

**СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»****ПОДСЕКЦИЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ»****Бактерии рода *PSEUDOMONAS* как деструкторы хлорароматических веществ*****Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Коробов В.В.****аспирант аспирант сотрудник к.б.н. сотрудник к.б.н**Институт Биологии Уфимского Научного Центра Российской Академии Наук**E-mail: tvmark@anrb.ru*

В настоящее время одним из перспективных направлений развития методов очистки техногенных экотопов являются технологии с использованием микроорганизмов. Применение микроорганизмов позволяет с достаточно высокой скоростью нейтрализовать токсиканты без образования вредных или токсичных для окружающей среды веществ.

Цель настоящей работы - выявление новых штаммов бактерий для конверсии хлорароматических соединений 2,4-D и 2,4,5-T в природе. В ходе исследований были изучены природные штаммы бактерий 39D, 36DHF, 33F, 19, выделенные из смешанных популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся долговременному действию факторов химического производства. Культуры хорошо росли в аэробных условиях. Оптимальный рост наблюдался в пределах от +22°C до +37°C в условиях pH, близких к нейтральным. Клетки ферментировали глюкозу, сахарозу, цитрат, обладали положительной оксидазной и каталазной активностью, способностью восстанавливать нитрат. Проявляли невысокую активность в отношении гидролиза желатина, не использовали в качестве источника питания крахмал. Окраска по Граму – отрицательная. Морфометрические характеристики клеток бактерий были изучены с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver Pro-M (NT-MDT Россия) в контактном режиме съемки. Клетки культур 36DHF, 33F, 19S, 39D представляли собой палочки размером 2.7-4.5 мкм X 1.15-1.55 мкм, расположенные поодиночке или попарно, клетки культуры 39D образовывали цепочки. Имелись полярно расположенные жгутики. На основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков культуры 39D 36DHF, 33F, 19S были отнесены к роду *Pseudomonas*. Исследована динамика роста штаммов в условиях использования ксенобиотиков в качестве источников углерода и энергии. Все выделенные штаммы хорошо росли на минимальной солевой среде М 9 с добавлением гербицидов 2,4-Д и 2,4,5-Т в конечной концентрации 100 мкг/мл. Штаммы снижали содержание ксенобиотиков до 70% от начальной концентрации. Полученные результаты указывают на принципиальную возможность применения новых штаммов - деструкторов для конверсии хлорфеноксиуксусных кислот 2,4-Д и 2,4,5-Т в водной среде.

Работа выполнена в рамках гранта Президиума РАН «Поддержка молодых ученых» и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

## Микробиологическое получение наночастиц металлов для катализаторов нефтехимической промышленности

Арапов К.А.<sup>1</sup>, Никитин Д.А.<sup>2</sup>, Гаврилов С.Н.

магистрант<sup>1</sup>, аспирант<sup>2</sup>

ГОУ ВПО "Российский государственный университет нефти и газа им. И.М.Губкина"

[arapov.k@gmail.com](mailto:arapov.k@gmail.com)

подавляющее большинство промышленных химических процессов, так или иначе, основано на применении катализаторов. Ключевыми характеристиками катализатора, влияющими на его активность и селективность, являются удельная поверхность гранулы и размер активных частиц. Установлено, что чем меньше размер активной частицы, тем катализатор активнее и селективнее. Существует множество примеров увеличения активности катализатора с уменьшением размера частиц его активной части. Микробиологически полученные наночастицы проявляют каталитическую активность и обладают высокой упорядоченностью и регулярностью. Так, например, биогенный диоксид марганца, получаемый с помощью бактерии *Leptothrix discophora* [1], является очень активным окислителем органических соединений; его активность в несколько раз превышает активность хемогенного аналога. Нами разрабатывается технология микробиологического получения нанокластеров металлов размером 5 – 100 нм, обладающих каталитическими свойствами. Размер частиц, получаемых биотехнологическим способом, можно контролировать, если известен механизм биокаталитического процесса, осуществляемого прокариотными микроорганизмами, например, железоредукторами, использующими в качестве акцептора электронов для роста нерастворимые соединения железа(III), что приводит к образованию, как правило, нерастворимых форм Fe(II). Термофильный железоредуктор *Carboxydotherrmus ferrireducens* осуществляет восстановление аморфно-кристаллического оксида Fe(III) (ферригидрита) в смешанный оксид Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, который превосходит свой синтетический аналог по активности и селективности в реакции паровой конверсии монооксида углерода. Была установлена возможность получения наночастиц как в свободном виде (в культуральной жидкости), так и внутри пор носителя, что в перспективе значительно облегчает процесс нанесения активной части катализатора на носитель. В качестве носителя применялись гранулы силикагеля с диаметром пор 5-20 нм и гранулы  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с размером пор до 100 нм. Гранулы, предварительно пропитанные раствором FeCl<sub>3</sub>, титровали раствором NaOH для образования ферригидрита внутри пор носителя. Подготовленные таким образом гранулы вносили в питательную среду, которую инокулировали *Carboxydotherrmus ferrireducens*. В результате последующего инкубирования были получены гранулы с восстановленной формой железа. В дальнейшей работе будет изучена корреляция условий процесса и структуры образующихся частиц, что представляет огромный интерес, так как открывает пути для целенаправленного биокаталитического синтеза наночастиц (нанокластеров) металлов. Свойства катализаторов будут испытаны в рамках модельных реакций Фишера – Тропша и паровой конверсии монооксида углерода. Предполагается исследовать процессы микробного восстановления соединений железа, кобальта, хрома, марганца, ванадия, золота, палладия с целью оптимизации условий для максимального выхода фракции кристаллов размерами 5-100 нм.

### Литература:

1. Y.M. Nelson, L.W. Lion, W.C. Ghiorse, M.L. Shuler. Production of Biogenic Mn Oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a Chemically Defined Growth Medium and Evaluation of Their Pb Adsorption Characteristics//Appl.Environ.Microbiol., 1999, 65, 1, 175-180.

**Бактерицидный эффект КrСl-эксилампы****Астахова С. А., Матафонова Г. Г.**

Ведущий инженер, научный сотрудник, к.б.н

Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия

sastakhova@binm.bscnet.ru

Известно, что современная водоподготовка требует внедрения высокоэффективных безреагентных методов обеззараживания и очистки. В этой связи представляется целесообразной разработка и внедрение в практику водоподготовки метода обеззараживания воды ультрафиолетовым излучением (УФ-излучением), принципиальной особенностью которого является отсутствие вредного влияния на физико-химические и органолептические показатели воды [1]. Обеззараживающий эффект УФ-излучения обусловлен, главным образом, фотохимическими реакциями, в результате которых происходят необратимые повреждения ДНК, клеточных мембран и органелл, что вызывает, в конечном итоге, гибель клетки [2]. В последнее время в качестве источников бактерицидного УФ-излучения особый интерес представляют эксилампы, излучающие за счет распада эксимерных и эксиплексных молекул. Основное их достоинство заключается в том, что до 80% и более общей мощности излучения сосредоточено в относительно узкой полосе (не более 10 нм на полувысоте) соответствующей возбужденной молекулы [3].

В качестве источника УФ-излучения нами использовалась эксилампа барьерного разряда на молекулах КrСl (222 нм). Бактериальная суспензия облучалась при перемешивании в фотокувете, расположенной под выходным окном эксилампы. В качестве тест-организма использовали грамотрицательную бактерию *Escherichia coli*, которая является возбудителем острых кишечных заболеваний. Исходная численность клеток в облучаемых суспензиях варьировала от  $10^2$  до  $10^7$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл. Установлено, что вегетативные клетки *E. coli* в водной среде являются очень чувствительными к воздействию УФ-излучения эксилампы. Так, при исходной численности  $10^2$ – $10^6$  КОЕ/мл полная инактивация *E. coli* достигалась уже после 10–30 сек облучения, что соответствует дозе облучения 30–58,5 мДж/см<sup>2</sup>. При более высокой исходной численности клеток *E. coli* ( $10^7$  КОЕ/мл) скорость инактивации заметно снизилась. Это обусловлено, на наш взгляд, эффектом экранирования. Полагаем, что данный эффект обусловлен рассеянием света на микробных клетках, имеющих размеры, сопоставимые с длиной волны. Тем не менее, доза УФ-излучения 117 мДж/см<sup>2</sup> (60 сек) обеспечивала снижение численности на 5 порядков, что соответствует эффективности обеззараживания 99.9%. Установлен выраженный бактерицидный эффект УФ-излучения КrСl эксилампы в отношении водных суспензий *E. coli* при исходной численности клеток  $10^2$ – $10^7$  КОЕ/мл.

