МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология
Магистерская программа Биохимия
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИЙ РОДОВ *BACILLUS, PSEUDOMONAS* И *STREPTOMYCES*»

Студент _____ Кузнецов Олег Дмитриевич

Руководитель _____ Заплатин Б. П.

Рецензент _____ Дружинина Т. А.

Нормоконтролер _____ Клыченков С. В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 11.05.25 № 12)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г. А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 27.06.25 № 4)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С. В.

Пенза, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... 6
1.1. Описание и систематическое положение бактерий..... 6
1.1.1. Систематическое положение бактерий рода *Bacillus*..... 6
1.1.2. Систематическое положение бактерий рода *Pseudomonas*... 8
1.1.3. Систематическое положение бактерий рода *Streptomyces*... 9
1.2. Морфологические и биохимические особенности бактерий..... 9
1.2.1. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода *Bacillus*..... 9
1.2.2. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода *Pseudomonas*..... 11
1.2.3. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода *Streptomyces*..... 13
1.3. Особенности генома бактерий..... 14
1.3.1. Особенности генома бактерий рода *Bacillus*..... 14
1.3.2. Особенности генома бактерий рода *Pseudomonas*..... 16
1.3.3. Особенности генома бактерий рода *Streptomyces*..... 18
1.4. Взаимодействия микроорганизмов..... 20
1.4.1. Типы взаимодействия микроорганизмов в природе..... 20
1.4.2. Антибиотическая активность микроорганизмов..... 24
1.5. Применение в медицине, промышленности и генной инженерии бактерий родов *Bacillus*, *Streptomyces* и *Pseudomonas*..... 29
1.6. Заключение по обзору литературы..... 30
2. МАТЕРЬЯЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... 32
2.1. Объекты исследования..... 32
2.2. Методы исследования..... 33
2.2.1. Идентификация чистых культур..... 34

2.2.2. Культивирование прокариот..... 34
2.2.3. Определение антимикробной активности прокариот..... 35
2.2.4. Определение физиологических свойств чистых культур..... 37
2.2.5. Микроскопические методы исследования..... 39
2.2.6. Аналитические методы исследования..... 40
2.2.7. Статистические методы..... 40
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... 41
3.1. Культуральные и морфологические особенности исследованных в работе микроорганизмов..... 41
3.2. Определение антимикробной активности бактерий-продуцентов по отношению к тестовым культурам..... 50
3.3. Реакция тест-культур на препараты антибиотиков..... 58
3.4. Определение физиологических параметров роста штаммов-антагонистов..... 61
3.4.1. Кривая роста и время удвоения..... 61
3.4.2. Определение интервалов роста..... 63
3.4.3. Рост бактерий при разном содержании кислорода..... 66
3.4.4. Денитрифицирующая способность штаммов-антагонистов. 68
3.5. Рост штаммов-антагонистов в планктонной и биопленочной культурах..... 69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 72
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 75

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мире идет активный поиск микроорганизмов, продуцирующих экзометаболиты, обладающие антимикробными свойствами, для промышленных, медицинских и биотехнологических целей.

Современные инструментальные методы исследования в области биологии и биохимии, молекулярно-биологические методы и биоинформатический анализ позволяют не только определять видовую принадлежность микроорганизмов, но и изучать полный геном, выявлять метаболические особенности бактерий, ферментные системы, а также возможности организмов продуцировать антимикробные вещества (АВ), которые играют значимую роль в адаптационных процессах к окружающим условиям в мультивидовых сообществах. Однако не менее важно проводить первичный поиск продуцентов АВ и лабораторный микробиологический анализ чистых культур, выделенных из различных мест обитания, на антимикробную активность, определять степень действия антимикробных веществ на разные группы микроорганизмов. Важность этих исследований определяется потребностями в новых антимикробных веществах для медицины, биохимических производств и биоинженерии.

В ближайшие годы выделение АВ может столкнуться с рядом сложностей. Самым большим затруднением при изучении микроорганизмов-продуцентов антимикробных метаболитов, является высокая приспособляемость бактерий, на которых направлено действие антибиотических препаратов. Существуют так же сложности с первичным выделением антимикробных метаболитов, определением биохимического состава и механизма действия, а также с их синтезом в промышленных масштабах.

В связи с вышесказанным, и сегодня не перестает быть актуальной задача поиска продуцентов антимикробных веществ среди бактерий различных таксономических групп.

Целью данной работы являлось изучение антимикробной активности бактерий родов *Bacillus, Pseudomonas* и *Streptomyces*, выявление активных штаммов-антагонистов.

Для выполнения поставленной цели были поставлены задачи:

1. Описать культуральные и морфологические характеристики бактериальных культур – потенциальных продуцентов антимикробных веществ.

2. Проверить различными методами антимикробную активность исследованных культур. Выбрать активные штаммы-антагонисты.

3. Определить физиологические параметры роста (скорость роста, T°C и соленость среды, аэрофильность) выбранных штаммов-антагонистов.

4. Исследовать особенности роста штаммов-антагонистов в планктонной и биопленочной культурах.

5. Данные задачи выполнялись на базе лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Предполагается дальнейшее использование результатов в нефтегазовой промышленности и биоинженерии.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Описание и систематическое положение бактерий

Широкое распространение в природных субстратах (почвах, водоемах, лесном опаде и т.д.), большие физиологические возможности, простота выделения и культивирования делает бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* доступным объектом для изучения микробиологами. А потенциальные возможности этих микроорганизмов образовывать внеклеточные антимикробные метаболиты направляют на них внимание биохимиков и биотехнологов с целью разработки на их основе биопрепаратов, изготовления лекарств, использования в генной инженерии и других областях. Использование в настоящей работе бактерий перечисленных родов определяет необходимость подробнее остановиться на биологических особенностях этих прокариот.

1.1.1. Систематическое положение бактерий рода Bacillus

Род *Bacillus* в рамках научной классификации бактерий принято относить к семейству *Bacillaceae*. Это обширный род, содержащий более 200 видов грамположительных палочковидных бактерий, образующих внутриклеточные споры (рис. 1) [2].

Основной средой обитания бактерий рода *Bacillus* является почва. Представители этого рода выделены из образцов почвы, отобранных в климатически экстремальных условиях – в пустынях и в Антарктике, что говорит об особой приспособляемости некоторых видов *Bacillus*. В почвах чаще всего доминируют *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. cereus* [52].

Отбирая образцы почвы, следует понимать, что термофильные бактерии данных видов не всегда обитают только в термальных и геотермальных источниках, а алкалофильные бактерии в почвах и субстратах с высокими значениями кислотности. Например, штаммы *B. stearothermophilus* были выделены из почвах умеренных климатических зон. Однако экстремальные термофилы, а также ацидофильные штаммы *B.*

acidocaldarius выделяют исключительно в термальных источниках и окружающих их почвах [13].

