vol. 40, №5. – P. 615–621.
2. Kuehn MJ & Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19, № 22. – P. 2645–2655.
3. Ellis TN & Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2010. – Vol. 74, №1. – P. 81–94.
4. Amano A, Takeuchi H & Furuta N (2010) Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host–parasite interactions // *Microbes Infect.* – 2010. – Vol. 12, № 11. – P. 791–798.

ВЛИЯНИЕ ЖИРНОСТИ МОЛОКА НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Кузнецова Т.В., Саубенова М.Г., Халымбетова А.Е., Айтжанова А.А.,
Шорманова М.М., Кулназаров Б.А.

Республиканское государственное предприятие «Институт микробиологии и вирусологии» Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан, e-mail: raduga.30@mail.ru

Одной из стратегических задач современности является биотехнологическое конструирование функциональных продуктов питания, которые при их систематическом потреблении обеспечивали бы население пищевыми и биологически активными ингредиентами, необходимыми для нормального функционирования организма человека, и способствовали бы поддержанию его метаболических реакций и физиологических функций на должном уровне. Своеобразное специфическое управление биохимическими процессами во внутренней среде организма осуществляется кисломолочными продуктами, получаемыми с помощью молочнокислых микроорганизмов. При их недостатке происходит заселение кишечника патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, такими как дрожжи и плесневые грибы [1, 2].

Нами была показана возможность подавления их жизнедеятельности использованием молочнокислых микроорганизмов.

Объектом исследований являлась наиболее активная ассоциация КГ молочнокислых микроорганизмов, состоящая из молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacterium bulgaricus*, *Saccharomyces lactis*), выделенных из кисломолочных продуктов домашнего изготовления и казахских национальных напитков.

Для определения антагонистической активности в качестве тестовых культур использовали дрожжи *Candida albicans*, *C. guilliermondii* и мицелиальные грибы, выделенные при дисбиозах кишечника и полученные из ТОО «Нутритест»: *Penicillium lanoso-viride*, *Penicillium notatum*, *Penicillium* sp. 3, а также изолят *Penicillium* sp. 1 – засоритель кисломолочных продуктов.

Ассоциацию молочнокислых микроорганизмов культивировали на молоке жирностью 1,5%; 2,5%; 3,2%; 6,0%; 10,0%. Контроль – молоко с теми же показателями жирности. Антагонистическую активность составленных ассоциаций определяли диффузионным методом лунок. Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента для уровня значимости $p < 0,05$.

Показано, что степень антагонистического воздействия молочнокислых микроорганизмов на условно-патогенные грибы зависит не только от тест-

культуры микроорганизмов, но также и от показателя жирности молока (Таблица).

Таблица – Противогрибковая активность ассоциации КГ молочнокислых микроорганизмов, приготовленной с использованием молока с разной жирностью.

Жирность молока	Тест-культуры						
	Контроль	<i>C. albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Penicillium</i> sp 1.	<i>Penicillium</i> sp 3.	<i>Penicillium notatum</i>	<i>Penicillium lanosoviride</i>
1,5%	0	16±0,3	14±0,1	15±0,2	16±0,1	14±0,3	15±0,2
2,5%	0	15±0,2	13±0,1	14±0,2	14±0,3	12±0,1	13±0,3
3,2%	0	14±0,2	12±0,3	0	0	0	0
6,0%	0	13±0,2	12±0,1	0	0	0	0
10,0%	0	12±0,3	12±0,1	0	0	0	0

Из данных таблицы видно, что противогрибковый потенциал ассоциации КГ оказывается тем ниже, чем выше жирность молока, используемого для ее выращивания. Наиболее устойчивы антагонистические свойства по отношению к дрожжам рода *Candida*, причем они проявляются в достаточно высокой степени даже при 10%-ной жирности молока, когда диаметр зоны подавления роста составляет 12мм. Что касается грибов рода *Penicillium*, то антагонизм по отношению к ним наблюдается лишь при низких показателях жирности молока (1,5 и 2,5%), а уже при 3,2% жирности он отсутствовал вообще. При возрастании жирности молока от 1,5% до 2,5% противогрибковый потенциал по отношению к мицелиальным грибам уменьшается.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что наиболее высокий эффект подавления роста как дрожжей рода *Candida*, так и плесневых грибов рода *Penicillium*, проявляется при использовании для их выращивания молока со сравнительно низкими показателями жирности (1,5% и 2,5%). Это необходимо учитывать при производстве напитков лечебно-профилактического назначения, призванных способствовать элиминированию из кишечного тракта человека условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Список литературы

1. Заявка РФ 2010127276/10 03.12.2008. Перрье Л., Лузинс-Пару К., Тирий И., Фюрманн Б. Применение *L. casei ssp. paracasei* в качестве противогрибкового средства.
2. Magnusson J., Ström K., Roos St., Sjögren J., Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Letters. - 2003. - Vol. 219. - P. 129-135.

ЛИЗОАМИДАЗА – АНТИМИКРОБНЫЙ ПРЕПАРАТ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Леонтьевский А.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия, e-mail: leont@ibpm.pushchino.ru

Возникновение резистентности к существующим антибиотикам у патогенных микроорганизмов – одна из важнейших проблем медицины 21 века. Не менее важная проблема – появление новых патогенов, таких как дрожжевые и мицелиальные грибы, вызывающих тяжелые инфекционные заболевания у людей с ослабленной иммунной системой, после кортикостероидной и антибиотикотерапии. Кроме того, в связи с обострением опасности биотерроризма, особый интерес вызывают новые способы борьбы с эпидемиологически значимыми патогенами, в частности со спорообразующими бактериями рода *Bacillus*, к которым относится *Bacillus anthracis* – возбудитель сибирской язвы.

В рамках решения этих проблем в ИБФМ РАН на основе внеклеточных ферментов и полисахарида бактерии рода *Lysobacter* создан новый антимикробный препарат лизоамидаза.

Лизоамидаза обладает широким спектром действия. Она способна быстро и эффективно разрушать клетки многих устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий и дрожжей, нарушать жизнеспособность грибного мицелия и препятствовать прорастанию грибных спор.

В отличие от антибиотиков, снижающих иммунный статус больного, Лизоамидаза оказывает иммуностимулирующее действие. Это сводит к минимуму опасность возникновения микозов при лечении бактериальных инфекций. Препарат может быть использован в лечении вторичных микозов у пациентов с ослабленной иммунной системой.

Лизоамидаза эффективно лизирует вегетативные клетки бацилл, в том числе *Bacillus anthracis*. Выявлено также спороцидное действие препарата. Показан лечебный эффект лизоамидазы по отношению к экспериментальной сибирязвенной инфекции, вызванной у беспородных белых мышей введением спор и вегетативных клеток *Bacillus anthracis* 71\12 (II вакцины Ценковского), *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* СТИ-ПРТС (устойчивый к рифампицину, ампициллину, тетрациклину, доксициклину) вирулентного штамма *Bacillus anthracis* Ч-7. Полученные результаты позволили предложить новый способ профилактики и лечения сибирской язвы.

В процессе клинических испытаний препарат применяли для лечения поверхностных и глубоких гнойных ран, в том числе огнестрельных, гнойных свищей, маститов, нагноившихся послеоперационных ран передней брюшной стенки и нижних конечностей, остро-гнойных заболеваний мягких тканей и

слизистой оболочки полости рта. Во всех случаях была обнаружена высокая эффективность препарата.

Получены положительные отзывы о применении лизоамидазы в ветеринарии.

Лизоамидаза зарегистрирована в Минздраве РФ и разрешена к использованию в медицине для лечения наружных инфекционных заболеваний.

Имеется опыт получения Лизоамидазы в различных лекарственных формах (порошок, жидкость, перевязочные салфетки, пропитанные препаратом, мазь).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРОИЗВОДСТВЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Литвинова Е.В., Фроленков К.А.

РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь, e-mail obi8@belmedpreparaty.com

Микроорганизмы являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ: белков, липидов, полисахаридов, органических кислот, ферментов, витаминов и др. [1]. Многие из этих соединений являются фармакологически активными и, при этом, менее токсичными по сравнению с продуктами химического синтеза, что позволяет использовать их в качестве действующих веществ лекарственных средств.

На РУП «Белмедпрепараты» внедрены в производство лекарственные средства, субстанции для которых получают с использованием процессов микробного синтеза.

Особый интерес представляет биен – уникальный комплекс этиловых эфиров полиненасыщенных жирных кислот, получаемый из липидов грибной культуры *Entomophthora virulenta*. Комплекс обладает гиполипидемическими, гипохолестеринемическими, репаратными, цитопротекторными свойствами. На основе биена зарегистрировано несколько лекарственных форм. Мазевые формы Репарэф-1 и Репарэф-2 применяют в качестве ранозаживляющих и противоожоговых средств. Мазь Дермарэф эффективна при лечении различных дерматозов, в том числе аллергической этиологии. Хорошо зарекомендовали себя на фармацевтическом рынке Республики Беларусь и лекарственные средства из биена в виде мягких желатиновых капсул: Антисклерол – средство применяемое в терапии гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, атеросклероза и Биен – средство, обладающее выраженным противоязвенным эффектом, применяемое для лечения патологий желудочно-кишечного тракта.

Не меньший интерес для здравоохранения представляет пигмент полифенольной природы меланин, синтезируемый грибной культурой *Aspergillus niger*. Меланин характеризуется широким спектром биологической активности: обладает ярко выраженными фотопротекторными, противовоспалительными свойствами, оказывает антимуtagenный и антиоксидантный эффект. Меланин является действующей основой лекарственного средства Меланиновая мазь, применяемого в качестве лечебно-профилактического фотозащитного средства у больных с дискоидной волчанкой, фотодерматитами, солнечной экземой, крапивницей. Эффективен при применении у больных с витилиго для предупреждения солнечных ожогов на депигментированных участках кожи.