**Литература**

1. Ахмадеев В.В., Волков С.В., Костюченко С.В. Применения метода УФ облучения для обеззараживания сточных вод // Вода и экология. - 2000. - №2. – с. 45 – 56.
2. Litter M.I. Introduction to photochemical advanced oxidation processes for water treatment // Handbook of Environmental Chemistry. - 2005, Vol. 2, Part M. - pp. 325–366.
3. Sosnin E.A., Oppenländer T., Tarasenko F.V. Applications of capacitive and barrier discharge excilamps in photoscience // Journal of Photochem. Photobiol. - 2006. - № 7. – pp. 145–163.

## Микробиологический анализ воды канала им. Москвы

**Боброва Дина Валерьевна**

студент

«Астраханский государственный технический университет» Дмитровский филиал п.

Рыбное, Московская область, Россия

*bobrovs85@mail.ru*

Использовали метод посевов воды из канала на питательные среды МПА, эритрит – агар и среду Эндо. Определяли общее микробное число (ОМЧ), количество сапрофитных бактерий, наличие энтеробактерий, аэромонад и неферментирующих щелочеобразователей, изучали их видовую принадлежность и биологические свойства. Общую численность бактерий определяли прямым методом по А. С. Разумову на ультрафильтрах.

Общая численность бактерий в воде канала в июне составила 2,38 млн. кл./мл, в июле – 2,38 млн. кл./мл, в сентябре – 1,87 млн. кл./мл. Четкой картины пространственной динамики численности бактерий в канале не прослеживается. Численность сапрофитных (гетеротрофных) бактерий не превышала 1 тыс. кл./мл. По общей численности бактерий вода в канале по классу качества воды занимает промежуточное положение между удовлетворительно чистой и слабо загрязненной. По численности сапрофитных бактерий вода относится к классу чистой (Жукинский и др., 1981). В то же время по показателю отношения общей численности бактериопланктона к числу сапрофитов. ( $1 \cdot 10^3$  -  $6 \cdot 10^3$ ) вода в канале в 2007г. отнесена к классу умеренно загрязненной (СанПиН, 1996). В июле и сентябре были выделены *Escherichia coli*, *Aeromonas veronii*, *A. caviae*, *Aeromonas sp.*, *Proteus vulgaris*, а также *Moraxella sp.*, *A. schubertii*, *A. sobria*, относящиеся к цитохромоксидазоположительным, и *Acinetobacter baumannii*, *Ac. calcoaceticus*, являющиеся цитохромоксидазоотрицательными. Аэромонады, акинетобактеры и моракселлы оказались слабовирулентными. Учет относительной численности бактерий группы кишечной палочки (БГКП) показал некоторое снижение их содержания в микробиоценозе воды в сентябре, по сравнению с июлем 2007г., что можно объяснить снижением температуры воды и уменьшением антропогенного пресса. Таким образом, в целом, санитарно-микробиологическое состояние воды канала им. Москвы можно оценить как удовлетворительное.

### Литература

1. Жукинский В.Н., Оксюк О.П., Олейник Г.Н., Кошелева С.И. Принципы и опыт построения экологической классификации качества поверхностных вод суши. // Гидробиол. журн. 1981. 17, № 2. С. 38-39.
2. Требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников. Санитарные правила (СанПиН 2.1.4.544-96). М.: Информ.- изд.центр Госкомсанэпиднадзора России. 1996.-26 с.

**Мониторинг почвенных бактерий в двадцатикилометровой зоне****Армянской атомной электростанции (ААЭС)**

**Бозоян Лусине Азатовна<sup>\*</sup>, Маргарян Армине Арменовна, Паносян Овик Арутюнович,  
Попов Юрий Георгиевич**

<sup>\*</sup> студентка 4-ого курса

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

E-mail: [lusin357@yahoo.fr](mailto:lusin357@yahoo.fr)

Вследствие развития атомных технологий, в частности, работы атомных электростанций, все более актуальной становится проблема биологического влияния ионизирующих излучений. Благодаря высокой скорости размножения в почве бактерии представляются удобной моделью для оценки экологических последствий длительного радиационного воздействия на биоту. С другой стороны, изыскание новых радиорезистентных микробных сообществ, обладающих высоким катаболическим потенциалом, открывает новые перспективы для очистки и утилизации радиоактивных отходов, что является одной из актуальных задач экологической микробиологии и биотехнологии.

Целью настоящей работы было изучение количественного и качественного состава почвенных микроорганизмов в 20-километровой зоне ААЭС и выделение бактериальных культур, проявляющих высокую устойчивость к перекиси водорода, действие которой в известной степени имитирует действие ионизирующего излучения. Объектами изучения послужили образцы необрабатываемых и неорошаемых, преимущественно бурых полупустынных почв, отобранных в осенний период с территорий, равноудаленных от ААЭС, с учетом розы ветров. Контрольные пробы брались из участков, расположенных на расстоянии 45-50 км от ААЭС.

Численность целлюлозоразрушающих ( $10^2$  КОЕ/г), азотфиксирующих ( $3,2 \times 10^2$  КОЕ/г), нитрифицирующих ( $1,2 \times 10^2$  КОЕ/г) и растущих на МПА аэробных хемоорганотрофных микроорганизмов ( $2,3 \times 10^7$  КОЕ/г) в образцах, взятых с различных точек мониторинга, как с наветренной, так и с подветренной сторон, практически не отличалась от численности микроорганизмов контрольных участков. Основная группа аэробных хемоорганотрофов представлена спорообразующими бактериями ( $1,6 \times 10^7$  КОЕ/г или 70%) рода *Bacillus*. Изучение выживаемости ряда изолированных культур из разных физиологических групп бактерий после экспозиции от 15 мин. до нескольких часов с перекисью водорода (0,1 М; 0,3 М и 1,0 М конечной концентрации при 20 °С,) показало, что наиболее устойчивыми являются бациллы. Представители других групп характеризовались чувствительностью к действию перекиси водорода (0,3-1,0 М). Некоторые штаммы, изолированные из 10-километровой зоны ААЭС, имели высокий уровень устойчивости к перекиси, что, возможно, связано с радиостимуляцией, а некоторые – тот же уровень, что и штаммы, изолированные из контрольных почв. Одним из известных механизмов, обеспечивающих выживаемость бацилл (помимо механизмов репарации поврежденной ДНК), является их высокая каталазная активность, хотя не исключаются и другие эффективные механизмы нейтрализации активных форм кислорода.

Работы по идентификации изолированных культур бацилл и по изучению механизмов их устойчивости к перекиси водорода продолжаются.

### Обнаружение гомосеринлактона в культуре *Lactobacillus plantarum*

**О.В. Бушманова, А.Б. Маргулис, А.В. Гарусов, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская**

*Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина*

Серьёзной проблемой клинической практики является широкое распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. Особенную трудность представляет повышенная лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках, для формирования которых бактерии часто используют реакции кворум-сенсинга. Микроорганизмы обладают специфической системой регуляции роста и развития, включающей определённые биохимические механизмы, связанные с накоплением и физиологической активностью ауторегуляторных молекул. Низкомолекулярные химические вещества, относящиеся к классу ацильных производных лактона гомосерина, выступают в роли диффундирующих химических факторов коммуникации – плотностных ауторегуляторов и используются в межвидовых взаимодействиях в качестве сигнальных агентов, индуцирующих экспрессию ряда генов. Например, синтез плантарицина у *Lactobacillus plantarum*, находится под контролем системы кворум-сенсинга. Данный бактериоцин ингибирует рост многих видов грамположительных микроорганизмов, в том числе и патогенных, создавая поры в цитоплазматической мембране и тем самым нарушая ее проницаемость, что обеспечивает конкурентное выживание продуцента. Таким образом, изучение влияния ауторегуляторных молекул, сопрягающих изменение условий окружающей среды с внутриклеточными реакциями, на физиологическую активность клеток микроорганизмов, особенно патогенных, представляет несомненный интерес. Вследствие вышеизложенного, целью нашей работы было экспериментальное обнаружение гомосеринлактона и/или его производных в культуре *Lactobacillus plantarum*.