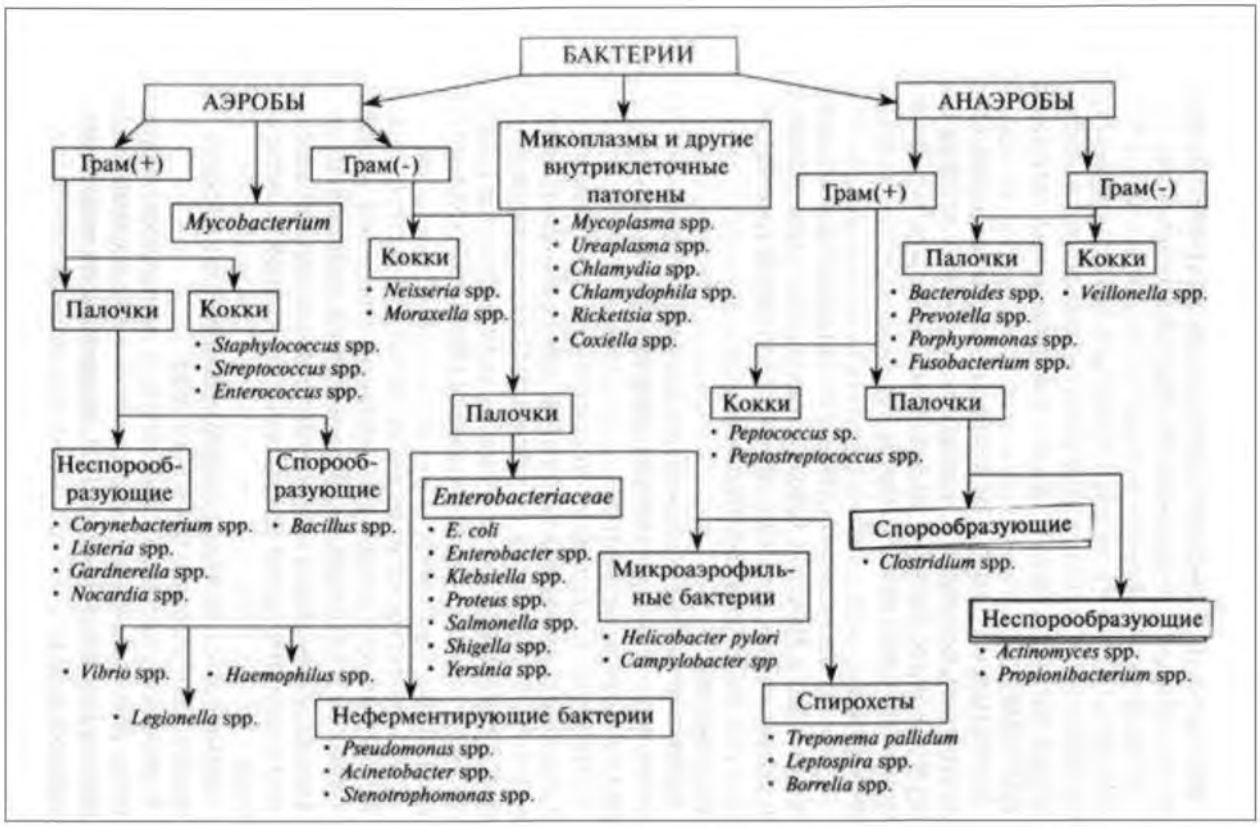


Рисунок 1. Систематическое положение бактерий рода Bacillus.

Некоторые представители рода *Bacillus* могут обитать, исключительно в щелочных соленых озерах. Поэтому бактерии с экстремальными свойствами, такими как устойчивость к высокой температуре, pH и большим концентрациям солей, лучше искать в образцах с соответствующими условиями. Данные бактерии могут составлять до 20% общей численности микрофлоры морской воды. Наиболее высокая численность бацилл характерна для прибрежных вод, она возрастает с увеличением температуры и глубины и уменьшается с удалением от берега [35].

В морской воде преобладают бактерии *B. licheniformis*, вторые по численности – *B. subtilis* и *B. pumilus*. При этом концентрация микроорганизмов снижается от побережья к глубинным слоям из-за недостатка питания, кислорода и снижения температуры. К другим видам,

встречающимся реже и в основном в незагрязненных прибрежных районах, относятся *B. brevis*, *B. firmus* и *B. sphaericus* [32].

Бактерии, обитающие в пресной воде, в основном имеют, вероятно, почвенное происхождение. Бактерии рода *Bacillus*, встречающиеся чаще всего в осадках и представляющие собой типичные почвенные организмы, это *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. firmus* и *B. pumilus* [27].

1.1.2. Систематическое положение бактерий рода Pseudomonas

Классификация семейства *Pseudomonadaceae* в последние годы претерпела значительные изменения. Актуальная классификация бактерий рода *Pseudomonas* основана на методах молекулярной гибридизации и культуральных особенностях микроорганизмов. В настоящее время данный род бактерий относится к семейству *Pseudomonadaceae* и порядку *Pseudomonadales* [37].

В составе семейства *Pseudomonadaceae* по гомологии рРНК и нескольких групп, имеющих гомологичную (схожую) ДНК, выделяют 5 групп. *Pseudomonas aeruginosa* относится к роду *Pseudomonas* и входит в подгруппу флуоресцирующих бактерий, наряду с *Ps. fluorescens* и *Ps. putida* (рис. 1) [65].

В настоящее время таксономическая группа рода *Pseudomonas* содержит 202 штамма, относящихся к 28 видам. Эти бактерии были разделены на три группы на основании характеристики образуемых ими пигментов [52].

Флуоресцирующие бактерии. Эта группа объединяет представителей 12 видов бактерий. Они синтезируют водорастворимые флуоресцирующие пигменты от желто-зеленого, до оранжевого цвета. Бактерии данной группы активно разлагают углеводы. Распространены в воде, почве, сточных водах [65].

Ахромогенные бактерии. В данную группу входят бактерии, которые не синтезируют пигментов. Используют сахара, органические кислоты. И так же встречаются в почве и воде [44].

Хромогенные бактерии. Эта группа объединяет бактерии 6 видов, выделенных из почвы. Бактерии образуют желтый пигмент, нерастворимый в воде, образуют сероводород и индол [58].

1.1.3. Систематическое положение бактерий рода Streptomyces

Streptomyces – род актинобактерий из семейства *Streptomycetaceae* порядка *Streptomycetales*. Является самым большим родом семейства, имеющим более 700 видов. Большая часть данных микроорганизмов обитает преимущественно в почве, реже в морской воде. Различные штаммы одного и того же вида могут колонизировать разные среды. Видовая номенклатура рода *Streptomyces*, как правило, основана на цвете воздушных и субстратных гиф и спор [52].

Род *Streptomyces* является продуцентами многих противомикробных препаратов, а также противоопухолевых препаратов и антипаразитарных соединений [3].

1.2. Морфологические и биохимические особенности бактерий

1.2.1. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода Bacillus

Культуральные особенности бактерий рода *Bacillus* имеют следующие отличия: колонии выглядят как округлые образования, имеющие поверхностный рост на плотных питательных средах. Колонии имеют слабовыраженную окраску, однако ряд видов рода *Bacillus* имеет окраску колоний в градации от серовато-беловатых иногда желтых оттенков, до светло-коричневых, некоторые штаммы образуют розовато-коричневый пигмент. Размеры колоний не превышают, как правило, 2–3 мм в диаметре, края колоний ровные, рост по штриху колоний разнообразен и зависит от

вида и штамма бактерий. Могут образовывать нежную пленку и слизь (биопленку), равномерное помутнение и хлопьевидный осадок. Оптимальная температура развития колоний 30–32°С, максимальная 37 48°С, минимальная 10°С [2].

Под микроскопом бактерии рода *Bacillus* – это грамположительные палочковидные бактерии, размеры которых не превышают 0.5–1.3 х 3.6–5.6 мкм. Размер данных микроорганизмов зависит от постоянного места обитания. Подвижные, жгутики располагаются перетрихиально. При влиянии неблагоприятных факторов внешней среды способны образовывать центральную спору [39].

По толерантности к кислороду многие штаммы рода *Bacillus* являются аэробами или факультативными анаэробами. Но некоторые виды могут обитать так же в бескислородной среде являясь анаэробами *(B. cellulosaemethanicus*) [51].