Способность микроорганизмов продуцировать биологически активные соединения, в частности полисахариды, органические кислоты, антибактериальные вещества, лежит в основе получения пробиотиков – препаратов из живых

микробных культур или продуктов микробного происхождения, проявляющих профилактический и лечебный эффекты посредством регуляции нормальной индигенной микрофлоры хозяина [2]. На РУП «Белмедпрепараты» осуществляется выпуск двух препаратов-пробиотиков: монокомпонентного средства Бактолакт, представляющего собой лиофилизированную культуру живых клеток молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*, и поликомпонентного препарата Лактобациллин, состоящего из клеток *Lactobacillus acidophilus* и бактерий *Bacillus subtilis*.

Названные выше лекарственные средства являются оригинальными и прошли весь комплекс фармацевтических и фармакологических исследований, а также клинических испытаний для доказательства их эффективности и безопасности.

На РУП «Белмедпрепараты» осуществляется полный цикл производства всех перечисленных лекарственных препаратов – от микробиологического синтеза биологически активных соединений до получения готовых лекарственных форм.

Список литературы

1. Егорова Т.А. Основы биотехнологии.- М.: Академия, 2003.-208с.
2. Ушкалова Е.А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии// Фарматека.-2007.-№6.-С.16-23.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБА *FUNALIA TROGII*, С ЦЕЛЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ФЕНОЛОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Стерляжникова О.В., Соколова С.В., Шамцян М.М.

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: olya.sterlyazhnikova@gmail.com*

Способность базидиальных грибов синтезировать внеклеточные ферменты, характеризующиеся высокой активностью и стабильностью, даёт возможность использовать их ферментные комплексы для практических целей [1]. Высшие базидиальные грибы осуществляют в природе деструкцию таких сложных биополимеров, как целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин, пектиновые вещества [2]. Лакказы являются одними из основных лигнолитических ферментов. Обычными субстратами лакказы являются различные фенольные соединения и ароматические амины, выполняющие роль доноров электронов в ферментативной реакции [3]. Несмотря на огромный потенциал использование лакказ в промышленности их широкое применение ограничивается высокой стоимостью фермента.

Для получения ферментного препарата лакказы используется штамм *Funalia trogii*, который выбран в качестве активного продуцента лакказы в результате скрининга культур базидиальных грибов коллекции кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского технологического института (технического университета). Следует провести оптимизацию состава питательной среды по источникам углерода и азота с целью увеличения фенолоксидазной активности.

Изучено влияние различных доступных источников углерода (глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы, фруктозы, муки пшеничной в.с., муки кукурузной) на оксидазную активность в условиях глубинного культивирования. Полученные данные показали наибольшее значение оксидазной активности в культуральной среде штамма *Funalia trogii* при культивировании его на средах с содержанием в качестве источника углерода пшеничной муки в. с. Далее было проведено сравнение пшеничной муки высшего сорта и пшеничной муки второго сорта как источников углерода при культивировании. При использовании пшеничной муки второго сорта оксидазная активность выше.

Изучено влияние органических (пептон, цитрат аммония) и неорганических (нитрат и сульфат аммония) источников азота на оксидазную активность в условиях глубинного культивирования. Оксидазная активность значительно выше в средах, содержащих органические источники азота. Наибольшая окси-

дазная активность наблюдалась в среде содержащей цитрат аммония в качестве источника азота.

В ходе выполненной работы подобраны доступные источники углерода и азота для культивирования гриба *Funalia trogii*, которые увеличивают фенолоксидазную активность.

Список литературы

1. Королёва О. В., Степанов Е. В., Линдесман Е. О., Васильченко Л. Г., Хромоныгина В. В., Жердев А. В., Рябинович М. Л. Иммуноферментный анализ разложения гербицида почвенными и дереворазрушаемыми грибами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. - №4. – С. 413-418.
2. Королева О. В. Лакказы базидиомицетов: свойства, структура, механизм действия и практическое применение: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2006. 50 с.
3. GuoL.Q., LinS.X., Zhtng X.B. [et al.]. Production, purification and characterization of a thermostable laccase from a tropical white-rot fungus // World J. Microbiol Biotechnol. 2011. Vol. 27. P. 731-735.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИМПЛАНТАТОВ ОТ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ

Тапальский Д.В.¹, Осипов В.А.¹, Рогачев А.А.², Ярмоленко М.А.²,
Рогачев А.В.², Ситник А.А.³, Павлов С.И.⁴, Бутовская Г.В.⁵, Круль Л.П.⁵

¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь,
e-mail: tapalskiy@gmail.com

²Гомельский государственный университет им. Ф.Скорины, Гомель, Беларусь

³Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Беларусь

⁴НП ООО «Медбиотех», Минск, Беларусь

⁵Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Цель – разработать композиционное покрытие на основе биodeградируемого полимера, обеспечивающее длительное поддержание бактерицидных концентраций антимикробных факторов в зоне имплантации.

Материалы и методы. В качестве исходных полимеров использовали порошки полиуретана марки Desmoran 385 и поли-L-лактида (ПЛ). ПЛ в виде порошка был синтезирован исходя из L-молочной кислоты, которая была получена путем молочнокислой ферментации углеводсодержащих субстратов при культивировании бактерий *Enterococcus faecalis* и очищена от примесей, препятствующих полимеризации. Разработка указанного ПЛ выполнена по заданию 1.3 «Разработать и освоить опытно-промышленную технологию получения L-молочной кислоты и организовать на ее основе производство биodeградируемых импортозамещающих полимерных материалов» Государственной научно-технической программы «Промышленные биотехнологии». Синтезированный ПЛ, как и импортный аналог марки 4042D, не содержит остаточного мономера, обладает способностью кристаллизоваться из растворов и расплавов, а также может наноситься на металлическую поверхность в виде тонких аморфных пленок, отличающихся высокой проницаемостью по отношению к молекулам воды и биоцидных добавок.

Покрытия на титановых пластинах (титан BT1-0) формировали в вакууме из активной газовой фазы, образованной продуктами электронно-лучевого диспергирования смеси порошков полимеров, хлорида серебра и ципрофлоксацина. Оценка поверхностной бактерицидной активности в отношении *E. coli* ATCC 25922 проведена в соответствии с Японским промышленным стандартом JIS Z 2801:2000. Устойчивость покрытий к механическим воздействиям оценивали путем сравнения величин бактерицидной активности, определенных до и после абразивной обработки, проведенной в жидкой среде. Продолжительность абразивной обработки варьировалась от 1 до 14 суток. Диффузию серебра из антибактериальных покрытий в модельную среду исследовали с использованием метода плазменной масс-спектропии на приборе ELAN 9000 (Perkin

Elmer, США). Процесс формирования бактериальных пленок изучали на титановых пластинах с нанесенным покрытием, в качестве тест-культур использовали антибиотикочувствительные изоляты *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, полиантибиотикорезистентный клинический изолят *P. aeruginosa* 50127 MBL. Для выбора оптимального метода стерилизации проведено изучение влияния типа и режима паровой, воздушной и радиационной стерилизации на структуру поли-L-лактида и на выраженность антибактериальной активности композиционных покрытий, нанесенных на поверхность титановых имплантатов. Биосовместимость покрытий оценивали по изменению метаболической активности клеточных культур *HEp-2*, *HaCaT* и фибробластов, культивируемых на полистироловых поверхностях и на поверхностях с нанесенным покрытием. Проведено изучение биосовместимости путем подкожной имплантации титановых стержней с антибактериальным покрытием в область средней линии спины нелинейным лабораторным крысам.

Результаты и их обсуждение. Покрытия представляли собой полимерную матрицу толщиной 150–300 нм с распределенными внутри нее частицами серебра размером 20-50 нм. Выявлен выраженный пролонгированный бактерицидный эффект серебросодержащих покрытий и показана его универсальность в отношении микроорганизмов различных таксономических групп. С помощью масс-спектрометрического определения концентраций серебра в модельной среде показано, что скорость высвобождения наночастиц металла из полимерной матрицы увеличивается при использовании биодеструктурируемых полимерных материалов. Выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок композиционными покрытиями, содержащими ципрофлоксацин и наночастицы серебра. Показано, что оптимальным методом стерилизации для предотвращения выраженной деструкции поли-L-лактида и сохранения поверхностной бактерицидной активности покрытия является паровая стерилизация в режиме 127°C – 1,5 атм. – 30 мин.

С использованием клеточных культур сделано заключение о биосовместимости антибактериального покрытия и отсутствии у него цитотоксичности. Исследования местного действия после имплантации крысам показало, что титановые имплантаты с композиционным антибактериальным покрытием обладают большей биосовместимостью и лучшей биоинтеграцией в окружающую соединительную ткань по сравнению с имплантатами без покрытий.

На основании проведенных экспериментов разработаны ТУ ВУ 100070211.044 «Винты, пластина и фиксатор интрамедуллярный с антибактериальным покрытием». Выполнены технические и санитарно-гигиенические испытания имплантатов, проведены клинические испытания, получено регистрационное удостоверение, разрешающее производство и медицинское применение на территории Республики Беларусь.

Секция 4:
Биотехнологии для контроля окружающей среды

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КОМПСТИРОВАНИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ОТХОДОВ

Беловежец Л.А., Волчатова И.В., Медведева С.А.