С помощью методов газовой хроматографии была исследована культуральная жидкость *Lactobacillus plantarum*. Культуру микроорганизмов инкубировали в течение 3 недель при температуре 37<sup>0</sup>С. В ходе эксперимента были обнаружены N-бутирил-LD-гомосеринлактон в концентрации 0.30359 мг/мл и N-гексаноил-LD-гомосеринлактон в концентрации 0.02919 мг/мл. Полученные данные позволяют нам заключить, что *Lactobacillus plantarum* действительно синтезируют производные сигнальной молекулы гомосеринлактона, которые, по всей вероятности, являются агентами химической коммуникации лактобацилл в реакциях кворум-сенсинга.

**Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Enterococcus*****Ковалева Елена Николаевна, Золотухин Сергей Николаевич**

аспирант; д.б.н., профессор

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии  
Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, Ульяновск, РоссияE-mail: [elkov@pochta.ru](mailto:elkov@pochta.ru)

Всесторонние исследования по изучению бактериофагов, выполненные за последние 40-45 лет, позволили широко использовать их для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, биохимии, иммунологии, радиобиологии и биотехнологии. Поэтому учение о фагах, развивавшееся вначале как узкая область медицинской и ветеринарной микробиологии, в настоящее время приобрело общебиологическое значение.

Ввиду отсутствия в нашей стране стандартных наборов фагов, активных в отношении бактерий рода *Enterococcus*, нами была проведена работа по их выделению, селекции и изучению биологических свойств.

Объектами исследования были сточные воды животноводческих и бытовых помещений, фекалии больных животных, патологический материал от больных и погибших животных. В качестве индикаторных культур при выделении штаммов фагов использовали штаммы «Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» *Enterococcus faecalis*: № 189, № 13, № 345, «Константиновский», «Соколово».

Выделение, селекцию и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Адамс, Д.М. Гольдфарбом. С целью получения чистых линий фагов и повышения их литической активности проводили селекцию клонов бактериофагов методом пассирования выделенных изолятов на индикаторных культурах с периодическим клонированием типичных негативных колоний до получения их однородной популяции. Морфологию негативных колоний фагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Литическую активность фагов определяли методами Грациа и Аппельмана. Диапазон литической активности и специфичность селекционированных фагов изучали методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур.

В результате проведенных исследований выделено и селекционировано 7 штаммов бактериофагов. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, имели схожую морфологию: колонии округлой формы с ровными краями, в диаметре от 1,5 до 2,5 мм, прозрачные, без вторичного роста и зоны неполного лизиса. Литическая активность составляла от  $10^{-9}$  до  $10^{-10}$  по методу Аппельмана и от  $4 \times 10^9$  до  $2 \times 10^{10}$  по методу Грациа. Бактериофаги обладали выраженной специфичностью к бактериям рода *Enterococcus* и проявляли себя не активными в отношении бактерий гетерологичных родов. Выделенные и селекционированные нами энтерококковые бактериофаги являлись термолабильными и хлороформостойчивыми. Они инактивировались при температуре 60 – 62°C в течение 30 мин., хотя бактерии-хозяева рода *Enterococcus* сохраняли жизнеспособность при температуре 60 – 62°C в течение часа.

Таким образом, выделены и селекционированы специфические фаги, лизирующие патогенные для животных и человека бактерии рода *Enterococcus*, и изучены их основные биологические свойства. Изоляты фагов, обладающие стабильно высоким титром и наиболее широким диапазоном совместного действия, отобраны нами для дальнейшего изучения. Полученные данные позволяют использовать их для индикации и идентификации гомологичных бактерий.

## Температурный коэффициент роста углеводородокисляющих микроорганизмов

*О.В. Корнеева, А.И. Фахрутдинов*

*ГОУ ВПО Сургутский государственный университет ХМАО, г. Сургут, Россия*

*E-mail: fahrutdinov\_a\_i@mail.ru*

Восстановление нефтезагрязненных почв и водоемов опирается на биологические технологии с применением бактериальных культур. Скорость деструкции загрязнителя зависит от экологических факторов, в том числе от температуры зоны применения.

Рост — основная функция микроорганизмов, подвергающаяся воздействию температуры, причем темп размножения микроорганизмов определяется удельной скоростью роста. Средняя удельная скорость роста за определенный промежуток ( $t_1$ — $t_2$ ) вычисляется по общеизвестной формуле

$$K = \frac{2,303(\log m_1 - \log m_2)}{t_1 - t_2},$$

где  $m_2$  и  $m_1$  — начальная и конечная массы клеток.

Этот показатель важен для микроорганизмов и может являться фактором экологического доминирования в местообитаниях с низкими температурами.

Температурный коэффициент роста ( $Q_{10}$ ). Температурный коэффициент процесса  $Q_{10}$  определяется как отношение скоростей при одной температуре и при другой, на  $10^\circ$  ниже первой, т. е.  $Q_{10} = K_{t+10}/K_t$ . Для функции роста он может быть вычислен в любом интервале температур ( $\Delta T$ ) по следующей формуле

$$Q_{10} = \sqrt[\Delta T]{\frac{(K_2)^{10}}{(K_1)^{10}}} = \frac{(K_2)^{\frac{10}{\Delta T}}}{(K_1)^{\frac{10}{\Delta T}}},$$

где  $K_1$  и  $K_2$  — коэффициенты скорости роста при температурах, отличающихся на  $10^\circ$  (Rosef 1962; Elliott, Michener, 1965). Зависимость скорости биологических реакций от температуры делает этот показатель удобной мерой для сравнения различных микроорганизмов по степени устойчивости скорости роста к ее снижению.

Для выяснения динамики этих показателей был проведен лабораторный эксперимент с целью оценки скорости деструкции нефтяного загрязнителя и активности микробных культур препарата «Деворойл».

В чашки Петри со стерильным песком вносили нефтяной загрязнитель, бактериальный препарат «Деворойл». Оценивались активность углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), остаточный уровень углеводов. Культивирование проводили при температурах  $+24$ ,  $+14$  и  $+4$   $^\circ\text{C}$ . На основании полученных результатов рассчитывался температурный коэффициент роста.

Высокий уровень адаптации микроорганизмов препарата подтвержден данными таблицы 1, где видно, что снижение температуры культивирования обеспечивает сохранность уровня жизнедеятельности без учета токсического действия нефтяных компонентов.

Таблица 1

Изменение температурного коэффициента роста УОМ препарата «Деворойл»

Время, часы	0	1	2	3	7	12	24	76
$Q_{10}(24^\circ-14^\circ)$	0	2,1	2,6	5,9	9,4	8,7	3,1	2,6
$Q_{10}(14^\circ-4^\circ)$	0	1,1	1,8	4,1	11,9	12,6	5,2	4,3

Использование данного показателя позволяет выявить наиболее эффективные препараты УОМ и технологии восстановления компонентов окружающей среды в жестких природных условиях Крайнего Севера, что является неотъемлемым для совершенствования экологических технологий.

**Эковариантные отличия ауксотрофных мутантов *Escherichia coli*****Корнилова Екатерина Андреевна**

студент

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

E-mail: [microbiog@mail.ru](mailto:microbiog@mail.ru)

Ауксотрофность, в большинстве случаев, является следствием действия точечных мутаций, нарушающих экспрессию генов, ответственных за биосинтетические процессы. В результате мутанты утрачивают способность к синтезу конкретного фермента, участвующего в биосинтезе. Для роста такому организму необходимо наличие конечного продукта того пути биосинтеза, который был блокирован из-за утраты функции фермента. Кроме того, ауксотрофные мутанты способны расти не только в присутствии конечного продукта, но и промежуточных метаболитов, образующихся в результате реакций между заблокированным этапом и конечным продуктом. Это важно в микробных сообществах, поскольку объясняет выживание организмов с летальными мутациями. По данным Reimers и Schmidt (2004), ауксотрофность по аргинину и лейцину у *Escherichia coli* влияет на скорость синтеза мРНК и мутирования. Mariganti и Imlay (1999) выявили, что мутанты *E. coli*, не способные синтезировать серосодержащие, разветвленные и ароматические аминокислоты, не имеют цитоплазматической SOD и не используют несбраживаемые источники углерода. Таким образом, способность синтезировать аминокислоты является важной характеристикой и взаимосвязана с биосинтетическими, защитными, адаптационными и другими процессами.