Бактерии данного рода являются хемоорганотрофами, а также участвуют в круговороте азота восстанавливая нитраты до нитритов, и являясь при этом аммонификаторами. Помимо этого, некоторые виды *Bacillus* могут сбраживать клетчатку (целлюлозу) до масляной и уксусной кислот и до водорода, метана и других газообразных продуктов [16].

Некоторые бактерии рода *Bacillus* обладают выраженной протеолитической и амилолитической активностью. Расщепляя белки и полисахариды, некоторые виды бацилл так же могут расщеплять триглицериды. *Амилаза* – это фермент, действующий на гликозидные связи в полисахаридах расщепляя их. Амилазы разделены на α-амилазы и β-амилазы, так называемые эндоамилазы и экзоамилазы. *Липаза* это фермент, участвующий в процессах гидролиза триглицеридов, в результате которого освобождаются глицерин и высшие жирные кислоты [8].

Некоторые виды спорообразующих бактерий *Bacillus* вырабатывают ферменты, разлагающие пектин и протопектин растений. Этим бактериям

приписывается определенная роль в создании комковатой структуры почв и глиноземов, а также образования лиственных перегноев [23].

Бактерии рода *Bacillus* обнаруживается в почве, на поверхности листьев, в воде (пресной и морской). Преобладая в окультуренных почвах, они являются индикатором азотного режима почв. Бациллы способствуют превращению нерастворимых фосфатов в минеральные фосфорнокислые, восстановлению железа, ацетоноэтиловому брожению. Они могут быть продуцентами мочевины (как продукта метаболизма) при избыточном азотистом питании и отсутствии углеводов. Участвуют в гнилостных процессах [72].

1.2.2. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода Pseudomonas

Колонии бактерий рода *Pseudomonas* очень разнообразны. Они могут обладать слизистой и пастообразной структурой. Чаще всего по профилю наблюдаются выпуклые и плоские, крупные и мелкие. Однако у большинства видов колонии представляют собой округлые, гладкие, блестящие структуры диаметром не более 1-2 мм, с неровным краем светло-желтого или белого цвета. У многих видов отмечается особая внутренняя структура колоний в одних случаях можно обнаружить мелкозернистую однородную структуру колонии; в других – ячеистую, напоминающую соты; в-третьих – колонии в виде неоднородных мелких комочков или хлопьев [5].

Под микроскопом клетки бактерий *Pseudomonas* имеют вид мелких одиночных грамотрицательных палочек прямой или чаще изогнутой формы. Средние размеры клеток варьируются от 0.5 до 1 мкм в диаметре и до 1.5–4.0 мкм в длину. Клетки многих видов подвижны, особенно в молодых культурах. Органами движения являются жгутики, но также имеются и другие структуры. Например, у клеток морских *Pseudomonas* на поверхности имеются трубчатые отростки – шипы (спины) длиной 1–3 мкм и диаметром, не превышающим 65 нм. У других представителей рода *Pseudomonas* на

поверхности клеток имеются тонкие прямые реснички – фимбрии или пили. Иногда они располагаются по всей поверхности клеток, но у части видов они расположены полярно [6].

У большинства бактерий видов *Pseudomonas* жгутики расположены одиночно монотрихиально и отсутсвует чехол на жгутиках. Некоторые виды напротив обладают жгутиками расположенными амфитрихиально (*Ps. viridiflava*). У многих видов у жгутиков имеются чехлики. В отличие от остальных видов бактерии *Ps. mallei* не имеют жгутиков и относятся к роду *Pseudomonas* на основании других признаков. Жгутики данных бактерий, как правило, превышают длину клетки в несколько раз и различаются по диаметру [18].

Pseudomonas относятся к микроорганизмам-денитрификаторам. Для дыхания такие бактерии используют кислород, содержащийся в нитратах, являясь при этом аэробами и освобождают азот, который выходит из системы в форме газа [11].

Толщина клеточной оболочки у псевдомонад может меняться под влиянием внешних факторов и быть различной у разных штаммов, что говорит о большой приспособляемости к экстремальным факторам внешней среды. Химический состав клеточной стенки бактерий постоянен и, как правило, не изменяется на различных стадиях развития культуры или при возникновении мутаций. Поэтому данный род бактерий, активно используется в генной инженерии [50].

Культуры различаются между собой способностью расщеплять белки, использовать углевод, расщеплять крахмал, клетчатку, углеводороды, соединения ароматического ряда и другие сложные по составу вещества [8].

Большинство бактерий рода *Pseudomonas* обладает гетеротрофным типом обмена веществ, т.е. для построения тела им требуется готовое органическое вещество. Биосинтетические процессы при этом осуществляются за счет обмена окислительного типа, где кислород является конечным акцептором электронов, перенос которых связан с системой

цитохромов. Многие виды *Pseudomonas* образуют пигменты, различные по окраске и химической природе; некоторые синтезируют витамины, антибиотики, токсины, используемые в медицине и промышленности [19].

1.2.3. Морфологические и биохимические особенности бактерий рода Streptomyces

При культивировании микроорганизмов рода *Streptomyces* на твердых питательных средах и субстратах наблюдается ряд культуральных особенностей. Как правило, колонии округлые с ровным краем, цветовая гамма которых варьируется от бледно-белого до темно-красного цвета, что обусловлено способностью образовывать разнообразные пигменты, определяющие окраску субстратного и воздушного мицелия. Структура колоний плотная, однородная и представляет собой образования, которые при разрастании на поверхности сложного субстратного разветвлённого мицелия [4].

Колонии обычно небольшие, диаметр составляет 1–10 мм. Обособленные, шероховатые или блестящие. Поверхность колоний первое время относительно гладкая, но со временем на ней формируется переплетение гиф воздушного мицелия, который может быть зернистым, порошковидным или бархатистым [4].

При микроскопии бактерии рода *Streptomyces* имеют вид грамположительных нитевидных образований из развитых вегетативных гиф диаметром от 0.5 до 2.0 мкм. Гифы субстратного и воздушного мицелия неподвижны. Образуют споры, расположенные в спорангиях [40]. Поверхность спор может быть шероховатой, морщинистой, гладкой или колючей. У ряда видов воздушные гифы выглядят как длинные прямые нити, которые несут 50 или более спор через более или менее равные промежутки, расположенных в виде завитков (вертицилл). Некоторые штаммы образуют короткие цепочки спор на гифах субстрата. Часть видов и штаммов образуют склероции, пикнидии, спорангии и синнемы [4].

Некоторые микроорганизмы рода *Streptomyces* разжижают желатин, гидролизуют крахмал, в разной степени потребляют многие сахара (кроме арабинозы, мальтозы, рибозы и сорбозы) и обладают широким спектром антимикробного действия, являясь одним из основных продуцентов противовоспалительных препаратов и антибиотиков. Одни из видов *Streptomyces* вырабатывают большое количество противогрибковых соединений, имеющих промышленное и медицинское значение, в том числе нистатин (из *S. noursei*), амфотерицин В (из *S. nodosus*) и натамицин (из *S. natalensis*) [22].

1.3. Особенности генома бактерий

1.3.1. Особенности генома бактерий рода Bacillus

Анализ общей структуры генома бактерий рода *Bacillus*, в сравнении с изученными в этом отношении микроорганизмами, позволил установить характерные особенности, свойственные микроорганизмам данной систематической группы бактерий, а также выявить уникальные генетические свойства. В настоящее время депонированы полные нуклеотидные последовательности 78 геномов и значительное число близких к ним представителей рода *Bacillus*. Такой объем доступной научной информации позволяет детально проанализировать полученные в результате секвенирования данные, а также свидетельствует о большом научном интересе, проявляемом в мире к бактериям данной систематической группы. [40].