*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия,
 e-mail: lyu-sya@yandex.ru*

Одной из серьезных экологических проблем сибирского региона является скопление большого количества лигноцеллюлозных отходов, к которым, прежде всего, относятся гидролизный лигнин (ГЛ) и опилки. Эти отходы занимают большие площади, создают пожароопасную ситуацию, их саморазложение затягивается на долгие годы и служит источником токсичных для почвы и растений веществ. Один из наиболее выгодных с экологической и экономической точек зрения способов утилизации лигноцеллюлозных отходов – их компстирование. Производство компоста не только позволит избавиться от неограниченного количества отходов, но и вернет в почву органический углерод, выносимый с ростом растений.

В ИрИХ СО РАН был разработан способ компстирования лигноцеллюлозных отходов с использованием специально составленной ассоциации микроорганизмов, включающей высшие базидиальные грибы, актиномицеты и дрожжи. Компстирование проводится в теплый период времени, на открытых площадках. К достоинствам технологии можно отнести то, что компстированию можно подвергать практически любой лигноцеллюлозный субстрат, она не требует дорогостоящего оборудования и техники, может быть легко адаптирована к различным условиям.

Таблица – Агрохимические показатели компоста

Компост	Зола, %	Гуминовые кислоты, %	Валовое содержание, %			Подвижные формы, мг/100 г		
			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N-NO ₃	N-NH ₄	P ₂ O ₅
контроль	9,0	6,2	следы	0,4	0,2	0,9	12	40
Компост из опилок	20,7	12,1	1,62	0,22	не опр.	500	1200	140
Компост из ГЛ	12,5	10,2	1,6	2,0	1,8	293	980	1200

В процессе компстирования происходит снижение фитотоксичности субстрата, повышается количество подвижных форм азота, фосфора и калия, гуминовых кислот, сужается соотношение C/N (табл.). Готовый продукт не содержит тяжелых металлов, патогенных микроорганизмов и паразитов. Нами показано, что готовый компост достоверно повышает урожайность пшеницы, ячменя, картофеля, зеленой массы кукурузы. Он может быть использован как грунт для теплиц, наполнитель горшочков для рассады (рисунок).



1 – смесь почва - опилки (2:1); 2 – компост – опилки (2:1)

Рисунок – Внешний вид рассады, выращенной на компосте

При внесении компоста в почву улучшается ее структурные свойства, она обогащается органическим углеродом, что особенно важно для тяжелых глинистых почв.

Таким образом, предложенная нами технология даст возможность предприятиям лесобработывающей и гидролизной промышленности избавиться от большого количества отходов, что снизит их экологическую нагрузку на прилегающие территории, и, в то же время, позволит создать полноценное органоминеральное удобрение.

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ- НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ЭНДО- И РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ

Беловежец Л.А.¹, Третьякова М.С.², Макарова Л.Е.², Маркова Ю.А.²

¹*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия,
e-mail: lyu-sya@yandex.ru*

²*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск,
Россия*

Нефть и нефтепродукты являются неотъемлемой частью нашей жизни. Добыча нефти в мире оценивается в 100 млн баррелей в день. При этом предприятия нефтепереработки достаточно редко находятся непосредственно в зоне добычи нефти, что требует создания нефтепроводов. Все это приводит к неизбежному попаданию большого количества нефти в окружающую среду. Основными источниками проливов нефти являются аварии на скважинах, нефтепроводах (в том числе аварии танкеров), заводах нефтепереработки. Попадание нефти в почву (которая наиболее уязвима для нефтезагрязнения) сопровождается резким угнетением микробиоты, растительного и животного сообщества. Самоочищение почвы продолжается длительное время и зависит прежде всего от наличия в почве микроорганизмов, обладающих набором оксидо-редуктазных ферментов, особенно моно- и диоксигеназами. Поэтому для ускорения биоремедиации целесообразно создавать дополнительный пул микроорганизмов-деструкторов. Наиболее перспективными будут аборигенные штаммы, выделенные из нефтезагрязненных районов.

Из ризосферы и эндосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах п. Тыреть Иркутской области, нами было выделено 115 штаммов микроорганизмов. Среди них выбрано 60 наиболее быстро растущих штаммов, которые были протестированы по способности утилизировать сырую нефть. Для этого микроорганизмы высевались на жидкую минеральную питательную среду, содержащую 2% нефти в качестве единственного источника углерода. Через 2 месяца культивирования гравиметрическим методом анализировалась убыль нефти (таблица 1). Штаммы, утилизировавшие более 40% нефти, использовались в дальнейшей работе. Все они были проверены на способность выживать при высокой концентрации нефти. Показано, что все штаммы успешно росли при высоком (20%) и экстремально высоком (50%) содержании нефти в питательной среде, а штамм 114 смог утилизировать 10% нефти даже при таком уровне нефтезагрязнения (таблица 2).

Для выяснения путей разложения ароматической и, особенно, нафтеновой фракций нефти мы провели ВЭЖХ-анализ культуральной жидкости наиболее активных штаммов в динамике. Практически во всех пробах обнаруживались

коричная кислота и коричный альдегид, что свидетельствует об активном разложении фенантроновых структур. Часть культур (112, 108) включали в метаболизм соединения нафталинового ряда с образованием пирокатехина и последующим расщеплением его до цис,цис-муконовой кислоты. А культура 114 расщепляла эти соединения до протокатеховой кислоты. Нами также отмечено наличие гентезиновой и салициловой кислот (штамм 114), что говорит о наличии дополнительного пути разложения нафталинов. Количество низкомолекулярных фенолов, детектируемых у разных штаммов, варьировало в зависимости от времени культивирования, и было максимальным на 3 и 6 неделях эксперимента. В дальнейшем мы планируем провести ГХМС, что даст нам возможность представить полную картину разложения различных фракций нефти выделенными нами штаммами.

Таблица 1 – Биотрансформация нефти в жидкой минеральной среде

	Убыль нефти, %	Бактерии
Слаборазрушающие	5-10	У59, 111, 4, 6, 2, 5, 9, 10, 12, 7, 3, 8, 1
	15-20	У83, 91, 129, 120, 133, 77, 78, 104, 136, 131, 89, 74, 116, 106, 140, 141, 142
Среднеразрушающие	20-30	У98, 99, 100, 121, 124, 130, 132, 82, 11, 139
	30-35	У81, 88, 92, 94, 96, 97, 105, 122, 76, 137, 60, 86
Сильноразрушающие	40-45	У102, 109, 138, 64
	45-54	У108, 112, 114, 90

Таблица 2 – Рост бактерий при разной концентрации нефти

штамм	90	102	108	109	112	114
концентрация нефти, %						
5	25	22	30	24	35	32
10	15	13	11	12	28	23
15	12	10	10	10	24	22
20	9	7	7	8	16	18
50	5	4	5	6	8	10

Таким образом, нами были выделены новые перспективные аборигенные штаммы микроорганизмов, способные активно утилизировать нефть даже при ее высоких концентрациях. По низкомолекулярным интермедиатам предположительно показаны возможные пути разложения нафтенной фракции нефти.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ МИЦЕЛИЯ И СПОР ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS* – АГЕНТОВ БИОПОВРЕЖДЕНИЯ

Гончарова И.А., Евдокимова О.В., Арашкова А.А., Тригубович А.М.,
Валентович Л.Н., Костеневич А.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: sorbic@mbio.bas-net.by

В настоящее время все большее внимание уделяется изучению условно патогенных (оппортунистических) грибов. К наиболее опасным для здоровья человека относятся многие представители рода *Aspergillus*, часто встречающиеся в очагах плесневого поражения жилых и общественных помещений в условиях относительно невысокой влажности [1]. К сожалению, пока неясно, каковы отличия сапротрофных от клинических штаммов, обладают ли грибы, способные вызвать заболевания, какими-либо особыми свойствами. В связи с постоянным увеличением числа микотически обусловленных заболеваний большую актуальность приобретает диагностика оппортунистических микромицетов, обладающих особыми штаммовыми свойствами. В решении данного вопроса значительную роль может сыграть банк ДНК оппортунистических микромицетов, что требует наличия достаточного количества референсного генетического материала. Однако использование традиционных методов выделения ДНК применительно к грибам – агентам биоповреждения, которые, как правило, характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию факторов внешней среды, часто не дает желаемого эффекта [2–3]. Особую сложность представляет микодиагностика биоповреждений памятников искусства и культуры, когда хорошо выраженные мицелиальные налеты невозможно выделить в чашечную культуру [4].

Целью настоящего исследования стала оптимизация методов выделения геномной ДНК из мицелия и спор плесневых грибов рода *Aspergillus*.

Объектами исследования служили культуры видов *A. calidoustus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. puniceus*, выделенные из очагов плесневого поражения. Грибы растили на агаризованной среде Чапека-Докса с целлофановыми дисками. Для получения мицелиальной пленки инокулят равномерно распределяли по поверхности диска, спорового материала – на поверхности среды под диском.

На начальном этапе исследования, когда культивирование осуществляли традиционными методами, а для получения чистого мицелия использовали пеллеты глубинной культуры, биомассу предварительно дезинтегрировали с использованием жидкого азота, что приводило к значительной фрагментации ДНК. Использование целлофановых дисков значительно облегчило процесс отбора проб и позволило при выделении ДНК применять непосредственно лизис в буфере, содержащем детергенты. Сравнение эффективности выделения ДНК проводили с использованием различных составов лизирующего буфера (2% Тритон

X-100, 2% ДСН (додецилсульфат натрия), 1% ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид), 2% ДСН+1% ЦТАБ), в сочетании с инкубированием при температуре 65°C или встряхиванием с кварцевым песком. Депротеинизацию полученного лизата проводили смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) или 3М ацетата натрия. Нуклеиновые кислоты осаждали изопропанолом, отмывали в 70% спирте, осадок растворяли в ТЕ буфере. Качество и количество препаратов ДНК определяли спектрофотометрически и посредством электрофореза в агарозном геле после ферментативного удаления РНК. Визуализацию результатов электрофореза осуществляли в системе гель-документации ChemiDoc MP System (BioRad).