С целью анализа ауксотрофности *E. coli* по 22 аминокислотам исследовано 165 изолятов из 7 источников, отличающихся селективными и дисгенетическими факторами среды. Учитывая полигастальность и убиквитарность объекта, источниками служили водопроводная вода, поверхностные водоемы и кишечник здоровых людей (опыт), центральная часть Онежского озера (контроль). Для количественной характеристики ауксотрофности использовали полиауксотрофность (ПА) – ауксотрофность по 5 и более аминокислотам и маркер ауксотрофности (МА) – (количество аминокислот, в которых нуждается тестируемый штамм). Данные обрабатывали методами вариационной статистики и рассчитывали индексы генного разнообразия.

В эксперименте выявлены достоверные отличия эшерихий по ПА и МА, что, по-видимому, связано с источниками их изоляции. По всем аминокислотам обнаружены ауксотрофные линии по 5 и более аминокислотам, что свидетельствует о высоком проценте ПА изолятов. Выделены также варианты, нуждающиеся сразу во всех 22 аминокислотах, но их максимальное количество не превышало 16% и в среднем составляло 5%.

Автор выражает благодарность доценту, к.б.н. Сидоровой Н.А. за помощь в подготовке тезисов.

**Литература**

1. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высшая школа, 1989. – 439 с.
2. Олескин А.В., И.В. Ботвинко, Е.А. Цавкелова Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов // Микробиология, 2000. - Т.69. - С.309-327.
3. Mariganti Sujatha, Imlay Janus A. Внутриклеточный хелатор железа плейотропно супрессирует ферментативные и ростовые дефекты *Escherichia coli*, дефектной по SOD//J. Bacteriol., 1999. – 181, №12. –h. 3792-3802.
4. Reimers Jacquiline M., Schmidt Karen H. Повышение скорости транскрипции коррелирует с повышенными скоростями реверсии в ауксотрофах *leuB* и *argH* *Escherichia coli* // Microbiology, 2004. – 150, №5. – h. 1457-1466.

## Колонизация растений микроорганизмами из почвы

Т.Ю.Кузьменко, Л.П.Быкова, А.П.Годовалов

студентка, кандидат медицинских наук, доцент, врач-бактериолог

Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е. А. Вагнера, Пермь  
t\_kuzmenko@mail.ru

С хозяйственно-бытовыми отходами в почву поступает громадное количество разнообразных микроорганизмов. Они способны сохраняться в течение нескольких недель и месяцев. В связи с этим почва и растения, культивируемые на ней, могут быть факторами передачи инфекционных заболеваний. Однако до настоящего времени недостаточно изучено, является ли микробное загрязнение растений только поверхностным. Корневые волоски всасывают воду, минеральные вещества, которые затем по корню передвигаются в стебель.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение возможности распространения микроорганизмов по капиллярам растений. Материалом для исследования служили всходы зеленых растений - листья салата, зелень кориандра, щавель, сельдерей. Использована почва для рассады, тестовая культура *E.coli* M17. Бактериологическое исследование проводилось с использованием среды Эндо.

В ходе исследования проводились посеы семян растений. С момента появления всходов половину посевов поливали суспензией *E.coli*. Спустя 7 сут. отделяли наземную часть растений (стебель и листья) и готовили смывы стерильным физиологическим раствором, а также кашицу из растения. Материал смывов и кашицы опытных и контрольных растений засеивался на среду Эндо для определения *E.coli*. В ходе исследований было установлено, что содержание *E.coli* в смывах с сельдерея составляет  $3 \times 10^3$  КОЕ/мл. В смывах с листьев сельдерея, который поливали стерильным физиологическим раствором, роста *E.coli* не было выявлено. При посеве размельченных и растертых листьев сельдерея, который поливали суспензией *E.coli*, было обнаружено  $10^2$  КОЕ/мл, а при анализе растертых частей сельдерея, который поливали физиологическим раствором, *E.coli* обнаружено не было.

Содержание *E.coli* в смывах кориандра составило  $2,6 \times 10^3$  КОЕ/мл, а с листьев кориандра, который поливали стерильным физиологическим раствором, -  $0,2 \times 10^3$  КОЕ/мл. При посеве размельченных и растертых листьев кориандра, который поливали суспензией *E.coli*, обнаружено  $4,3 \times 10^3$  КОЕ/мл, а в растертых частях кориандра, который поливали физиологическим раствором, бактерий не обнаружено.

Содержание *E.coli* на листьях салата «Азарт» составило  $3,5 \times 10^3$  КОЕ/мл, а с листьев салата, который поливали стерильным физиологическим раствором, роста не обнаружено. При посеве размельченных и растертых листьев салата «Азарт», который поливали суспензией *E.coli*, обнаружено  $4,0 \times 10^3$  КОЕ/мл, а в растертых частях салата, который поливали физиологическим раствором, бактерий не выявлено.

В смывах с листьев щавеля, политого суспензией *E.coli* и физиологическим раствором, *E.coli*, как и в растертых частях растения, выявлено не было.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в процессе роста растений может происходить их колонизация микроорганизмами из почвы, т. е. растения могут быть резервуаром условно-патогенных, а возможно, и патогенных микроорганизмов.

**Микробиологическая очистка нефтезагрязненных почв Атырауской области****Кулжанова Камшат Арыстановна, Туякбаева Акмарал Усерхановна,****Чукпарова Айгуль Ултараконна, Шорабаев Ерик Жарылкасынович***научный сотрудник, аспирант, ведущий научный сотрудник, зав. лаборатории**РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан», Астана, Казахстан**E-mail: ecolab@biocenter.kz*

Нефть представляет собой один из основных источников энергии и сырья для современной цивилизации, единственным экономически оправданным способом получения нефтепродуктов является разработка природных месторождений. Разработка нефтяных и газовых месторождений, бесспорно, является важным звеном народно-хозяйственного комплекса многих развитых стран, в том числе и Казахстана. Во всех регионах Казахстана установлены нефтегазопроявления, почти 62% территории Казахстана можно отнести к нефтегазоносным. По объему разведанных запасов нефти Казахстан занимает 12-е, по нефтедобыче - 18-е место в мире. Наибольшее скопление нефтяных месторождений Республики приходится на Атыраускую область, на территории которой целый ряд нефтепромыслов расположен по Каспийскому побережью. Наряду с добычей и транспортировкой нефти и газа отмечается тенденция к повышенному загрязнению окружающей среды отходами нефтедобывающей промышленности. Так, если общая площадь региона составляет 906,6 тыс. км<sup>2</sup>, то из них 194 тыс. га загрязнено нефтью [1]. Нефтяные загрязнения вызывают долговременный количественный и качественный сдвиг экосистемы почвы и, в частности, микрофлоры, выражающийся в изменении структуры микробсообществ и интенсивности биохимических процессов [2]. Загрязненная нефтью и нефтепродуктами почва становится непригодной для использования, и восстановить такую почву можно только путем ее обработки. Наиболее безопасным и экологически безвредным является микробиологический способ восстановления нефтезагрязненных почв. Микробиологический способ очистки нефтезагрязненных почв применен нами в Атырауской области на территории месторождения Жанаталап, находящегося в разработке НГДУ «Жаикмунайгаз» филиала «Эмбаунайгаз» РД «Казмунайгаза». В 2006 году нами был проведен эксперимент на нефтезагрязненном участке в 518 м<sup>2</sup>. Содержание нефти в почве до начала очистки составило 32,6 г/кг. Проведение агротехнических мероприятий и внесение пастообразного биопрепарата, разработанного нами на основе нефтеокисляющих микроорганизмов родов *Bacillus* и *Micrococcus*, оказало существенную роль в очистке почвы от нефти. Так, если в почве контрольного участка за полтора месяца произошло снижение содержания нефтяных углеводородов на 35,3%, то в почве опытного участка - на 90,4%. Химический анализ нефтяных углеводородов показал снижение за восемь месяцев содержания нефти в почве опытного участка на 94,3%, тогда как в почве контрольного участка - всего на 48,2%. В 2007 г. мы повторно заложили экспериментальный участок в 608 м<sup>2</sup>, содержание нефти в почве в начале эксперимента составило 20 г/кг. При этом нужно отметить, что биопрепарат вносили в сухом виде, предварительно разбавив его водой. Через два месяца деструкция нефтяных углеводородов на опытном участке составила 62,3%, тогда как в почве контрольного участка содержание нефтяных углеводородов снизилось всего лишь на 5,3%. Таким образом, очистка нефтезагрязненной почвы с применением агротехнических мероприятий и биопрепарата на основе углеводородокисляющих микроорганизмов родов *Bacillus* и *Micrococcus*, способных к деградации углеводородов нефти, оказалась высокоэффективной в условиях Атырауской области.