Геном данных бактерий представлен одной кольцевой хромосомой размером 3978134 п.н., содержащей 46.50 % ГЦ-пар. В состав хромосомы входит 3912 открытых рамок считывания, способных определять синтез 3798 полипептидов, а также молекул рРНК и тРНК. При этом гены, кодирующие субъединицы рибосом, как правило, расположены несколькими кластерами (5S, 16S, 23S). В хромосоме бактерий рода *Bacillus* встречается до 10 кластеров генов, кодирующих рРНК. В хромосоме данных бактерий

присутствует 9 генетических локусов, определяющих синтез 27 молекул рРНК. Практически для всех бактерий этой таксономической группы характерно большое число генов, кодирующих синтез тРНК. Их количество варьирует от 51 до 95 в зависимости от вида бактерий рода *Bacillus*. Представители вида содержат 86 генов, детерминирующих синтез тРНК. Однако следует заметить, что такое большое содержание в клетке компонентов аппарата трансляции свидетельствует о высокой эффективности синтеза белка и, следовательно, активных процессах метаболизма. При анализе данных, наибольшее число генетических детерминант в клетке определяет метаболизм углеводов (от 413 до 423 генов), аминокислот (от 437 до 438 генов), белков (от 166 до 196 генов), жирных кислот, липидов, изопреноидов (от 138 до 141 гена), а также синтез кофакторов, витаминов, простетических групп и пигментов (от 230 до 241 гена). Что является закономерностью, поскольку данные микроорганизмы продуцируют широкий спектр антибиотикоподобных соединений нерибосомной природы, для синтеза которых требуется активный углеводный обмен, в ходе которого образуются ключевые субстраты. Среди различного множества синтезируемых белков важную роль играют ферменты, определяющие поступление в клетку сахаров и этапы их окисления (пермеазы, гидролазы) [69].

Анализ хромосомной ДНК бактерий рода *Bacillus* позволяет выявить два варианта инсерционных элементов семейства 1S3 (6 копий варианта IS150A и 6 копий IS150B размером 1285 и 1284 п.н. соответственно), отличающихся между собой заменами, вставками и делениями отдельных нуклеотидов, затрагивающими порядка 130 позиций. При этом все обнаруженные IS-последовательности локализуются между генами. В геноме бактерий рода *Bacillus* локализовано, по крайней мере, четыре гена, кодирующих консервативные белки антитоксины, защищающие клетку от продуцируемых ею токсинов, направленных против бактерий и молекул нуклеиновых кислот чужеродного происхождения. Система рестрикции–

модификации у данных бактерий представлена четырьмя генами, кодирующими белки, обеспечивающие метилирование собственной хромосомной ДНК и рестрикцию чужеродной ДНК. При этом один из генов (orf626) детерминирует синтез рестриктазы II типа BglII [54].

Сходная по нуклеотидному составу детерминанта присутствует в геноме только у двух бактерий *B. velezensis* и *B. subtilis*, тогда как гомологичный белок синтезируется в клетках большого числа бактерий данного рода. Этот факт может свидетельствовать об определенной стратегии, выработанной микроорганизмами данной систематической группы, суть которой заключается в определенной комбинации генов, детерминирующих белки рестрикции и модификации, позволяющие им защищать клетки не только от вирусной ДНК, но и от проникновения ДНК близкородственных бактерий. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома может служить основой для детального функционального анализа практически значимых свойств данных микроорганизмов [17].

1.3.2. Особенности генома бактерий рода Pseudomonas

Одним из наиболее изученных видов рода *Pseudomonas* является *P. putida*. Этот вид не содержит плазмиду TOL, которая обеспечивала способность исходных бактерий использовать толуол/ксилолы и бензоат/толуаты. Геномы этого вида псевдомонад был секвенирован консорциумом американских и немецких групп, и это был первый геном данного рода бактерий. Размер генома составляет 6,2 Мб, содержание гуанина и цитозина — 61% [42].

Геном представляет собой мозаику генов в том смысле, что в некоторых областях наблюдается явное преобладание аденина и тимина, что позволяет предположить, что эти области могли быть приобретены в результате горизонтального переноса генов. На самом деле в некоторых случаях они представляют собой геномные острова. Род *Pseudomonas* имеет

семь идентичных оперонов рРНК, при этом 16S рРНК является компонентом каждого оперона [69].

Ключевую роль в систематизации рода *Pseudomonas* сыграл Норберто Паллерони, применив к таксономии псевдомонад концепцию 16S рРНК, которая была впоследствии развита Муром и Паллерони в исследованиях рода *Pseudomonas*. Однако анализа одного гена или даже мультилокусного секвенирования на основе генов, отвечающих за жизнедеятельность, недостаточно для различения штаммов одного вида или даже штаммов разных видов в пределах рода. При определении полных последовательностей генома бактерий рода *Pseudomonas* было выяснено, что эти микробы имеют в среднем геном размером 6 Мб, кодируют 6000 генов. Было обнаружено, что все представители рода *Pseudomonas* имеют около 3000 общих генов. Этот набор генов был назван основным геномом. Основные гены определяют физиологию рода и ряд общих функций. Так же следует отметить, что среди основных генов есть несколько, которые кодируют белки, участвующие в адгезии к поверхностям для образования биоплёнок, хемотаксические опероны, информацию для центрального метаболизма, катаболические пути для некоторых ароматических соединений, детерминанты устойчивости к стрессу, РНК-полимеразу, сигма-факторы и другие [25].

Также существует группа из ещё 3000 генов, которые являются общими как минимум для двух других видов *Pseudomonas*. Этот набор генов называется вспомогательными генами, и они обеспечивают специфичность ниши и определённые катаболические свойства. Например, некоторые штаммы *P. putida* используют толуол в качестве источника углерода, но для этого вида описаны разные пути метаболизма этого соединения. Некоторые пути переноса кодируются плазмидами, например, плазмидой TOL, в то время как другие кодируются хромосомами. Некоторые штаммы чрезвычайно устойчивы к органическим растворителям. Кроме того, у каждого вида рода есть от 50 до 300 уникальных генов, которые

присутствуют только у него одного. Этот набор генов расширяет метаболическую универсальность псевдомонад [42].

Анализ белков, кодируемых геномом, показал, что существует 900 семейств паралогичных генов. Почти 50% этих паралогов присутствуют в других видах бактерий, геномы которых превышают 5 Мб, что указывает на то, что метаболическая универсальность *Pseudomonas* частично присуща и другим микроорганизмам окружающей среды. Биохимическая универсальность *Pseudomonas* свидетельствует о пластичности этих микроорганизмов и объясняет их способность адаптироваться к различным экологическим нишам [10].

1.3.3. Особенности генома бактерий рода Streptomyces

Биоинформатический анализ секвенированного генома бактерий рода *Streptomyces* выявил четыре группы генов, определяющих устойчивость к антибиотикам у стрептомицетов: гены инактивации антибиотиков путем модификации их структур (фосфотрансферазы, ацетилтрансферазы, бета-лактамазы); гены транспортных белков, осуществляющих выброс антибиотиков из клетки; гены транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию генов природной устойчивости (семейства whiB, padR и др.) и гены систем токсин/антитоксин, функционирование которых в стрессовых условиях переводит клетки в персистирующее состояние, что приводит к их толерантности к антибиотикам [66].