В результате проведенных исследований было установлено, что при использовании лизирующего буфера с 2% детергентом Тритон X-100 в сочетании с встряхиванием с кварцевым песком максимальное содержание выделенной ДНК составило 191,6 нг/мкг биомассы. Применение буфера на основе 1% ЦТАБ и на основе 2% ДСН в сочетании с прогреванием увеличило выход ДНК соответственно до 266,0 нг/мг и 235,4 нг/мг биомассы. Наилучший результат был достигнут при последовательном действии детергентов ДСН и ЦТАБ в сочетании с прогреванием. Выход ДНК при этом повысился более чем в 5 раз при минимизации фрагментации ДНК, наблюдаемой при использовании однокомпонентного ЦТАБ-буфера. Соотношение оптических плотностей 260/280 нм составило 1,7–1,8 для мицелия и 1,8–1,9 для спор, что указывает на высокую степень чистоты препаратов ДНК.

Анализ результатов исследования с учетом ранее полученных данных дает основание предположить, что при последовательном использовании анионных (ДСН) и катионных (ЦТАБ) поверхностно-активных веществ происходит увеличение доступности клеточных мембран вследствие повышения проницаемости структурных биополимеров клеточных стенок за счет их депротеинизации.

Список литературы

1. Bhabhra R., Askew D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus // Medical Mycology Supplement I. – 2005. – №43. – P. 87–93.
2. Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucleic Acids Research. – 1992. – Vol. 20, No. 22. – P. 6115–6116.
3. Данилевич В.Н., Гришин Е.В. Новый подход для выделения геномной ДНК из дрожжей и грибов: получение ДНК-содержащих клеточных оболочек и их прямое использование в ПЦР // Биоорганическая химия. – 2002. – Т. 28. № 2. – С. 156–167.
4. Ребрикова Н.Л. Руководство по диагностике микробиологических повреждений памятников искусства и культуры. – Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2008. – 80 с.

АССОЦИАЦИЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ В УСЛОВИЯХ ЖАРКОГО КЛИМАТА

Делеган Я.А.^{1,2}, Ветрова А.А.², Акимов В.Н.², Титок М.А.³, Филонов А.Е.^{1,2}

¹Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцино, Россия, e-mail: mewgia@ya.ru

³Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Разработка биопрепаратов на основе термотолерантных бактерий является перспективным подходом в решении проблемы нефтяного загрязнения грунтов в условиях жаркого климата. В данной работе рассмотрены особенности деградации нефти и нефтепродуктов термотолерантными бактериями-нефтедеструкторами с максимальной температурой роста около 50°C. Изучение этой группы организмов позволит расширить представления о биодеградации углеводородов и определить оптимальные стратегии биоремедиации нефтезагрязненных грунтов при повышенных температурах.

Целью работы были поиск и выделение термотолерантных нефтеокисляющих бактерий из загрязненных и не загрязненных нефтью участков и составление стабильной микробной ассоциации как основы биопрепарата для ремедиации грунтов при повышенных температурах. В задачи входила таксономическая и физиолого-биохимическая характеристика бактерий, изучение деградации нефти и индивидуальных углеводородов термотолерантными штаммами бактерий.

Из образцов грунта и воды, отобранных в Казахстане, России (Московская область; озеро Байкал), Ливии (Триполи) и Антарктиде, было выделено 14 бактериальных штаммов, стабильно растущих на нефти как при обычной (24°C), так и при повышенной (45°C) температурах. В качестве филогенетических маркеров для идентификации отобранных бактерий использовали гены 16S рРНК и *gyrB*, по результатам таксономического анализа бактерии были отнесены к родам *Gordonia* (вид *G. amicalis*) и *Rhodococcus* (*R. erythropolis* и *R. pyridinivorans*). Было выявлено, что бактерии способны утилизировать нефть, а также отдельные алканы и ПАУ. Большинство исследуемых термотолерантных бактерий сохраняло способность к росту на средах, содержащих до 5% соли.

В термотолерантных штаммах *Gordonia* показано одновременное наличие двух ферментных систем, ответственных за деструкцию алканов (*alkB*, CYP153). Установлена хромосомная локализация обеих ферментных систем.

В ходе изучения биodeградации нефти в жидкой среде Эванса с нефтью (2%) и солью (3%) отобраны наиболее эффективные термотолерантные нефтедеструкторы: *G. amicalis* 1D, *R. pyridinivorans* 5Ap, *R. erythropolis* Par7, из которых впоследствии был составлен консорциум. Стабильность консорциума и его эффективность была подтверждена в экспериментах с использованием модельных песчаных систем с нефтью (2%), солью (3%) и уровнем влажности 10% в течение 21 суток (Рисунок).

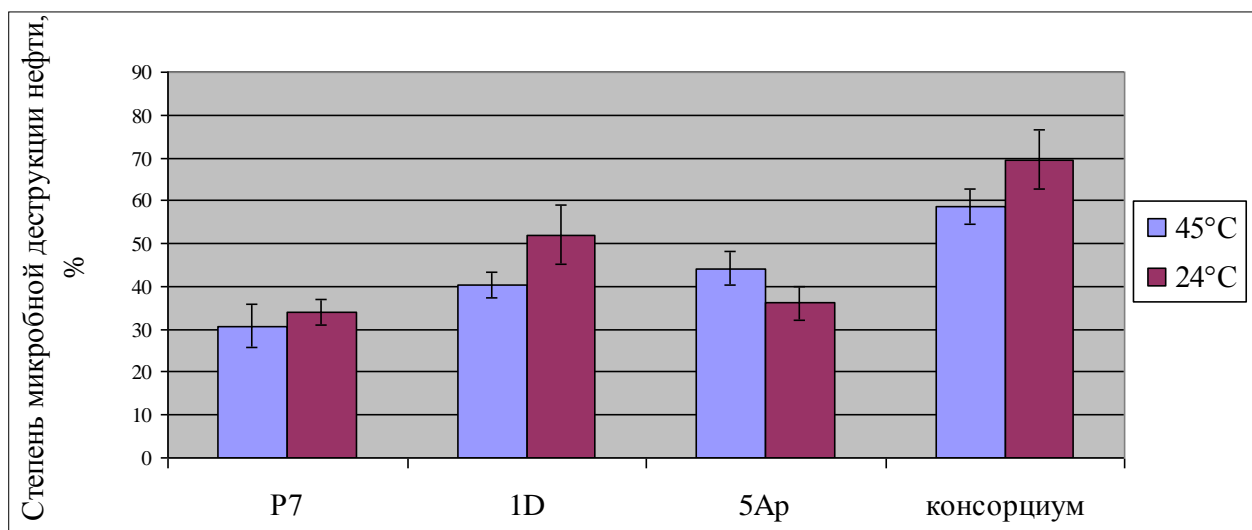


Рисунок – Степень микробной деструкции нефти штаммами *G. amicalis* 1D, *R. erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* 5Ap и консорциумом, составленным из трех штаммов. Абиотическая убыль нефти в эксперименте при температурах 24°C и 45°C составила 20% и 33% соответственно через 21 сутки

Таким образом, в работе охарактеризованы и идентифицированы термотолерантные бактерии, выделенные из географически удаленных регионов. Отобраны наиболее эффективные штаммы-нефтедеструкторы, принадлежащие к родам *Gordonia* и *Rhodococcus*, и составлен бактериальный консорциум. За 21 сутки эксперимента консорциумом штаммов *G. amicalis* 1D, *R. erythropolis* Par7 и *R. pyridinivorans* 5Ap было утилизировано 70% нефти при 24°C и 59% нефти при 45°C.

ПРОИЗВОДСТВО ИЗ ВТОРИЧНОГО СЫРЬЯ СУБСТРАТОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Кудряшов В.Л., Погоржельская Н.С.

Всероссийский НИИ пищевой биотехнологии, Москва, Россия,

e-mail: vera_vikir@mail.ru

В себестоимости продуктов микробиосинтеза значительную долю составляют затраты на субстраты, которые следует уменьшать. В их состав могут входить: экстракты и гидролизаты растительного и животного сырья, соли, микроэлементы, источники азотного и углеводного питания, активаторы роста, индукторы, витамины и др. биологически активные вещества (БАВ).

Одним из традиционных источников БАВ в субстратах является кукурузный экстракт (КЭ), образующийся при замачивании кукурузы и являющийся ценным вторичным сырьем кукурузокрахмальных производств.

Содержание сухих веществ (СВ) в нативном КЭ (НКЭ) в зависимости от метода замачивания составляет 5-12%. В состав КЭ входят белки, аминокислоты, полипептиды, стимуляторы роста, микроэлементы, молочная кислота ($pH \approx 3,5$). и др. БАВ, В НКЭ (при общем количестве азота ≈ 8 мг/%) содержится 16 аминокислот, в т. ч. – 300 мг на 1 г а.с.в. связанных и 100 мг – свободных.

Из-за низкого срока хранения НКЭ в н. вр. его концентрируют до СВ = 35...50% выпариванием, которое имеет недостатки: интенсивное пено-накипе и нагарообразование, коррозионный износ, большие расход щелочи на раскисление, а также инвестиции и энергозатраты. Главное – выпаривание не обеспечивает химической и микробиологической чистоты КЭ. Кроме того, при выпарке образуются меланоидины (снижающие содержание редуцирующих сахаров и аминного азота), а также нерастворимые в воде соединения. Меланоидины ингибируют некоторые ферменты и рост ряда микроорганизмов.