**Литература**

1. Надиров Н. К. (1995) Нефть и газ Казахстана. – Алматы. Ч. 1. - 400 с.
2. Трофимов С.Я. (2006) Рекультивация и инвентаризация загрязненных земель // Современные технологии и оборудование. № 3. – С. 56-59.

**Изучение условий совместного культивирования*****Sinorhizobium meliloti* S3 и *Bacillus* sp.7****Ланцевич Анастасия Александровна**

аспирант

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, ул. Купревича 2

ar7nica@mail.ru

Получение двухкомпонентных инокулянтов, состоящих из diaзотрофных и фосфатмобилизующих бактерий, является актуальным в связи с наблюдающейся в развитых странах тенденцией экологизации сельскохозяйственного производства. Использование микробных ростостимулирующих препаратов может обеспечить повышение продуктивности растениеводства и получение экологически чистой продукции на фоне снижения материальных затрат на минеральные удобрения.

Цель настоящей работы состояла в выделении эффективных штаммов клубеньковых бактерий и изучении их совместного культивирования с фосфатмобилизующими штаммами. Объектами исследования являлись штаммы клубеньковых бактерий люцерны посевной *Sinorhizobium meliloti* S3 и *S. meliloti* S5; штамм фосфатмобилизующей бактерии *Bacillus* sp.7; люцерна посевная (*Medicago sativa*) сорта “Будучыня”. Для выделения чистых культур клубеньковых бактерий отбирались растения *M. sativa* с крупными розовыми клубеньками на корнях, из которых было выделено 75 изолятов бактерий. Селекцию выделенных штаммов проводили по вирулентной и нодулирующей способности, азотфиксирующей активности в условиях микровегетационного опыта. Были отобраны два изолята № 3 и № 5, способных образовывать розовые клубеньки среднего размера и обладающие высокой азотфиксирующей активностью, изучение морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств которых подтвердило их принадлежность к *Sinorhizobium meliloti*. Были исследованы особенности роста чистых культур *S. meliloti* S3 и S5 на бобовой среде в условиях периодического культивирования. Выход в стационарную фазу роста у обоих штаммов наблюдался к 72 часам, при этом титры клеток достигали  $1,9 \cdot 10^{10}$  и  $2,49 \cdot 10^9$  КОЕ/мл у штаммов №3 и №5, соответственно. Оптическая плотность культуральной жидкости увеличивалась от 0,3 до 1,4. Штамм №3 характеризовался наиболее высокой удельной скоростью роста -  $0,92 \text{ час}^{-1}$ . В процессе культивирования отобранных штаммов происходило подкисление питательной среды, показатель pH снижался с 7,2 до 6,7. Для изучения параметров роста был поставлен модельный эксперимент по совместному культивированию ризобияльного и фосфатмобилизующего штаммов. Культивирование проводили в периодических условиях на лабораторной качалке при 180 об/мин. на бобовой среде при комнатной температуре. Не было выявлено антагонистических отношений между штаммами *S. meliloti* № 3 и *Bacillus* sp № 7. Обе бактериальные культуры развивались параллельно и к 48 часам достигали стационарной фазы роста. При внесении клубеньковых и фосфатмобилизующих бактерий в среду культивирования в соотношении 1:1 (объем посевного материала по 5%) титр клеток *S. meliloti* № 3 и *Bacillus* sp № 7 составлял  $7,08 \cdot 10^9$  и  $1,0 \cdot 10^8$ , соответственно, а при соотношении 1:2 -  $6,92 \cdot 10^8$  и  $8,32 \cdot 10^8$ , соответственно. Исследованные штаммы перспективны для создания бинарного микробного препарата, улучшающего азотное и фосфорное питание, стимулирующего рост и развитие *Medicago sativa*. Изучение особенностей совместного культивирования азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий является необходимым этапом в создании микробных препаратов, обеспечивающих повышение продуктивности люцерны посевной, играющей важную роль в кормопроизводстве.

**Разработка высокопродуктивных кратких процессов погруженного культивирования базидиальных грибов *Hypsizygos ulmarius* и *Flammulina velutipes* и противоопухолевые свойства получаемой биомассы**

**Леонтьева Мария Ильинична**

Младший научный сотрудник

ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

[mleonteva@yandex.ru](mailto:mleonteva@yandex.ru)

Многочисленные исследования доказали, что базидиальные грибы являются перспективными продуцентами биологически активных метаболитов. Особое внимание привлекают полисахариды грибов в связи с их широким спектром действия, в том числе иммуномодулирующим и противоопухолевым. Погруженное культивирование базидиомицетов позволяет получать биологически активную биомассу грибов с высоким содержанием целевых метаболитов, в частности полисахаридов, в краткие сроки. Целью настоящего исследования была разработка высокопродуктивных кратких процессов погруженного культивирования базидиальных ксилотрофных грибов *Hypsizygos ulmarius* и *Flammulina velutipes* для получения мицелия, обладающего высокой противоопухолевой активностью. В работе использовали культуры *H. ulmarius* и *F. velutipes* коллекции лаборатории биосинтеза биологически активных соединений ГУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН. Создание кратких высокопродуктивных способов погруженного культивирования *H. ulmarius* и *F. velutipes* начали с разработки состава эффективных питательных сред. Для этого на основе изучения пищевых потребностей исследуемых культур проводили качественный подбор источников питания, далее осуществляли оптимизацию количественного содержания ингредиентов сред с использованием методов математического планирования эксперимента, а именно метода полного факторного эксперимента и метода крутого восхождения (Максимов, 1980). Предложенные биотехнологические способы погруженного культивирования *H. ulmarius* и *F. velutipes* включали такие параметры, как исходный рН питательных сред, условия аэрации и перемешивания, температурный режим, длительность процесса. Использование разработанных способов погруженного культивирования позволило стабильно получать 35-38 г воздушно-сухой биомассы (содержание воды 5%) *H. ulmarius* в 1 л культуральной жидкости за 3 сут. процесса и 35-39 г воздушно-сухой биомассы *F. velutipes* в 1 л культуральной жидкости за 5 сут. Максимальный объем биореактора, в котором проводили культивирование базидиомицетов, составил 1 м<sup>3</sup>. Содержание водорастворимых полисахаридов в погруженной биомассе исследуемых культур превышало 20%. Исследование моносахаридного состава водорастворимых полисахаридов, проведенное в ИОХ РАН, показало присутствие в них глюкозы, галактозы, маннозы, ксилозы, арабинозы и рамнозы. Опытные партии погруженной биомассы *H. ulmarius* и *F. velutipes* были использованы для изучения противоопухолевой активности. Исследовали препараты сухой измельченной биомассы грибов, водные экстракты мицелия и суммарные фракции водорастворимых полисахаридов мицелия *H. ulmarius* и *F. velutipes*. Противоопухолевое действие препаратов, проведенное в лаборатории фармакологии и химиотерапии ГУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН, изучали *in vivo* на взрослых самцах мышей-гибридов (C57Bl/6 × DBA/2)F<sub>1</sub> (далее BDF<sub>1</sub>) с перевиваемой солидной Т-клеточной лимфомой P388 при пероральном введении препаратов. Результаты показали, что изученные препараты обладают выраженным противоопухолевым эффектом. В частности, торможение роста опухоли под воздействием водных экстрактов погруженного мицелия *H. ulmarius* и *F. velutipes* составляло 80% и 87%.

**Биополимер на основе продуктов метаболизма бактерий *Azotobacter vinelandii*****Логинов Ярослав Олегович, Четвериков Сергей Павлович**

аспирант, с.н.с., к.б.н.

Институт биологии Уфимского Научного Центра РАН, г. Уфа, Россия

E-mail: biolab316@yandex.ru

Бактерии рода *Azotobacter* в определенных условиях способны продуцировать в среде экзополисахариды, которые могут служить энергетическим резервом клеток в условиях дефицита питательных веществ. Они также могут воздействовать на реологические свойства водных систем и образовывать гели различной плотности при малых концентрациях. Благодаря этому свойству, они применяются в пищевой, медицинской, фармацевтической отраслях промышленности, в сельском хозяйстве, а также успешно используются для повышения нефтеотдачи разработанных и обедненных пластов.