При сравнении аминокислотных последовательностей продуктов трех групп генов: генов устойчивости к антибиотикам, генов транспорта антибиотиков различных классов и генов семейства транскрипционных регуляторов, принимающих участие в осуществлении природной устойчивости бактерий рода *Streptomyces* так же было обнаружено, что в геноме некоторых штаммов отсутствуют ген устойчивости к тетрациклину tetM, ген устойчивости к бицикломицину и ген металло-β-лактамазы [33].

Процент идентичности таких генов как cmlR (обеспечение устойчивости к хлорамфениколу), macB (обеспечение устойчивости к макролидным антибиотикам) и drrA, drrb штаммов рода *Streptomyces*, как правило, не превышал 56%. В геноме данных бактерий с помощью биоинформатического анализа были найдены гены четырех MDR ABC транспортеров, имеющих АТФазную и пермеазную компоненты; восемь генов, разбросанных по геному АТФазных составляющих MDR ABC транспортеров, включая два гена устойчивости к даунорубицину (drrC, brcA) и ген устойчивости к макролидным антибиотикам macB2; пять генов непарных субъединиц пермеаз MDR ABC транспортеров; ген MDR-транспортера семейства matE, обеспечивающего устойчивость бактерий к моксифлоксацину, ципрофлоксацину, левофлоксацину; транспортера семейства MFS, способствующего устойчивости к бромистому этидию и гигромицину B; а также ген устойчивости к пуромицину семейства emrB/qacA и ген двусубъединичного MDR-ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека по всей длине гена с 54% подобия [64, 69].

Также в геноме *Streptomyces* были обнаружены гены транскрипционных регуляторов, которые могут быть вовлечены в процесс формирования устойчивости у бактерий – whiB, padR, marR, lfrR, tetR. АТФ-зависимые ABC транспортеры (MDR) – трансмембранные белки, которые используют энергию АТФ для осуществления транслокации различных субстратов через мембраны из клеток. ABC транспортеры участвуют в развитии резистентности ко многим лекарственным препаратам. Pgp (MDR1) является членом семейства АТФ-связывающих кассетных (ABC) транспортеров и играет физиологическую роль в здоровых клетках: выполняет барьерную функцию тканей и участвует в транспорте фосфолипидов в печени. Нарушение работы отдельных транспортеров или транскрипционных регуляторов может обусловливать возникновение сверхчувствительности некоторых штаммов *Streptomyces* [33].

1.4. Взаимодействия микроорганизмов

1.4.1. Типы взаимодействия микроорганизмов в природе

Взаимодействия микроорганизмов друг с другом очень разнообразны. Среди основных взаимодействии бактерий выделяют: симбиоз, нейтрализм, конкуренция и антагонизм [21].

Симбиоз – это более редкая форма взаимоотношений между микроорганизмами, чем конкуренция. При наличии связей между бактериями формируется консорциум – структурированная симбиотическая ассоциация двух или более видов, предполагающая тесную интеграцию их метаболизма.

В большинстве случаев очень сложно определить тип симбиотической связи, так как их различные формы отношений могут переходить друг в друга [12].

Симбиозы классифицируют по нескольким признакам:

1. По обязательности симбиотической связи могут выделять:

- факультативный симбиоз – каждый организм может существовать самостоятельно, имея общий субстрат и не мешая существованию друг друга;
- облигатный симбиоз – один или оба симбионта сильно зависимы друг от друга, и развиваться раздельно не могут, имея помимо общего субстрата так же общие питательные вещества, либо один из микроорганизмов в процессе метаболизма выделяет биохимические вещества необходимые для метаболизма других бактерий (синтрофия).

2. По расположению партнеров различаются:

- экзосимбиоты – микроорганизмы существуют раздельно друг от друга;
- эндосимбиоты – один из микробов развивается в клетке другого [21].

По характеру взаимоотношений между микробами выделяют следующие симбиозы:

1. Собственно симбиоз – тип взаимоотношений между микроорганизмами, при котором два или более вида при совместном развитии создают друг для друга взаимовыгодные условия жизнедеятельности.

2. Метабиоз – тип взаимоотношений, когда пользу извлекает только один вид бактерий, не причиняя вреда другому. Чаще всего наблюдается развитие одного организма за счет продуктов метаболизма другого.

3. Сателлитизм – разновидность метабиоза. В данном случае развитие одного вида бактерий стимулируется другим в результате выделения фактора роста (витаминов, аминокислот, азотистых веществ).

4. Синергизм – тип взаимоотношений между микроорганизмами, при которых они стимулируют развитие друг друга за счет выделения продуктов жизнедеятельности образуя биопленки [12].

Биопленки являются преимущественной формой существования микроорганизмов. 95–99% микробных популяций в природе существуют в виде биопленок (преимущественно мультивидовых). Существует предположение, что именно биопленки являются преобладающей формой организации микробной жизни в нефтяных пластах [41, 56].

В процессе формирования биопленок проходит несколько этапов (рис. 2) [49]. Первый этап – адгезия микроорганизмов к поверхности субстрата из внешней среды (жидкости или газа). Эта стадия обратима, поскольку адгезировавшиеся клетки могут вернуться к планктонной форме существования. Второй этап – необратимая адгезия (фиксация). На этой стадии микробы, выделяя внеклеточные полимеры (матрикс), прочно фиксируются на поверхности субстрата. Далее на следующем этапе образуются микроколонии – отдельные скопления адгезированных клеток. Клетки активно делятся, а экзополимерный матрикс удерживает вместе всю колонию (создавая подобие скелета). И, наконец, микроколонии сливаются, образуя зрелую биопленку, имеющую сложную трехмерную структуру. Внеклеточный матрикс служит защитой клеток от внешних воздействий.

Размерами и формой биопленки довольно вариативны. При нехватке питательных веществ, клетки способны покидать биопленку и переходить в планктонную форму (процесс дисперсии). Со временем эти клетки могут вновь присоединяться к поверхности и образовать новые биоплёнки микроорганизмов [36, 43].

Рисунок 2. Стадии формирования биопленок [49].

Биопленка представляет собой образование, сформированное микроколониями микроорганизмов (15–20% объема) и экзополимерным матриксом (75–85% объема). Матрикс высоко гидратирован, по некоторым данным на 97% состоит из связанной воды, имеет пористую структуру, которая пропускает низкомолекулярные соединения, однако задерживает крупные молекулы, белки и частицы среды. В структуре биопленки выделяют водные каналы, по которым растворенные в среде вещества движутся к нижележащим слоям клеток, осуществляя трофическую функцию. Главными компонентами матрикса являются полисахариды, белки и внеклеточная ДНК. Состав матрикса может различаться в зависимости от внешних факторов и вида микроорганизмов. В мультивидовых биопленках при взаимодействии между различными видами может индуцироваться каскад биохимических реакций, что может в значительной мере усиливать коррозию [34, 68].

В последние годы стало известно, что ряд микроорганизмов, входящих в состав биопленок не только вызывают коррозию, но и могут ингибировать или защищать поверхность металла от коррозии [62, 68].

Описано три возможных механизма ингибирования:

1. снижение концентрации коррозионно активных веществ (потребление кислорода при дыхании аэробных микроорганизмов, попадающих в пласт с нагнетаемой водой), мешая окислению металлов;

2. ингибирование роста микроорганизмов, вызывающих коррозию, путём продуцирования некоррозионноактивными микроорганизмами во внешнюю среду антимикробных веществ, токсичных для корозионноактивных, так называемых антимикробных препаратов;

3. образование полисахаридного защитного слоя, покрывающего поверхность материала [68, 73]. В мультивидовых биоплёнках может наблюдаться комбинация всех трёх механизмов.