Как показали НИР лаборатории мембранных технологий (ЛМТ) ВНИИПБТ, устранить эти недостатки можно использованием вместо выпаривания мембранных процессов (МП) в две стадии, позволяющих производить ультраконцентрат КЭ (УК-КЭ) с пониженным содержанием меланоидинов и др. уникальными свойствами (см. патент RU № 2521511). Себестоимость УК-КЭ меньше упаренного в 4,2 раза.

УК-КЭ был наработан и испытан во ВНИИПБТ в составе субстратов при биосинтезе лизина, «кислой» протеазы, каратиноидных и пекарских дрожжей. Выявлено повышение выхода (по сравнению с контролем-упаренным КЭ) на 15...25%. Наибольшая эффективность использования УК-КЭ была выявлена при биосинтезе дрожжевых культур, что естественно, так как этот КЭ содержит повышенное количество биотина, инозита и пантотеновой кислоты [1].

Другими перспективными источниками БАВ для субстратов являются зерновая барда, картофельный сок и коричневый сок зеленого сока трав [2-4].

Создана технология производства из барды УК зернодрожжевого (УК-ЗД), испытанного с положительным эффектом при культивировании: *L. lactis* – продуцента бактериоцина низина; *Pr. shermanii* – супероксиддисмутазы; продуцентов проинсулина и целлобактерина; пекарских и каротеноидных дрожжей [2].

Совместно с ВНИИ крахмалопродуктов на основе МП разработана гибкая гибридная технология производства очищенного УК картофельного сока (УК-КС) совмещенная с производством ультраконцентратов из зеленого сока трав (УК-ЗСТ) [3], которые эффективны при биосинтезе белково-витаминных добавок и биопрепаратов путем культивирования дрожжей и грибов [4].

Список литературы

1. Кудряшов В.Л., Лукин Н.Д., Оверченко М.Б., Погоржельская Н.С., Постникова В.Е., Соколова Е.Н., Смирнова И.А., Фурсова Н.А. Ультраконцентрат кукурузного экстракта – перспективный компонент питательных сред: технология производства и перспектива использования // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – М.: ВНИИПБТ, 2014. – С. 379–385.
2. Кудряшов В.Л., Погоржельская Н.С. Мембранные процессы как основа производства из барды зернодрожжевого ультраконцентрата пищевого качества // Пищевая промышленность. – 2014. – № 4 – С. 48–51.
3. Кудряшов В.Л. Унифицировано-гибкий сквозной аграрно-пищевой комплекс по производству кормовых и пищевых добавок из вторичного сырья картофелекрахмального производства и зеленого сока трав // Инновационные технологии в пищевой промышленности: Матер. XII Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 02-03 октября 2013 г. – Минск, 2013. – С. 198–204.
4. Стахеев И.В. Дрожжевой белок из отходов переработки растительного сырья. – Минск: Наука и техника. – 1984. – 75 с.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПРИРОДНЫХ СРЕД, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПЕСТИЦИДАМИ ГРУППЫ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ

**Леонтьев В.Н., Игнатовец О.С., Ахрамович Т.И.,
Феськова Е.В., Марцуль Е.В.**

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: leontiev@belstu.by*

Одной из значительных экологических проблем, возникающих в процессе сельскохозяйственного производства, является негативное влияние на здоровье человека и окружающую среду пестицидов. Благодаря высокой эффективности, простоте и доступности, химический метод стал основным в защите растений. Одними из наиболее часто применяемых на сельскохозяйственных площадях РБ пестицидов являются производные сульфонилмочевины. Масштабы применения указанных ксенобиотиков к настоящему времени достигли, например, на посевах кукурузы, 80 % от общего количества всех применяемых гербицидов. В сельском хозяйстве РБ гербициды из этой группы представлены 15 д.в., на основе которых разрешено к применению 45 препаратов пестицидов группы сульфонилмочевины (ПГС) [1]. Длительное использование указанных пестицидов сопровождается такими нежелательными явлениями, как повреждение чувствительных культур, временная депрессия биологической активности почвы, появление устойчивых биотипов сорняков и др. Наряду с остатками пестицидов, в почве обнаруживаются и их достаточно персистентные метаболиты, что дополняет перечень эколого-токсикологических проблем, связанных с использованием ядохимикатов [2].

Одним из перспективных направлений ремедиации природных сред является интродукция активных микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков в почвы, загрязненные пестицидами. При этом необходимо получение всесторонней информации о миграции, кумуляции и превращениях пестицидов в природных средах (динамике), а также факторах, повышающих эффективность целенаправленного применения бактерий-деструкторов (иммобилизация, внесение дополнительных субстратов) [3]. На кафедре биотехнологии и биоэкологии БГТУ создана коллекция микроорганизмов-деструкторов пестицидов группы сульфонилмочевины, в частности трибенурон-метила и метсульфурон-метила. Разработаны методики анализа указанных пестицидов в почве и водных средах, а также описаны механизмы дегградации ксенобиотиков ферментными системами бактерий-деструкторов. Повышение эффективности дегградации указанных гербицидов отобранными штаммами бактерий осуществляли за счет подбора оптимальных условий культивирования микроорганизмов, а также оценивали возможность применения иммобилизованной культуры для ремедиа-

ции загрязненных почв. Таким образом, экспериментально установлены оптимальные условия культивирования бактерий-деструкторов трибенурон-метила и метсульфурон-метила (определены следующие параметры: степень аэрации, температура, начальная концентрация гербицида, состав питательной среды). Сравнительный анализ результатов деградации пестицидов свободными и иммобилизованными клетками культур на природном носителе показал, что последние осуществляют полную деградацию трибенурон-метила и метсульфурон-метила в модельной почвенной системе за 26-28 суток, в то время, как активность бактерий-деструкторов интродуцированных в почву без предварительной иммобилизации, была существенно ниже. На следующем этапе НИР будет изучено влияния дополнительных субстратов на эффективность микробной деградации пестицидов группы сульфонилмочевины.

Полученные результаты также являются основой для дальнейшей разработки технологии получения бактериального препарата, предназначенного для ремедиации почв, загрязненных пестицидами группы сульфонилмочевины.

Список литературы

1. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь [Электронный ресурс] / Справочное издание, авторы составители Л.В. Плешко, О.А. Хвалей, Т.И. Гололоб, А.Ю. Апанович, В.Е. Боярчук, С.А. Пестерев. Минск, 2014. Режим доступа: http://www.ggiskzr.by/doc/protection/reestr_2014_1_Perechen.pdf. – Дата доступа: 02.02.2015.
2. M. Stoytcheva. Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management / Rijeka, Croatia :In Tech. 2011. P. 520.
3. Кузнецов, А.Е. Научные основы экологической биотехнологии / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова – М.: Мир, 2006. – 504 с.

РЕГЕНЕРАЦИЯ АБСОРБЦИОННОГО РАСТВОРА, СОДЕРЖАЩЕГО ТРИЭТИЛАМИН, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* БИМ В-823Д

Нагорный Р.К., Самсонова А.С.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

e-mail: microbiosmu@mail.ru

Интенсивное развитие литейного производства сопровождается ростом выбросов в атмосферу триэтиламина (ТЭА). Для очистки воздушных потоков от токсиканта используют абсорбционно-биохимические установки (АБХУ), представляющие собой локальные очистные сооружения, в которых применяется оборотное водоснабжение, исключающее образование сточных вод. Интенсивность очистки абсорбционного раствора, образующегося в результате водной сорбции загрязняющих газов, определяется активностью микроорганизмов-деструкторов, иммобилизованных на волокнистом носителе в биореакторе, являющемся конструктивным элементом АБХУ [1, 2]. Для повышения эффективности технологии очистки нами из природной среды выделен штамм-деструктор ТЭА *Rhodococcus qingshengii* БИМ В-823Д, способный осуществлять полную минерализацию ксенобиотика [3].

Цель работы – определение эффективности использования штамма *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д для регенерации абсорбционного раствора, содержащего ТЭА.

Культура *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д использует ТЭА в качестве единственного источника азота [3]. Поскольку массовая доля азота в молекуле ТЭА высока (13,9 %), он поступает в клетки бактерий в результате деструкции в высоких концентрациях. Образование аммония в высоких концентрациях при микробной очистке абсорбционных растворов от ТЭА может привести к снижению скорости деструкции и даже полному ингибированию процесса.

Периодическое культивирование штамма *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д в модельном растворе, содержащем ксенобиотик в концентрации 100 мг/л, сопровождается образованием аммония в концентрации 3 мг/л. После полной утилизации ТЭА аммоний утилизируется клетками исследуемого штамма.

Объясняется это тем, что микроорганизмы рода *Rhodococcus*, как и подавляющее большинство гетеротрофных микроорганизмов, способны потреблять аммоний в качестве источника азота, однако это происходит при наличии в среде источника углерода. В рассматриваемом случае утилизация наблюдается при отсутствии источника углерода в модельном растворе. В минеральной среде аммоний (в виде аммиака) потребляют автотрофные нитрификаторы. Снижение концентрации аммония в минеральной среде под действием гетеротрофных микроорганизмов (гетеротрофная нитрификация), не связано с его потреб-

лением. При гетеротрофной нитрификации не происходит использования клетками энергии, освобождающейся в ходе окисления соединения азота [4]. В проведенном нами эксперименте показано, что образование нитрита и нитрата при утилизации аммония незначительно. Содержание их через 48 ч культивирования в растворе выявляется в следовых количествах.