В Институте биологии Уфимского научного центра РАН был выделен и идентифицирован штамм *Azotobacter vinelandii* ИБ 1, обладающий широким спектром антагонистической активности по отношению к грибным фитопатогенам. Изучение свойств культуральной жидкости данного штамма показало наличие в ней значительного количества экзополисахарида (ЭПС). Штамм *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 запатентован в качестве продуцента экзополисахарида (Пат. РФ № 2266324).

Наибольшее количество ЭПС штамм синтезирует при выращивании на средах, содержащих в качестве источника углерода мелассу и глюкозу. Содержание полисахарида в культуральной жидкости строго зависит от условий культивирования и доходит до 25 г/л.

По химической структуре молекулы ЭПС представляет собой полиуронид с высоким содержанием ацелированной L – гулурановой кислоты, отвечающей за вязкостные свойства.

Важной особенностью продуцируемого полисахарида является его способность хорошо растворяться в высокоминерализованной воде.

Исследованы реологические характеристики модельных составов биополимера в различной концентрации с солями (хлориды, нитраты, сульфаты) щелочных и щелочноземельных металлов (калий, натрий, кальций, магний, железо, марганец) при их концентрации 50, 100, 150 г/л.

Показано, что в опытах с неразбавленным биополимером (100%) введение различных анионов по-разному сказывается на его вязкостных характеристиках. Сульфаты увеличивают вязкость биополимера при концентрации 50 г/л на 13-21 %, 100 г/л на 20-35 г/л, 150 г/л на 25-47 % (в зависимости от катиона), введение же сульфатов и хлоридов понижает вязкость биополимера, за исключением хлорида натрия. В вариантах с 20 %-ным раствором биополимера с введением солей в концентрациях 50, 100, 150 г/л увеличение его вязкости доходит, соответственно, до 5, 11, 15 % (нитраты), 14, 23, 37 % (хлориды) и до 54, 68, 82 (сульфаты).

Таким образом, полученные результаты говорят о перспективности дальнейшего использования нового штамма *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 при проведении опытно-промышленных работ для повышения нефтеотдачи.

## Комплексные микробные препараты для биоремедиации нефтезагрязненных почв

Э.М. Мамедов, И.С. Стройнов, А.И. Фахрутдинов

ГОУ ВПО Сургутский государственный университет ХМАО, г. Сургут, Россия

E-mail: fahrutdinov\_a\_i@mail.ru

Нефтяная и нефтехимическая промышленность обладают высокой экологической опасностью. Наиболее экологически чистым способом утилизации загрязнителей является применение биологических технологий, основанных на использовании микробных биопрепаратов с активной биомассой штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов (ШНМ). При этом необходимо создать условия для активной их жизнедеятельности, что возможно с применением NPK(Ca) и оптимизацией среды обитания (зоны внесения) при помощи сорбентных материалов и травяных смесей (ТС). Существует необходимость формирования комплексных биологических препаратов, обеспечивающих высокую деструкцию загрязнителей.

На основе активных природных сорбентов диатомита (ТУ 2164-003-59266087-05), древесного сорбента (ТУ 2164-001-59273176-2002) и газетной макулатуры нами созданы комплексные препараты для рекультивации нефтезагрязненных объектов. На поверхность сорбента напылен слой минеральных удобрений и мела, а затем нанесен слой ШНМ. Весь этот комплекс покрыт гидрофильной или гидрофобной оболочкой, в которую инкрустированы семена травянистых растений.

Для выяснения эффективности снижения нефтяного загрязнения был заложен полевой опыт, с площадью делянки 1 м<sup>2</sup>. В качестве углеводородного загрязнителя использовалась нефть Западно-Сургутского месторождения в количестве 60 г/кг почвы. Доза внесения комплексного препарата составила 1 кг на 1 м<sup>2</sup>.

По окончании второй недели эксперимента требуемое снижение загрязнителя в почве (50% за первые две недели) было достигнуто двумя комплексными препаратами: на древесной основе и с диатомитовым сорбентом (рис. 1).

Незначительное запаздывание отмечено при использовании препарата на макулатурной основе, что, очевидно, связано с определенной трудностью в адгезивном процессе по отношению к микроорганизмам.

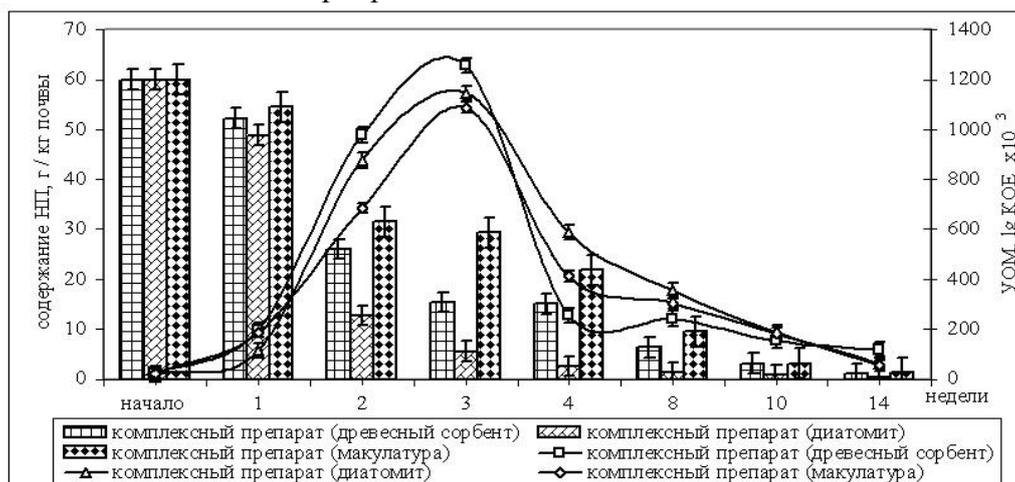


Рис. 1. Динамика изменения содержания нефтепродуктов (НП) и активности штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов (ШНМ) при использовании комплексных препаратов с различной сорбентной основой

Представленные материалы показывают высокие перспективы создания и совершенствования данных технологий рекультивации нефтезагрязненных почв и сходных с ней субстратов с учетом природно-климатических и типовых особенностей, а также уровня и характера углеводородного загрязнения.

**Микробная и ферментативная реакция почвы на загрязнение нефтью****Э.Д. Муртазина, О.М. Шабалина**

студент

ГОУ ВПО Сургутский государственный университет ХМАО, Сургут, Россия

E-mail: [\\_.elmirochka.\\_@mail.ru](mailto:_.elmirochka._@mail.ru)

Загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами приводит к изменению экологической обстановки в основных районах нефтедобычи Западной Сибири и Крайнего Севера (Справочник..., 2003; Добровольский, Никитин, 2000). Биологическая диагностика почв позволяет определить характер и степень воздействия на почвенный покров (Яковлев, 2000). Микробиологические и биохимические показатели подходят для диагностики техногенного загрязнения (Свирскене, 2003; Полянская, Звягинцев, 2005).