Впервые подавление микробной коррозии было показано для двух морских изолятов: *Pseudomonas* sp. S9 и *Serratia marcescens* EF190. С тех пор было изучено влияние ряда бактерий на разные материалы [29, 57].

Эффект подавления коррозии был проверен с использованием аэробных биопленок, выращенных на разных видах металлов. Антикоррозийный эффект был показан для аэробных одновидовых биопленок родов *Bacillus, Pseudomonas, Shewanella,* выращенных на металлической подложке [34, 45].

Нейтрализм – взаимоотношения, бактерий при котором, развиваясь в составе одного биогеоценоза, не оказывают друг на друга непосредственного влияния. Косвенная взаимозависимость организмов при этом неизбежна, поскольку они являются элементами одного сообщества [21].

Конкуренция – взаимоотношения между микроорганизмами одного или разных видов, использующих одни и те же микро и макроэлементы внешней среды (для метаболизма) при недостатке последних. Конкуренция может быть пассивной – потребление ресурсов внешней среды, необходимых

обоим организмам или активной – подавление одного другим в результате образования определенных продуктов обмена [14].

Антагонизм – это взаимоотношения между микроорганизмами, когда один вид бактерий задерживает или полностью подавляет рост другого. Если угнетение взаимно, говорят об аменсализме между видами [21].

Антагонизм широко распространен в природных микробных сообществах, состоящих из бактерий, грибов, актиномицетов, дрожжей, водорослей, простейших и других микроорганизмов. В данном случае наибольший интерес представляет антагонизм в узком смысле, т.е. антагонизм, обусловленный образованием антимикробных веществ и, в частности, антибиотиков. Взаимоотношения, обусловленные продукцией любых антимикробных веществ, можно назвать активным или прямым антагонизмом. В отличие от него существует пассивный, или косвенный, антагонизм, при котором подавление одних микроорганизмов происходит за счет изменения другими бактериями условий окружающей среды в неблагоприятную для их развития сторону [64].

1.4.2. Антибиотическая активность микроорганизмов

Бактерии радикально отличаются от эукариот (и не только отсутствием оформленного клеточного ядра), а также большей частью процессов, связанных с передачей генного материала, синтезом белка, основным метаболизмом бактерий. Так же мембрана и клеточная стенка бактерий имеют свои особенности, отличающиеся от таковых у эукариот. Данные различия позволяют находить и создавать антимикробные препараты, которые избирательно влияют на микроорганизмы, не затрагивая эукариот [30].

Основная ***классификация антибактериальных препаратов*** строится на их механизме действия и химической структуре:

1. Ингибиторы синтеза клеточной стенки (ванкомицин и т.д.).

2. Ингибиторы аппарата биосинтеза белка и остановка репликации ДНК.

Механизм действия препаратов, ингибирующих биосинтез белка и клеточной стенки довольно схож и основан на подавлении синтеза клеточной стенки с помощью прямого связывания с терминальной частью пептидного мостика (а именно с *D*-аланил-*D*-аланином) [15].

Так же выделяют по механизму действия на клеточную стенку препараты, которые направлены преимущественно на устранение граммположительных бактерий. Предполагается, что компоненты препарата молекулярно связываются с мембраной посредством кальций-зависимой вставки в ее билипидный слой, которая сопровождается образованием поры или канальца. В итоге происходит утечка ионов калия, мембрана деполяризуется, нарушая электролитный баланс в клетках бактерий, что приводит к нарушениям синтеза белка репликации генного материяла и клетка погибает [30, 31].

Однако обилие различных классов и видов антимикробных препаратов и разнообразие их механизмов действия, эволюция бактерий, а также приспособляемость и высокая генетическая изменчивость позволяет в сравнительно небольшие сроки развивать устойчивость (резистентность) к данным препаратам. Как правило, такая приспособляемость занимает по времени не более 2–3х лет с момента воздействия антимикробных веществ [67].

Изначально резистентность сформировалась в процессе эволюции для противостояния бактерицидным соединениям естественного происхождения, выделяемыми другими микроорганизмами в процессе метаболизма [26].

Огромным преимуществом многих бактерий для таких эволюционных адаптаций служит очень короткое время генерации. Микроорганизмы становятся устойчивыми к антимикробным препаратам в двух ситуациях:

- в случае возникновения спонтанных мутаций в генном материале ДНК;

- в случае приобретения новых генов устойчивости при помощи горизонтального переноса генов (ГПГ) от других родственных видов и штаммов бактерий [28].

Так же одним из защитных механизмов для борьбы с действием антимикробных препаратов могут выступать L-формы. По сути, это бактерии, полностью или частично лишенные своей клеточной стенки. Данная форма являются способом выживания и размножения микроорганизмов, так как если не будет клеточной стенки – то и не будет мишени для действия препаратов и веществ. Один из факторов, способствующий микроорганизмам на такие превращения – действие препаратов, влияющих на синтез клеточной стенки. Но имеется ряд ограничений для перехода бактерий в L-форму. Одним из самых очевидных является подходящая по осмотическому давлению и минеральному составу внешняя среда, так как в противном случае будет происходить разрушение клеточных структур бактерий из-за отсутствия клеточной стенки и разницы давления в клетке и внешней среде [70].

Ряд микроорганизмов образуют ферменты, химически инактивирующие молекулы антибактериальных препаратов. Представители данной группы ферментов – *пенициллиназа* и *цефалоспориназа* – нарушают структуру антимикробных препаратов пенициллиннового и цефалоспоринового рядов соответственно, вследствие чего молекулы теряют свою активность (инактивируются). Сейчас идентифицировано более 100 разновидностей этих ферментов. Некоторые из них, продуцируются бактериями *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Escherichia coli*, что ограничивает применение данных препаратов при инфекциях, вызванных данными возбудителями. β-лактамазы – фермент, синтезирующийся бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, – гидролизует молекулы пенициллинов, и цефалоспоринов [53].

Так как большинство антибактериальных препаратов воздействует на такие специфические мишени, как белки, нуклеиновые кислоты или

компоненты мембраны, микроорганизмы могут избегать их влияния путем изменения структуры этих мишеней. Например, устойчивость к пенициллинам у *Streptococcus pneumoniae* и к метициллину у *Staphylococcus aureus* обусловлена изменениями в пенициллинсвязывающих белках, сам же метициллин не затрагивается β-лактамазами [48].

Многие представители родов *Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas* способны продуцировать различные виды биологически активных соединений, в том числе и противомикробные вещества, такие как экзоферменты; РНК-деградирующие ферменты; ферменты, лизирующие клеточную стенку; пептидные и липопептидные антибиотики. Примерно 80% известных антибиотиков синтезируется штаммами, принадлежащими только к одному порядку бактерий – актиномицетам (*Actinomycetales*), причем главным образом к одному из родов этого порядка – *Streptomyces*. Антибиотики также синтезируются многими видами грибов, но их структура менее разнообразна, чем структура антибиотиков, образуемых актиномицетами (табл. 1) [7].

Таблица 1 – Некоторые известные микроорганизмы продуценты противомикробных веществ и свойства

Продуцент	Противомикробное вещество	Свойство	Ссылка
Bacillus subtilis	Сурфактин	Циклический липопептид, обладает антибактериальным, противовирусным, противогрибковым действием.	Peypoux et al., 1999
Streptomyces griseus	Стрептомицин	Антибиотик группы аминогликозидов широкого спектра действия. Активен в отношении большинства грамотрицательных бактерий.	Zhu et al., 2001

Таблица 1 – Продолжение.