Очистку абсорбционного раствора, полученного из биореактора АБХУ, функционирующей в литейном цеху ОАО «Гомельский завод литья и нормалей», от ТЭА клетками штамма *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д проводили в периодических условиях в колбах Эрленмейера объемом 500 мл. Культуру исследуемого штамма вносили в абсорбент до титра клеток 1×10^7 КОЕ/мл. Состав абсорбента (мг/л): ТЭА – 2147,0; NH_4^+ – 2,3; NO_3^- – 0,9.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности применения штамма *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д для регенерации абсорбента АБХУ. Так, концентрация токсиканта снижалась в растворе с возрастающей скоростью – в первые сутки на 253, во вторые – на 723, в третьи – на 737 мг/л и на четвертые сутки амин уже не выявляется. В процессе деструкции органические продукты катаболизма в очищаемом абсорбенте не обнаружены. Содержание в нем аммония и нитрата не достигало значений, приводящих к ингибированию процесса деструкции.

Таким образом, штамм *Rh. qingshengii* БИМ В-823Д рекомендуется для использования для разработки эффективной технологии очистки абсорбционных растворов от ТЭА.

Список литературы

1. Шаповалов Ю. П. Очистка вентиляционного воздуха – прогрессивный выбор // Металл-Инфо. – 2007. – №4.
2. Бусби Э. Д., Арчибальд Дж. Дж. Получение отливок повышенной точности в формах, изготовленных с использованием технологии cold-box. // Литейщик России. – 2007. – № 10, С.13–18.
3. Нагорный Р. К. Штамм *Rhodococcus qingshengii* В-823Д – деструктор триэтиламина. Международная научно-практическая конференция «Молодежь в науке – 2013» – 2014 г. – С. 114–118.
4. Castignetti D. et al. Heterotrophic nitrification among denitrifiers // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – Vol. 47, P.620–623.

ВЛИЯНИЕ ГУМАТОВ НА ДЕСТРУКЦИЮ НЕФТИ АКТИВНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Файзулина Э.Р., Айткельдиева С.А., Татаркина Л.Г., Ауэзова О.Н.,
Свирко Е.А., Аккулова З.Г., Айтуганов К.А.**

*Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан,
e-mail: ecomicrolab@gmail.com*

В комплексе процессов очищения природных экосистем от нефтяных загрязнений ведущее место принадлежит углеводородокисляющим микроорганизмам. Благодаря их деятельности, нефть трансформируется до простых соединений, происходит накопление органического вещества и его включение в круговорот углерода.

Перспективным представляется совместное использование химического и микробиологического метода устранения нефтяных загрязнений с помощью диспергентов–сорбентов и нефтеокисляющих микроорганизмов, способных ассимилировать нефтяные углеводороды. В качестве диспергентов предлагаются доступные и нетоксичные гуматы и их модификации, полученные из угольного сырья и отходов, которые по отношению к нефтепродуктам выступают в роли поверхностно-активных агентов [1, 2].

Был поставлен эксперимент по изучению деструкции нефти при совместном внесении иммобилизованных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов и гумата натрия. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали нефть с высоким содержанием парафинов, которую вносили в количестве 5 об.%.

Были исследованы три активные ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов, относящихся к родам *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*: 1) 25Ш + 7А + 84Т; 2) 23Ш + 34 + 12Т; 3) 15Т + 84Т + 43А.

В эксперименте использовали свободные и иммобилизованные на камыше ассоциации микроорганизмов, с и без добавления гумата натрия. Результаты исследования представлены в таблице.

Результаты исследования показали, что свободные ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов утилизировали высокопарафинистую нефть на 56,9-57,5%. Иммобилизация клеток на камыше способствовала увеличению деструкции нефти до 61,0-64,5%. Активность свободных ассоциаций при добавлении гумата натрия была на уровне активности иммобилизованных на камыше клеток. В варианте с использованием иммобилизованных ассоциаций при добавлении гумата натрия отмечалась их наибольшая деструкционная способность. Степень утилизации нефти при этом составила 70,8-73,1%. Наибольшую активность во всех вариантах эксперимента показала ассоциация 3, в состав которой входили бактерии родов *Arthrobacter* и *Dietzia*.

Таблица – Влияние гумата натрия на активность свободных и иммобилизованных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов

Вариант	Степень деструкции, %
нефть (контроль 1)	14,2
нефть + камыш (контроль 2)	17,1
нефть + гумат (контроль 3)	17,8
нефть + камыш + гумат (контроль 4)	22,4
Ассоциация 1	56,9
Ассоциация 2	57,0
Ассоциация 3	57,5
Ассоциация 1 + камыш	61,0
Ассоциация 2 + камыш	63,2
Ассоциация 3 + камыш	64,5
Ассоциация 1 + гумат	59,4
Ассоциация 2 + гумат	63,7
Ассоциация 3 + гумат	64,6
Ассоциация 1 + камыш + гумат	70,8
Ассоциация 2 + камыш + гумат	71,5
Ассоциация 3 + камыш + гумат	73,1

Таким образом, установлено, что гумат натрия оказывает стимулирующий эффект на рост и активность нефтеокисляющих микроорганизмов.

Список литературы

1. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation //Current Opinion in Biotechnology. – 2002. – Vol. 13, № 3. – P. 249-252.
2. Вятчина О.Ф. .И. Стом, О.О. Горбачевская, Н.А. Боярова, Л.В. Коковина. Влияние гуматов на углеводородокисляющие микроорганизмы и на агрегатное состояние олеофильных продуктов //Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 2. – С. 165-169.

ПОДАВЛЕНИЕ НИТЧАТОГО ВСПУХАНИЯ АКТИВНОГО ИЛА АЭРОТЕНКОВ СЕРНОКИСЛЫМ МАРГАНЦЕМ

Юхневич Г.Г., Кирей В.А.

Гродненский государственный университет им. Я. Купалы, Гродно, Беларусь,
e-mail: kirei.veronika@mail.ru

Аэробная биологическая очистка сточных вод от органических примесей активным илом в системах очистных сооружений, включающих аэротенки и вторичные отстойники, применяется длительное время и имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с другими методами очистки. Вместе с тем такая очистка сточных вод в ряде случаев имеет низкую надежность из-за плохой осаждаемости активного ила вследствие так называемого вспухания. Это явление связано с преобладающим ростом и накоплением в активном иле нитчатых микроорганизмов [1]. Чаще всего встречается вспухание ила, обусловленное развитием хламидобактерий (представителей родов *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*), которые занимают пищевую нишу гелеобразующей сапрофитной микрофлоры в биоценозе активного ила, когда она гибнет или повреждается под воздействием неблагоприятных факторов (недостатка кислорода, наличия токсических веществ, высоких концентраций легкоокисляемых органических загрязняющих веществ) [2].

В связи с этим на городских очистных сооружениях возникает необходимость в создании таких сообществ микроорганизмов, которые были бы более устойчивыми к действию неблагоприятных факторов. С этой целью применяют методы химической обработки активного ила [3].

Химическая обработка активного возвратного ила проводилась на очистных сооружениях канализации г. Гродно. Для обработки отбиралось 6 дм³ возвратного ила, в который добавляли сернокислый марганец в количестве 10 г/дм³, и смесь аэрировалась непрерывно аквариумным микропроцессором в течение 24 ч. После такой экспозиции с сернокислым марганцем в активный ил добавляли 20–50 см³ осветленных сточных вод после первичных отстойников в качестве подкормки и ампульные препараты витаминов В₁, В₆, В₁₂ в концентрации 1,0 см³ каждого на 1 дм³ иловой смеси. В этом режиме подращивания ил выдерживали 3–5 ч. Затем обработанная таким образом иловая смесь выливалась в резервуар возвратного ила [4]. Повторные обработки (по той же схеме) проводились 3 раза с интервалом 3-е сут.

Пробы для анализа отбирались из резервуара возвратного ила, сосуда с обработанным возвратным илом, а также из 4-го коридора 4-го аэротенка.

В активном иле 4-го коридора аэротенка до обработки численность нитчатых микроорганизмов составляла $(74,6 \pm 9,1) \times 10^6$ мкм/см³ (таблица). После об-

работки активного ила сернокислым марганцем с течением времени количество нитчатых микроорганизмов уменьшилось. Наименьшая плотность нитчатых организмов выявлена в активном иле после 3-й химической обработки (в 8,1 раз ниже исходной).

Таблица – Изменение плотности нитчатых микроорганизмов активного ила при его обработке сернокислым марганцем

№ обработки	Проба активного ила		Плотность нитчатых микроорганизмов, мкм/см ³
До обработки	активный ил 4-го коридора		$(74,6 \pm 9,1) \times 10^6$
1-я обработка	возвратный ил	необработанный	$(133 \pm 14,6) \times 10^6$
		обработанный	$(140 \pm 8,5) \times 10^6$
	активный ил 4-го коридора через 3 сут. после 1-й обработки		$(32,9 \pm 4,4) \times 10^6$
2-я обработка	возвратный ил	необработанный	$(107,7 \pm 8,9) \times 10^6$
		обработанный	$(62,3 \pm 6,1) \times 10^6$
	активный ил 4-го коридора через 3 сут. после 2-й обработки		$(44,5 \pm 7,8) \times 10^6$
3-я обработка	возвратный ил	необработанный	$(92 \pm 7,7) \times 10^6$
		обработанный	$(33,2 \pm 3,5) \times 10^6$
	активный ил 4-го коридора через 3 сут. после 3-й обработки		$(9,2 \pm 1,8) \times 10^6$
	возвратный ил через 3 сут. после 3-й обработки		$(18 \pm 3,5) \times 10^6$

При этом, наиболее встречаемыми во всех пробах были нитчатые микроорганизмы длиной от 0–100 мкм. В пробе активного ила 4-го коридора до обработки доля таких микроорганизмов составляла 66,7 % от общего количества нитчатых микроорганизмов, а также встречались микроорганизмы и до 400 мкм. После 3-й обработки был достигнут положительный эффект химической обработки: размеры нитчатых организмов не превышали 200 мкм, а доля коротких нитей составила 98,3 %.