Целью настоящей работы было исследование динамики численности основных групп почвенных микроорганизмов и биохимических свойств дерново-подзолистой почвы после воздействия углеводородного загрязнения в период с весны до осени при загрязнении в разные месяцы сезона. Объектом исследования была дерново-подзолистая песчаная почва. На участки площадью до 2 м<sup>2</sup> вносилась сырая товарная нефть в дозе 5 л/м<sup>2</sup> в мае, июле и сентябре. Отбор образцов проводили ежемесячно и определяли численность почвенных микроорганизмов: ОМЧ, углеводородокисляющих и спорообразующих бактерий, микромицетов и дрожжей. В воздушно-сухих образцах определяли активность каталазы, инвертазы, дегидрогеназы (Методы почвенной..., 1991; Казеев, 2003; Хазиев, 2005). Для объединения различных показателей была использована методика определения *интегрального показателя биологического состояния почвы* (ИПБС), позволяющая оценить совокупность биологических показателей (Вальков и др., 1999). В результате исследований в отношении бактерий не отмечено закономерности изменения численности после загрязнения почвы в зависимости от сроков загрязнения. Наибольшая устойчивость выявлена в сентябре, благодаря высокой начальной активности микрофлоры и благоприятному температурному и водному режиму. Углеводородокисляющие микроорганизмы во всех случаях достигают наибольших значений через три месяца после загрязнения. Максимальная численность отмечена при загрязнении в июле, что связано с равномерным распределением углеводов в почве. Установлена низкая устойчивость спорообразующих бактерий к нефти и нефтепродуктам по сравнению с другими группами почвенных микроорганизмов. Почвенные дрожжи и микромицеты проявили себя наиболее чувствительной группой, что проявляется в первый месяц после загрязнения. Каталаза активна при внесении поллютанта в сентябре, в остальных случаях повышение активности наблюдается по окончании исследований. Активность инвертазы повышается как в середине лета, так и в осенний период. Это связано с выделением легких фракций нефти при благоприятном температурном режиме. Увеличение активности дегидрогеназы выше контрольных значений наблюдалось через месяц после загрязнения. Очевидно, что почвенные ферменты устойчивее к нефтяному загрязнению, чем микрофлора, за счет сорбции ферментов на почвенных агрегатах. При воздействии углеводов нефти на дерново-подзолистую почву наблюдается снижение ИПБС в зависимости от сроков загрязнения на 66, 68, и 33%, соответственно. Это показывает высокую степень негативного воздействия нефти на биологические свойства почвы. Скорость восстановления биологических свойств зависит от сезонных сроков поступления нефтяных компонентов. Чувствительность к нефтяному загрязнению бактерий, микроскопических грибов и дрожжей зависит от начального состояния почвенной микрофлоры на момент поступления загрязнителя.

### Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производства

Рафаилова Э. А.<sup>1</sup>, Тухбатова Р.И.<sup>2</sup>, Тазетдинова Д.И.<sup>2,3</sup>, Алимова Ф.К.<sup>3</sup>, Скворцов Е.В.<sup>4</sup>, Мельникова Т.А.<sup>5</sup>

1 - студент, 2 - аспирант, 3- профессор, д.б.н., 4- к.б.н., научный сотрудник института органической и физической химии им. А.Е.Арбузова Казанского научного центра РАН,  
<sup>5</sup>- к.б.н., сотрудник отдела главного технолога ОАО «Татспиртпром»  
ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина», Казань  
elinka-85@mail.ru

При производстве спирта из зерна получается довольно большое количество отработанной массы прошедшего ферментацию сырья, из которого путем дистилляции был извлечен алкоголь. Эту жидкую массу — послеспиртовую барду — необходимо утилизировать, и проблема с этим актуальна во всем мире. На сегодняшний день послеспиртовая барда высушивается или перерабатывается в дрожжевой кормоконцентрат - основу комбикорма, предназначенного для кормления сельскохозяйственных животных и птицы. Применяемая в настоящее время технология предусматривает культивирование кормовых дрожжей на барде с добавкой источника азота (мочевины и др.). Дрожжи обогащают барду белком. Однако дрожжевой кормоконцентрат обладает невысокими кормовыми качествами и, соответственно, ценой реализации, что заставляет технологов спиртового производства и научных работников продолжать поиски более эффективных методов переработки послеспиртовой барды. Целью работы являлось исследование эффективности предварительного культивирования грибов *Trichoderma* для увеличения содержания белка в дрожжевом кормовом концентрате, получаемом в процессе переработки послеспиртовой барды. В работе использовался штамм *T. asperellum* 302, который был отобран нами в ходе проведенного ранее широкого скрининга штаммов грибов *Trichoderma*. Штамм характеризуется сочетанием высоких показателей протеазной, целлюлазной и ксиланазной активности. Мы провели эксперименты по последовательному культивированию *Trichoderma* с кормовыми дрожжами с целью увеличения выхода кормового белка. Было установлено, что при засеве кормовых дрожжей в барду, где предварительно культивировали *T. asperellum* 302, наблюдается увеличение накопления дрожжевого белка. Нами была определена зависимость увеличения накопления дрожжевого белка от продолжительности предварительного культивирования *T. asperellum* 302 на барде. Небольшое увеличение накопления дрожжевого белка (от 5 до 7 %) наблюдали при предварительном культивировании *Trichoderma* на барде в течение 1-2 суток. Наибольшее увеличение накопления белка наблюдалось после предварительного гидролиза барды *Trichoderma* в течение 3 и 4 дней. Прирост абсолютного содержания белка составил около 10%, что составляет прибавку порядка 35% в сравнении с содержанием белка в дрожжевом кормовом концентрате, полученном без применения предварительного культивирования *Trichoderma*. Таким образом, нами получены данные, показывающие что в процессе культивирования *Trichoderma* на послеспиртовой барде в среде происходит накопление гидролитических ферментов. Максимум ферментативной активности приходится на 3-4 сутки культивирования гриба. Максимум ферментативной активности в среде является оптимальным временем для инокуляции перерабатываемой послеспиртовой барды кормовыми дрожжами. Максимальное содержание белка в дрожжевом концентрате получено при инокулировании дрожжами *Candida tropicalis* на 3 сутки после предварительного культивирования *Trichoderma*. Полученные результаты показывают, что процесс происходит в два этапа: первый — ферментативный гидролиз части сырья в процессе

предварительного культивирования гриба *Trichoderma* с получением доступных для дрожжей сахаров, второй — ферментация образующихся сахаров дрожжами, что позволяет получить высокий выход кормового белка.

## Исследование воздействия нефтяного загрязнения на представителей бактерио-, фито- и зоопланктона экосистем Балтийского моря

Сребняк Е.А.

аспирант

Российский государственный университет нефти и газа имени И.М. Губкина

[srebnyak@yahoo.com](mailto:srebnyak@yahoo.com)

Эффективность очищения морской воды от нефти можно определить с помощью биологического и химического способов. Для определения эффективности очищения биологическим способом был использован метод биотестирования. Изучали воздействие загрязненной нефтью морской воды и очищенной природными ассоциациями углеводородокисляющих бактерий на представителей фитопланктона (морские водоросли *Dunaliella salina* и *Chlorella minutissima*) и зоопланктона (солонатоводные рачки *Artemia salina*), наблюдая за их развитием. Для определения качества очистки воды природными ассоциациями углеводородокисляющих бактерий использовали метод биотестирования.

Изучали развитие аборигенной микробиоты Балтийского моря в лабораторных условиях при модельном нефтяном загрязнении (2,5%) морской воды. Наблюдали увеличение титра углеводородокисляющих бактерий с  $10^3$  до  $10^8$  клеток/мл при развитии в течение 6 сут. в условиях аэрации на качалке. Составлена коллекция углеводородокисляющих бактерий и их ассоциаций, выделенных из Балтийского моря. Данная коллекция культур природных углеводородокисляющих бактерий представляет собой стратегический запас активного компонента биопрепаратов быстрого реагирования на нефтяное загрязнение. В коллекции представлены бактерии следующих родов: грамположительные *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* и грамотрицательные *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Spirillum*, *Alteromonas*, *Mycococcus*.

Исследовали воздействие бактериопланктона на зелёные микроводоросли *Dunaliella salina* и *Chlorella minutissima* и солонатоводных рачков *Artemia salina*. В случае артемий исследовали накопительные лабораторные культуры в возрасте 13 сут. с разведениями в 100, 1000, 10000 раз. В исследуемую морскую воду, как загрязнённую нефтью, так и очищенную от нефти природными ассоциациями углеводородокисляющих бактерий, добавляли суспензии, содержащие клетки микроводорослей или науплии артемий. Через 6 и 13 дней проводили подсчёт количества клеток водорослей в камере Горяева, а рачков – визуально в стеклянном экспериментальном сосуде. Сравнивали развитие фито- и зоопланктона в трех параллельных экспериментах: интактной морской воде (контроль), морской воде с 2,5% нефти, нефтезагрязненной воде после развития в ней аборигенного углеводородокисляющего бактериопланктона. Было установлено, что в условиях опытов развитие микроводорослей стимулируется. В то же время, нефтяное загрязнение вызывает 100%-ную гибель *Artemia salina*, так же как и накопительная культура без разведения и с разведением в два раза. В случае разведений в 100, 1000 и 10000 раз ингибирование развития рачков практически не наблюдалось.