Streptomyces fradiae, *Streptomyces albogriseolus*	Неомицин	Антибиотик из группы аминогликозидов. Активен в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.	Johnson, Morata, 2010
Streptomyces kanamyceticus	Канамицин	Аминогликозидный антибиотик.	Johnson, Morata, 2010
Micromonospora purpurea	Гентамицин	Антибиотики аминогликозидного ряда широкого спектра действия, подавляют бактериальный синтез белка, высокоактивны по отношению к аэробным грамотрицательным бактериям, а также в отношении аэробных грамположительных кокков.	Yoshizawa et al., 1998
,Streptomyces aurefasiens	Хлортетрациклин	Группа антибиотиков, относящихся к классу поликетидов. Тетрациклины являются антибиотиками широкого спектра действия. Высокоактивны в отношении большого числа грамположительных и грамотрицательных бактерий.	Навашин, Фомина, 1974
Streptomyces erythreus	Эритромицин	Бактериостатический антибиотик из группы макролидов. Спектр действия включает грамположительные микроорганизмы. К препарату устойчивы грамотрицательные палочки:	Johnson, Morata, 2010
Streptomyces mediterranea	Рифамицин	Противотуберкулёзное средство. Активен в отношении микобактерий туберкулёза и лепры. К действию рифампицина чувствительны многие штаммы неспорообразующих анаэробов.	Навашин, Фомина, 1974

1.5. Применение в медицине, промышленности и генной инженерии бактерий родов *Bacillus, Streptomyces* и *Pseudomonas*

Важными с практической точки зрения продуктами вторичного метаболизма бактерий *Streptomyces* являются антибиотики. Так, до 70 % всех производимых промышленностью антибиотиков синтезируются именно бактериями этого рода. Эти бактерии синтезируют антибиотики различного механизма действия и химической природы: аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, олигопептиды и др. Индивидуальный штамм обычно продуцирует несколько антибиотиков, относящихся к разным классам. Кроме того, часто схожие или идентичные антибиотики синтезируются разными видами бактерий *Streptomyces* [4].

Процессы вторичного метаболизма часто связаны с дифференцировкой *Streptomyces* и регулируются большим числом генов. Познание этих механизмов регуляции имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и для практических целей. Наибольшую перспективу развития промышленности представляет генная инженерия бактерий рода *Streptomyces*. Именно стремление создать новые типы штаммов-продуцентов на основе бактерий рода *Streptomyces* стимулировало разработку для них генно-инженерной системы. Следует подчеркнуть, что представители этого рода бактерий синтезируют широкий спектр внеклеточных ферментов. Поэтому по аналогии с представителями бактерий рода *Bacillus* могут быть созданы штаммы *Streptomyces*, секретирующие из клеток целевые белки. Важной особенностью этих микроорганизмов является также то, что они не патогенны ни для человека, ни для животных [4].

Схожим способом используются и представители рода *Bacillus*, однако кропотливая многоступенчатая селекция позволила создать множество мутантных штаммов *Bacillus*, наиболее продуктивные из которых превосходят штаммы дикого типа по уровню синтеза а-амилазы в 103 раз. С развитием методов генно-инженерной реконструкции на системе *B. subtilis*

возникла идея получения нового поколения продуцентов а-амилаз. При этом для промышленности большой интерес представляли термостабильные формы данного фермента, гены которых можно было извлекать из ДНК термофилов и вводить в определенное генетическое окружение такого хорошо изученного мезофила, как *B. subtilis* [9].

Клетки бактерий рода *Pseudomonas* оснащены рецептором, позволяющим следить за скоростью движения окружающей жидкости. Ученые дополнили его флуоресцентным белком, превратив микробы в живые инструменты измерений [5].

При исследованиях применения бактерий рода *Pseudomonas* в генной инженерии было выявлено, что в ответ на скорость окружающих потоков жидкости эти микроорганизмы меняют активность группы генов, названных *Flo* (flow-regulated operon, «регулируемый течением оперон»). Для того чтобы лучше проследить за его работой, ученые связали *Flo* с геном, отвечающим за синтез флуоресцентного белка. Это и превратило клетки в «живые спидометры» и позволило достаточно легко регистрировать поведение *Flo* в различных условиях. Это способствует определению скорости тока различных жидкостей, что очень важно при расчетах на производствах в фармакологии и биохимии [1].

1.6. Заключение по обзору литературы

Бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* обладают широкими морфологическими и физиологическими особенностями, большой приспособленностью и неприхотливостью к внешним факторам окружающей среды, устойчивы к антимикробным препаратам, способны самостоятельно синтезировать антимикробные вещества и белки протеиназы для расщепления различных субстратов (как сложных биохимических соединений, так и простых микро и макроэлементов).

В виду того, что представители данных родов бактерий генетически стабильны и минимально токсичны для человека и окружающей среды

данные бактерии больше всего подходят для генной инженерии и производству антимикробных препаратов которые могут использоваться как в промышленности (для деградации биопленок которые образуются на сложных участках трубопроводов и т.д.), так и в медицине, и биотехнологии для создания лекарственных препаратов, в том числе витаминов.

2. МАТЕРЬЯЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектом исследования, для определения антимикробной активности, являлись 10 штаммов чистых бактериальных культур из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН, принадлежащих 9-ти различным видам трех родов: *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Номера штаммов, их видовая принадлежность и источник выделения представлены в таблице 2.

Чистые бактериальные культуры были выделены из проб подземных вод, отобранных из наблюдательных скважин на территории Сибирского химического комбината (г. Северск, Томская обл.), из проб воды озера Эльтон в Волгоградской области и донных озерных отложений (сапропеля) на территории республики Татарстан, а также из проб пластовой воды (добывающая скважина 1032-2) нефтяного месторождения Кондиан (КНР).

Таблица 2 – Штаммы, использованные в работе

№ штамма	Вид, род	Источник выделения
2-13	*Bacillus cereus*	Пластовая вода нефтяного месторождения
62	*Bacillus cereus*	Пластовая вода нефтяного месторождения
S8	*Bacillus licheniformis*	Озеро Эльтон, Волгоградская область, Россия
S10	*Bacillus licheniformis*	Озеро Эльтон, Волгоградская область, Россия
A-6-5	*Pseudomonas fluorescens*	Глубинные горизонты хранилища ЖРО*
C-49-2	*Pseudomonas putida*	Глубинные горизонты хранилища ЖРО
S1a	*Streptomyces albogriseolus*	Озерный сапропель, Татарстан, Россия
S8a	*Streptomyces marokkonensis*	Озерный сапропель, Татарстан, Россия
S15a	*Streptomyces anthocyanicus*	Озерный сапропель, Татарстан, Россия
S29a	*Streptomyces euryhalinus*	Озерный сапропель, Татарстан, Россия

* ЖРО – жидкие радиоактивные отходы.

В качестве тест-культур были взяты как прокариотические, так и эукариотические организмы, традиционно использующиеся для проверки антибиотической активности: 1) Грамотрицательные прокариоты: *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*; 2) Грамположительные прокариоты: *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus*; 3) эукариоты: *Yarrowia lipolytica* (табл. 3).