Таким образом, установлен положительный эффект трехкратной химической обработки сернокислым марганцем активного ила аэротенков в борьбе с нитчатым вспуханием на городских очистных сооружениях.

Список литературы

1. Кичигина, С. Е. Устойчивость функционирования систем биологической очистки путем исключения нитчатого вспухания активного ила: Дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / С.Е. Кичигина; Моск. ин-т коммун. хоз. и строит. – Щелково, 2007. – 226 с.
2. Методическое руководство по гидробиологическому контролю нитчатых микроорганизмов активного ила. ПНД Ф СБ 14.1.92-96. – М.: Изд-во Госкомитета по окружающей среде РФ., 1996. – 57 с.
3. Жмур, Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н.С. Жмур. – М.: АКВАРОС, 2003. – 506 с.

БИОСИНТЕЗ ЭКЗОГИДРОЛАЗ МИКРОМИЦЕТОМ ИЗ РОДА *ASPERGILLUS* И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО РЕГУЛЯЦИИ, КАК ОСНОВА РАЗРАБОТКИ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Чилочи А.А.¹, Тюрина Ж.П.¹, Клапко С.Ф.¹, Чапурина Л.Ф.², Лаблюк С.В.¹,
Дворнина Е.Г.¹, Туртэ К.И.²

¹Институт Микробиологии и Биотехнологии АН Молдовы, Кишинев, Молдова,
e-mail: alexandra.ciloci@gmail.com

²Институт Химии АН Молдовы, Кишинев, Молдова

Изучение биосинтеза экзоферментов микромицетов, помимо теоретического, имеет исключительно важное практическое значение, как основа разработки современных технологий получения ферментных препаратов с широким спектром применения в промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

Микромицет *Aspergillus niger* CNNN FD 10 был отобран, как перспективный объект биотехнологии, продуцирующий внеклеточный гидролитический ферментный комплекс целлюлазо-ксилааназного действия. Для управления синтезом экзоферментов, были проведены исследования по изучению биосинтетических способностей продуцента и выявлены некоторые закономерности его развития и синтеза внеклеточных целлюлаз и ксиланаз, в зависимости от продолжительности культивирования (12 суток): установлены уровень и срок максимального накопления биомассы (4 сутки – 12,99 мг/мл); выявлены периоды максимального уровня энзиматической активности трех типов ферментов: β-глюкозидазы – 2,50-2,55 ед/мл (7-8 сутки); эндоглюканызы – 5,21-5,94 ед/мл (8-10 сутки); ксиланазы – 55,00-73,12 ед/мл (7-10 сутки); определен максимальный уровень продуцирующей способности мицелия в отношении β-глюкозидаз – 0,468-0,578 ед/мг (7-8 сутки); эндоглюканыз – 1,35-1,47 ед/мг (8-10 сутки); ксиланаз – 11,09-16,58 ед/мг (7-10 сутки).

Увеличивающийся спрос на ферментные препараты с улучшенными технологическими свойствами требует разработки питательных сред, химический состав которых обеспечивал бы повышенный уровень биосинтеза внеклеточных гидралаз. С этой целью проведена оптимизация исходной питательной среды с помощью метода латинских квадратов. В работе варьировались 3 фактора среды (жом свекловичный, отруби пшеничные и NaNO₃ – как источник неорганического азота) в 4 уровнях концентраций, что позволило получить 16 вариантов питательных сред, при культивировании на которых уровень энзиматической активности продуцента колебался в широких пределах: для β-глюкозидаз – от 0,61 до 2,68 ед/мл; эндоглюканыз – от 2,81 до 6,53 ед/мл; ксиланаз – от 18,5 до 141,44 ед/мл. Далее по соответствующим формулам для каждого типа ферментов была рассчитана величина возможного максимального эффекта, что позволило выявить оптимальный состав питательных сред.

Увеличение активности на оптимизированных средах по сравнению с активностью на исходной среде составило 51,1% для β -глюкозидаз; 34,1% для эндоглюканаз и 65,8% для ксиланаз.

Перспективные возможности регуляции биосинтеза экзогидралаз предоставляют комплексы переходных металлов с органическими лигандами. Установлено, что используя комплексное соединение $\text{Cu}(\text{DL-}\alpha\text{Ala})_2$ (концентрация – 5 мг/л, продолжительность культивирования – 7-8 суток) и меняя условия выделения ферментов, можно получать два типа ферментных препаратов: сбалансированный препарат (рН КЖ – 7,0; соотношение КЖ и спирта 1:4) с высоким уровнем активности всех компонентов: эндоглюканазы – 1033 ед/г; β -глюкозидазы – 764,5 ед/г; ксиланазы – 6310 ед/г, что на 43,9%; 9,34% и 46,6% соответственно выше, чем в контрольном препарате; β -глюкозидазный препарат (рН КЖ 3,0; соотношение КЖ и спирта 1:2) с активностью β -глюкозидаз – 1527 ед/г, что в 2 раза выше, чем в сбалансированном препарате и в 5,5-6,0 раз, чем в прототипе (авторское свидетельство).

На основании полученных результатов разработаны две технологии получения ферментных препаратов экзогидралаз при глубинном культивировании микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 10.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ГРИБА *LENTINUS EDODES* CNMN-FB-01 И ЕЕ БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Дворнина Е.Г.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АН Молдовы, Кишинев, Молдова,
e-mail: dega72@mail.ru

Глубинное культивирование *Lentinus edodes* – контролируемый способ синтеза грибной биомассы за короткий период времени, а также возможность использования ее в качестве сырья для получения препаратов и пищевых продуктов с лечебно-профилактическим эффектом. Исследование факторов, определяющих перспективность штаммов *L. edodes* – продуцентов биологически активных веществ открывает большие возможности для практического использования полученной биомассы. В связи с этим разработан способ получения биомассы гриба *L. edodes* CNMN-FB-01 как перспективного объекта для биотехнологических исследований.

Проведенные нами исследования и полученные результаты позволили в результате скрининга отобрать наиболее продуктивный штамм гриба *L. edodes* CNMN-FB-01, оптимизировать питательную среду (KLE-1), изучить закономерности синтеза грибной биомассы. Установлено, что активность штамма, интенсивность синтеза биомассы определяется совокупностью факторов: составом среды, биологическими особенностями штамма, соотношением водной и воздушной фазы, возрастом инокулюма, степенью его гомогенизации, наличием количества ростовых точек, скоростью вращения качалки. Максимальный выход биомассы 24,3 г/л наблюдался у штамма *L. edodes* CNMN-FB-01 через 120 ч при удельной скорости роста $0,07 \text{ ч}^{-1}$, экономическом коэффициенте 0,95 г на 1 г использованной глюкозы, при дозе инокулюма 15%, что на 6,5-7,8 г/л выше, чем на испытываемых ранее нами средах. Предлагаемый способ получения биомассы штамма *L. edodes* CNMN-FB-01 осуществляется на оптимизированной питательной среде KLE-1 в регулируемых условиях за короткий период времени.

Был изучен биохимический состав биомассы гриба *L. edodes* CNMN-FB-01, полученной на оптимизированной питательной среде – KLE-1. Исследование содержания сырого протеина и белка биомассы *L. edodes* CNMN-FB-01 на жидкой питательной среде KLE-1 позволило установить, что наиболее высокое содержание общего протеина в биомассе получено на стадии активного роста 48,4%, а истинного белка 40,3% на сухую массу (на 24-48 ч), а при снижении активности синтеза биомассы (на 72-96 ч) происходит снижение содержания общего протеина с 47,9 до 33,5%. В общей сумме аминокислот были выявлены незаменимые: лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, тирозин, треонин. Сумма незаменимых аминокислот составила 21,4 г/100 г сухой массы грибного по-

рошка. При исследовании биомассы *L. edodes* CNMN-FB-01 мы установили наличие в ней витаминов группы В: рибофлавин, пантотеновую кислоту, пиридоксин; группы РР: никотиновая кислота, из которых более высокая доля приходится на пантотеновую и никотиновую кислоты, составившие 228,4-115,4 мкг/г абсолютно сухой массы, соответственно. Установлено, что в биомассе гриба *L. edodes* CNMN-FB-01 содержание липидов было на уровне 3,3%. В биомассе исследуемого штамма *L. edodes* CNMN-FB-01 процент клетчатки составил 4,84%. Установлено, что общее содержание сахаров в лиофилизате составляет 33% на абсолютно сухой вес, а мажорным компонентом организованных (полимерных) сахаров исследуемой биомассы является манноза. Из моносахаридов в свободном виде найдены глюкоза, фруктоза и сахароспирт – маннит. В продуктах гидролиза некоторых грибных полисахаридов были обнаружены ксилоза, манноза, галактоза, рамноза и некоторые другие моносахара. Наиболее распространенным из них является глюкоза.