Таким образом, аборигенные ассоциации углеводородокисляющих бактерий эффективно очищают морскую воду от нефти и в естественных концентрациях не оказывают негативного воздействия на представителей фито- и зоопланктона,

**Создание гибридных полисахаридных гранул для иммобилизации дрожжей  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Татаринов А. М.**

магистрант

"Российский государственный университет нефти и газа имени И.М.Губкина"

[TatarinovAnatoly@yandex.ru](mailto:TatarinovAnatoly@yandex.ru)

Получение добавок к углеводородному топливу, альтернативного происхождения, – перспективное направление, позволяющее снизить себестоимость топлив и их неблагоприятные экологические эффекты при одновременном повышении их эксплуатационных характеристик. К таким топливам относятся бензин-этанольные композиции. Получение этанола, таким образом, становится важной технической отраслью. Особенно перспективно производство биоэтанола, осуществляемое с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Zymomonas mobilis*.

В процессе поиска оптимальных технологических условий получения этанола с помощью *Saccharomyces cerevisiae* SL100 были изучены преимущества использования иммобилизованных клеток.

К носителям предъявляли следующие требования: (а) хорошие диффузионные характеристики, (б) сродство к живым клеткам, что должно обеспечивать их нормальную жизнедеятельность. По нашему мнению, этим требованиям более всего отвечают природные полисахариды. В качестве базового полимера мы выбрали альгинат, представляющий собой полиуроновую кислоту, в качестве легирующего компонента – ритизан, полианионный экзополисахарид *Paracoccus denitrificans*, содержащий в качестве главных мономеров, определяющих конформацию полимера, глюкуроновую и пировиноградную кислоты, а также ацильные заместители. Были проверены различные пропорции компонентов: 50:1, 40:1, 30:1. Наилучший результат был получен при соотношении альгинат/ритизан, равном 50:1. Сшивку биополимеров производили хлоридом кальция. В сравнении с простыми альгинатными гранулами, при использовании этих гибридных гранул было достигнуто увеличение бродильной активности на 10%. Мы предполагаем, что этот эффект связан с улучшением диффузионных характеристик гранул за счёт менее жёсткой структуры кальций-ритизанового геля в сравнении с кальций-альгинатным.

## Изучение антифунгального действия дельта-эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* в отношении фитопатогенных грибов

Терпиловский Максим Александрович, Тюльпинева Анна Александровна, Каменек Дмитрий Валерьевич, Каменек Людмила Кирилловна

студент; к.б.н, доцент; старший преподаватель; д.б.н., профессор  
Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

E-mail: [jbn@inbox.ru](mailto:jbn@inbox.ru)

Многочисленные подвиды *Bacillus thuringiensis* продуцируют δ-эндотоксины, гомологичные по составу. Дельта-эндотоксины организованы в виде параспоральных кристаллов и способны оказывать цитостатическое воздействие на ряд фитопатогенных грибов родов *Fusarium*, *Bipolaris*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Risooctonia*, вызывающих многочисленные инфекционные заболевания растений.

Целью данной работы явилось изучение особенностей действия δ-эндотоксина *B. thuringiensis* на фитопатогенные грибы.

В работе использовали в качестве продуцента δ-эндотоксина *B. thuringiensis subsp. thuringiensis* шт. 202. В качестве тест-объектов использовали следующие культуры фитопатогенных грибов: *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Fusarium graminearum* – возбудители гнили злаков, *Phytophthora infestans* штаммы 3 и 5 – возбудитель фитофтороза картофеля и томатов.

Протестированные фитопатогенные грибы проявили разную чувствительность к δ-эндотоксину. Полученные данные показывают, что наряду с высокой (*P. infestans*, *B. sorokiniana* и *R. solani*), отмечена и относительно низкая чувствительность (*F. oxysporum*, *F. graminearum*, *A. brassicae*) культур грибов.

Исследования дыхательной активности показали, что пересев грибов на среду Старра сопровождается увеличением скорости дыхания, связанным с повышением содержания в среде источников углерода и дыхательных субстратов.

В течение первых двух минут наблюдений скорость дыхания *F. graminearum* снижается до значения, оптимального для роста на данной среде (0,018 мм/мин). Добавление 0,1 мл раствора δ-эндотоксина в концентрации 0,05% к среде инкубирования в момент приближения скорости дыхания гриба к фоновой провоцирует резкое увеличение скорости дыхания тест-организма. Вызванное токсином дыхание более чем в 40 раз превышает фоновое.

Сходная картина наблюдается при воздействии токсина на клетки культуры *P. infestans* штамм 3. Для клеток культуры *P. infestans* штамм 5 отмечен резкий спад скорости дыхания, практически до нуля, в течение 30 сек. Последующих за этим максимумов не наблюдалось в течение всех остальных 9 мин. опыта. Данное явление ещё раз подчёркивает наличие специфики в возможном механизме действия дельта-эндотоксина на культуры клеток грибов.

Данный метод может использоваться для быстрого установления наличия чувствительности и оценки её степени у фитопатогенных грибов к δ-эндотоксину *B. thuringiensis*.

## Интродукция ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов в ризосферу тритикале

**Шестакова Екатерина Алексеевна**

аспирант

ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

E-mail: [ekatyatut@tut.by](mailto:ekatyatut@tut.by)

Метод биологической стимуляции роста и развития зерновых культур, основанный на колонизации их корневой системы штаммами ассоциативных diaзотрофов, позволяет повысить урожайность и получить экологически чистую зерновую продукцию. Посевные площади под такой перспективной зерновой культурой, как озимый тритикале, в Беларуси занимают 360-400 тыс. га, а в ближайшие годы возрастут до 420 тыс. га. Интродукция азотфиксирующих микроорганизмов при возделывании тритикале является эффективным способом повышения его продуктивности. Целью наших исследований было выделение эффективных ассоциативных diaзотрофов и изучение их влияния на рост и развитие тритикале. Из ризопланы тритикале было выделено 18 изолятов ассоциативных diaзотрофных микроорганизмов. Отбор эффективных diaзотрофов проводили по азотфиксирующей способности, которую определяли ацетиленовым методом. Наибольшая фиксация атмосферного азота была отмечена у восьми изолятов и составляла 90,5 – 129,8 нМоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ фл.·сут. Максимальной нитрогеназной активностью обладал изолят № 17 (129,8 нМоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ фл.·сут). Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств данного изолята позволило отнести его к роду *Bacillus*. Изучение ростостимулирующей активности отобранных diaзотрофов показало, что инокуляция ими семян тритикале приводит к увеличению всхожести в 1,5 – 5,2 раза по сравнению с вариантом без инокуляции. С целью изучения способности выделенных ассоциативных изолятов колонизировать поверхность корней тритикале был заложен стерильный микровегетационный опыт (субстрат – почвенно-песчаная смесь в соотношении 3:1). Стерильные семена тритикале были обработаны клетками штамма *Bacillus sp.17*, суспендированными в стерильной воде. Растения выращивали в течение трех месяцев в условиях светокультуры. Численность микроорганизмов, прикрепившихся к корням тритикале, определяли путем посева гомогенизированных корней на мясной суслоагар. Колонии подсчитывали после 96 ч инкубирования в термостате при 28 °С. Представленные в таблице данные свидетельствуют о положительном влиянии инокуляции ассоциативными diaзотрофами на рост и развитие тритикале в условиях стерильной модельной системы.

Таблица. Приживаемость ассоциативных diaзотрофов в ризоплане и их влияние на рост и развитие тритикале

Вариант	Фаза роста					
	кущение			стеблевание		
	высота растений, см	сухой вес корней, г	КОЕ/г корней	высота растений, см	сухой вес корней, г	КОЕ/г корней
Контроль	25,2±0,35	0,0194±0,001	-	36,2±0,66	0,0546±0,002	-
<i>Bacillus sp.17</i>	33,4±0,48	0,0714±0,003	(4,0±0,09)·10 <sup>7</sup>	37,5±0,16	0,0654±0,003	(10,0±0,12)·10 <sup>7</sup>

Интродукция штамма *Bacillus sp.17* в ризосферу тритикале обеспечивает в фазу кущения увеличение высоты растения и сухого веса корневой системы на 132,5 и 368 % соответственно. В фазе стеблевания ростостимулирующий эффект от инокуляции семян тритикале штаммом *Bacillus sp.17* был ниже и составил 103,6 и 119,8 % соответственно. Интродукция штамма *Bacillus sp.17* в ризосферу тритикале перспективна для повышения его продуктивности.