Биомасса *L. edodes* CNMN-FB-01, полученная в условиях глубинной культуры, является продуктом биотехнологического процесса, имеет вполне сбалансированный химический состав, белок грибной биомассы содержит все незаменимые аминокислоты, что является основным показателем его пищевой ценности.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Asatiani M.D., 24

В

Berikashvili V., 24

Bisko N.A., 154

Bushina E.V., 102

Д

Denisenko V.V., 38

Е

Elisashvili V.I., 24

И

Ivanova T.S., 154

Ј

Jokharidze T., 24

К

Kachlishvili E.T., 24

Khardziani T.Sh., 24

Kobakhidze A., 24

М

Megalinska G.P., 154

Merzlov D.A., 102

Metreveli E.M., 24

Р

Rozhkova A.M., 102

S

Safonova M.E., 38

Shashkov I.A., 102

Т

Titova L.O., 154

А

Абдурашитов С.Ф., 78

Абжалелов А.Б., 11

Абитаева Г.К., 144

Азарова Т.С., 133

Айтжанова А.А., 160

Айткельдиева А.С., 131

Айткельдиева С.А., 185

Айтуганов К.А., 185

Акимов В.Н., 177

Аккулова З.Г., 185

Алеценкова З.М., 84, 107, 129

Алимбетова А.В., 28

Алмагамбетов К.Х., 144

Амвросьева Т.В., 152

Андреева-Ковалевская Ж., 95

Антохина С.П., 107

Ануарбекова С.С., 144

Арашкова А.А., 175

Асатурова А.М., 93, 103

Ауэзова О.Н., 185

Ахрамович Т.И., 181

Б

Баганова М.Е., 133

Балгимбаева А.С., 131

Бегун С.А., 75

Бекенова Н.Е., 144

Беккаревич А.О., 80, 109

Бекмаханова Н.Е., 71

Белазарович А.В., 129

Белимов А.А., 133

Белова О.В., 95

Беловежец Л.А., 171, 173

Белых О.И., 57

Беляев А.А., 135

Бережная А.В., 16, 17

Береснев А.И., 14

Богдан В.К., 146

Болотник Е.В., 30, 156

Бордок И.В., 18

Братанова М.А., 91

Бубнова Т.В., 80, 109

Бударина Ж., 95

Булавко Г.И., 82

Бурвель Д.Д., 73

Бутовская Г.В., 168

В

Валентович Л.Н., 63, 68, 97, 175

Васильева Н.В., 158

Велчу А.И., 148

Веселкина Т.Н., 61

Ветрова А.А., 177

Винокурова Н.Г., 95

Войтка Д.В., 141

Волкогон В.В., 78

Волчатова И.В., 171

Г

Гайдук А.С., 73, 127
Галимбаева Р.Ш., 124, 131
Гаранович И.М., 84
Глушень Е.М., 54
Гниненко Ю.И., 111
Головнева Н.А., 20, 46, 137
Головченко Л.А., 129
Гончарова И.А., 175
Горбунов О.П., 86
Грель М.В., 46, 137

Д

Дворнина Е.Г., 189, 191
Дедюля К.Л., 152
Делеган Я.А., 177
Джакибаева Г.Т., 22, 28
Джамантиков Х.Д., 124
Джур С.В., 150
Долженкова Е.А., 127
Долмонего С.О., 121
Доронина Н.В., 86
Дуброва О.Н., 129
Дубяга В.М., 103

Е

Евдокимова О.В., 97, 175
Евтушенко Л.В., 18
Ежов В.А., 86
Ерошевская Л.А., 14
Ескараева А.А., 11

Ж

Жевнова Н.А., 103
Живых А.В., 89

З

Закарья К.Д., 11
Землянский В.А., 152
Зинченко А.И., 14, 26, 42
Зоров И.Н., 44

И

Ивачева М.С., 57
Игнатовец О.С., 181

К

Казловский И.С., 26, 42
Калацкая Ж.Н., 91

Капустина Ю.М., 36
Карасев С.Г., 103
Квач С.В., 14, 26, 42
Кебекбаева К.М., 28
Кирей В.А., 187
Кирияк Т.В., 150
Кирпичёва Т.Е., 30, 156
Клапко С.Ф., 189
Кодреану С.Н., 146
Кодряну С.Н., 150
Козицын А.Е., 93, 103
Коломиец Э.И., 16, 30, 97, 156
Костеневич А.А., 175
Костылева Е.В., 61
Кошелев А.В., 80, 109
Круль Л.П., 168
Кудрякова И.В., 158
Кудряшов В.Л., 179
Кузнецова Т.В., 160
Кузьмин А.В., 57
Кулиш С.А., 73, 127
Кулназаров Б.А., 160
Купцов В.Н., 118
Кухар Е.В., 33

Л

Лаблюк С.В., 189
Ламан Н.А., 91
Леляк А.А., 135
Леонтьев В.Н., 181
Леонтьевский А.А., 95, 162
Лисов А.В., 95
Литвинова Е.В., 164
Литвинович Н.Е., 30, 156
Лобанок А.Г., 36, 73
Лосева Л.П., 150
Лубянова В.М., 18
Лутфуллин М.Т., 100

М

Мазунина М.Н., 71
Макарова Л.Е., 173
Макарова Н.М., 133
Мальчевский В.А., 105
Мандрик-Литвинкович М.Н., 97
Марданова А.М., 100
Маркова Ю.А., 173
Марцунь Е.В., 181
Матыс В.Ю., 44, 109
Медведева С.А., 171
Мерзлов Д.А., 44
Михайлова Р.В., 36
Михеева Т.М., 57

Молчан О.В., 91
Мороз И.В., 36
Мочалова Н.К., 100
Мунтян В.С., 48
Муратова А.А., 52, 97

Н

Нагорный Р.К., 183
Надыкта В.Д., 103
Назарова О.М., 18
Найденко И.А., 20, 38
Нарушко М.В., 105
Наумович Н.И., 107
Немашкалов В.А., 44, 80, 109
Нефедова Л.И., 61
Новик Г.И., 40, 54, 59
Носонова Т.Л., 97

О

Оберемок В.В., 111
Окунев О.Н., 80, 109
Осипов В.А., 168
Осипов Д.О., 80
Охлопкова Н.П., 18

П

Павлов С.И., 168
Павлова М.Д., 103
Пасалари Х.М., 113
Петров С.А., 105
Плотникова Д.Т., 40
Погоржельская Н.С., 179
Поклонская Н.В., 152
Поляков В.А., 61
Прищепя Л.И., 115
Просвирыков В.В., 118
Пухальский Я.В., 133

Р

Радевич Д.С., 26, 42
Рогачев А.А., 168
Рогачев А.В., 168
Рожкова А.М., 44, 61, 109
Рубцова Е.А., 44
Рудик В.Ф., 150
Рудь Л.И., 150
Румянцева М.Л., 48
Рымко А.Н., 26, 42
Рябая Н.Е., 20, 46

С

Савич В.В., 50

Савчиц Т.Л., 129
Саданов А.К., 124, 131
Саксаганская А.С., 48
Самарцев А.А., 46
Самсонова А.С., 54, 183
Сапунова Л.И., 73, 127
Саубенова М.Г., 160
Сацункевич Н.Е., 52
Свиридов А.В., 118
Свирко Е.А., 185
Сергеева Ю.А., 121
Сергеенко Ю.А., 137
Середа А.С., 61
Сивец Г.Г., 14
Сидоренко А.В., 40, 54, 59
Сидорова Т.М., 103
Синеокий С.П., 54
Синицын А.П., 44, 61, 80, 102, 109, 123
Ситник А.А., 168
Смирнова И.А., 61
Смирнова И.Э., 124
Соколова С.В., 166
Солонин А.С., 95
Сороковикова Е.Г., 57
Стерляжникова О.В., 166
Струтинский Ф.А., 148
Субботин А.М., 105
Субботина А.Р., 48
Сузина Н.Е., 158

Т

Тамкович И.О., 73, 127
Тапальский Д.В., 168
Татаркина Л.Г., 185
Тимофеева В.А., 129
Тимошко М.А., 146, 148
Титок М.А., 16, 30, 52, 54, 66, 97, 156, 177
Тихонова И.В., 57
Томашевич Н.С., 103
Треножникова Л.П., 131
Третьякова М.С., 173
Тригубович А.М., 175
Троценко Ю.А., 86
Туртэ К.И., 189
Тюрина Ж.П., 189

У

Ултанбекова Г.Д., 131

Ф

Файзулина Э.Р., 185
Фальковская У.В., 59
Феськова Е.В., 181

Филонов А.Е., 177
Фроленков К.А., 164
Фролова Т.В., 91

Х

Хадиева Г.Ф., 100
Халымбетова А.Е., 160
Хомяк А.И., 103

Ц

Цурикова Н.В., 61

Ч

Чапурин Л.Ф., 189
Чарняўская М.І., 66
Чеботарёв Л.Ю., 63
Чекушина А.В., 44
Чепой Л.Е., 150
Черкасова М.Е., 48
Чернявская М.И., 54
Чилочи А.А., 189
Чубанова С.В., 68

Ш

Шамцяня М.М., 166

Шапошников А.И., 133
Шарейко Н.А., 127
Шарипова М.Р., 100
Шемшура О.Н., 71
Шляхотко Е.А., 73
Шорманова М.М., 160
Шпатова Т.В., 135
Штерншис М.В., 135

Щ

Щетко В.А., 20, 137

Ю

Юрков А.П., 139
Юхневич Г.Г., 187

Я

Якименко М.В., 75
Якоби Л.М., 139
Яковлев А.П., 82
Янковская Е.Н., 141
Ярмоленко М.А., 168
Ярук И.В., 129

Научное издание

**МИКРОБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

**Тезисы докладов
IX Международной научной конференции
(Минск, 7–11 сентября 2015 г.)**

Публикуются в авторской редакции

Ответственная за выпуск *А. В. Сидоренко*
Художественный редактор *Д. А. Комлев*
Компьютерная верстка *Л. Н. Валентович*
Технический редактор *О. А. Толстая*

Подписано в печать 26.08.2015. Формат 60 × 84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,11 + 0,12 вкл. Уч.-изд. л. 9,1. Тираж 150 экз. Заказ 156.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013.
Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.