Таблица 3 – Тест-культуры, использованные в работе

№ штамма	Вид штамма	Окраска по Граму
K12 (MG1651)	*Escherichia coli*	G–
4.8.1.	*Pseudomonas aeruginosa*	G–
209P	*Staphylococcus aureus*	G+
NCIMB 13267	*Micrococcus luteus*	G+
367-2	*Yarrowia lipolytica*	не применимо

2.2. Методы исследования

В ходе работы был использован ряд микробиологических, биохимических и аналитических методов исследования, включая приготовление питательных сред, микробиологический посев на плотную и в жидкую питательные среды, определение биопленочного роста, а также ряд инструментально-биологических методов определения антимикробной активности культур: посев перпендикулярными штрихами, методы столбиков и дисков, подготовка образцов для световой микроскопии, работа на приборах – микроскопах, pH-метре, хроматографе и др.

Микробиологические исследования, включая морфологическое описание бактерий, было выполнено на базе лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Молекулярные исследования проводили в ЦПК «Геном» Института Молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Фотографии на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) были сделаны в МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.2.1. Идентификация чистых культур

Чистые бактериальные культуры были идентифицированы путем анализа гена 16S рРНК. Выделение ДНК, амплификацию и секвенирование генов 16S рРНК были проведены, как описано ранее [55]. Ген 16S рРНК был амплифицирован с использованием праймеров 8f-1492r и использовался для секвенирования ДНК с праймерами 8f, 519r, 519f и 1492r. Предварительный анализ генов 16S рРНК был проведен с использованием программного обеспечения NCBI GenBank. Последовательности были отредактированы с использованием BioEdit (http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

2.2.2. Культивирование прокариот

Для поддержания чистоты культур, наращивания биомассы, проведения тестов, изучения влияния факторов внешней среды (pH, T°C, содержание NaCl) на рост исследуемых культур для аэробных штаммов микроорганизмов использовали следующие среды:

1) Plate Count (PC, среда 464 в коллекции DSMZ) следующего состава (г/л): бакто-пептон – 5.0; дрожжевой экстракт (д/э) – 2.5; глюкоза – 1.0; NaCl – 1.0; pH 7.0. Для получения плотной среды (PCA) добавляли 21 г агара/л среды (https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms).

2) Среда Адкинса следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.75; K_2HPO_4 – 1.5; NH_4Cl – 1.0; NaCl – 1.0; KCl – 0.1; $MgSO_4$ – 0.2; $CaCl_2$ $2H_2O$ – 0.02; pH 7.0–7.2. [23]. Дополнительно в среду вносили глюкозу (5 г/л) и микроэлементы по Пфеннигу и Липперту [60] (1 мл/л). Для получения плотной среды добавляли 21 г агара/л среды.

3) Мясопептонный агар (МПА) следующего состава на (г/л): мясной экстракт – 11.0; пептон – 10.0; NaCl – 5.0.

4) Актинобактерии культивировали на агаризованной питательной среде «Минеральный агар 1» («Гаузе-1») следующего состава (г/л): K_2HPO_4 –

0.5; $MgSO_4$ – 0.5; KNO_3 – 1; NaCl – 5; $FeSO_4$ – следы; крахмал – 20; агар – 20; pH 7.2–7.4 [6].

Дополнительно в среду вносили глюкозу (1 г/л) и микроэлементы по Пфеннигу и Липперту [60] (1 мл/л). Для лучшей растворимости крахмала в воде к 2 г крахмала добавляли 10 мл холодной воды, а затем 90 мл горячей (95–98°С) и кипятили в течение 1 минуты.

5) Среда LB с добавлением 15 г агара/л среды (Helicon, Россия), pH 7.0.

6) Среда Rich следующего состава (г/л): сахароза – 1; дрожжевой экстракт – 1; гидролизат казеина – 1; $CaCO_3$ – 1; пептон – 2; глицерин – 10; агар – 20; pH 7.0–7.2.

Численность микроорганизмов в пробах определяли посевом в жидкие питательные среды методом предельных десятикратных разведений в двух повторностях. Посевы инкубировались при соответствующей природным условиям температуре от 3 до 7 суток в зависимости от группы микроорганизмов. Результаты посева оценивают методом наиболее вероятного числа по таблице Мак-Креди [20].

2.2.3. Определение антимикробной активности прокариот

Для определения антимикробной активности исследуемых образцов по отношению к тест-культурам использовали методы перпендикулярных штрихов, агаровых блочков и бумажных дисков.

Определение антибиотической активности микроорганизмов, выросших на плотных (агаризованных) средах основано на подсеве к выросшему штамму-антагонисту тест-культуры.

При методе перпендикулярных штрихов исследуемую культуру высеивали на твердую питательную среду РСА полосой толщиной не более 3–5 мм по центру чашки Петри с отступами по краям не более 5 мм. Инкубировали посевы в термостате 1–3 суток (в зависимости от исследуемого штамма) при температуре 28–30°С. После инкубации

производили подсев тест-культур перпендикулярно исследуемому штамму с отступом от основного посева 1–2 мм. Культивировали при 24°С до 7 суток с ежедневной оценкой противомикробной активности. Оценка результата производилась путем визуального измерения расстояния между штрихом исследуемого штамма и подсеянными тест-культурами после стационарной инкубации [7].

При использовании метода агаровых блочков производили посев исследуемой культуры в плотную питательную среду РСА сплошным «газоном». После инкубации в течении 3–7 суток (в зависимости от исследуемого штамма), когда бактерии хорошо выросли и образовали антимикробное вещество, пробочным сверлом диметром 1 см вырезали из агара с образцом блочки, которые переносили на поверхность другой агаровой пластинки в чашке Петри, где предварительно была посеяна сплошным «газоном» тест-культура, на равное расстояние друг от друга. Чашки с агаровыми блочками инкубировали стационарно в термостате при 24°С до 7 суток. Результат оценивали по зоне отсутствия или задержки роста тест-культуры вокруг агарового блочка [7].

Определение антибиотической активности микроорганизмов, при культивировании их в жидких питательных средах основано на том, что антимикробные вещества, как правило, являются экзометаболитами и выделяются штаммами-продуцентами в культуральную жидкость.

Для метода бумажных дисков использовали культуральную жидкость исследуемых штаммов, которую получали, используя жидкую питательную среду РСА в течение 3–7 суток в зависимости от изучаемой культуры. После того, как бактерии хорошо выросли и образовали антимикробное вещество, которое накопилось в среде, культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин. Отделяли супернатант в эппендорф и опускали в него предварительно подготовленный стерильный диск из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм. Смоченные диски раскладывали на поверхности агаровой пластинки, предварительно

засеянной сплошным «газоном» тест-культурой (за 1–2 суток). Культивировали чашки при 24°С до 7 суток с ежедневной оценкой противомикробной активности. Результат оценивали по изменению зоны подавления роста тест-культуры вокруг диска (измеряли диаметр зоны подавления) [7].

Этот же метод использовали для оценки действия на тест-культуры препаратов антибиотиков производства HiMedia (Индия): Канамицина К 30 мкг/диск. Эритромицина Е 15 мкг/диск и Гентамицина 10 мкг/диск, которые представляли собой плотные диски (диаметром 6 мм), пропитанные раствором антибиотиков.

2.2.4. Определение физиологических свойств чистых культур

Температурный интервал роста.

При изучении физиологических особенностей чистых бактериальных культур определены интервалы и оптимумы роста при различных значениях температуры. Была использована жидкая питательная среда РСА. Посев проводился во флаконах с ватными пробками, в двух повторностях. Инкубировали посевы в стационарных условиях при: 5, 10, 15, 20, 24, 30, 37, 42, 48, 55 и 60°С в течение 3–5 суток. Рост оценивали по накоплению биомассы в культуральной жидкости.

Рост при различной концентрации хлорида натрия в среде.

Для определения интервалов и оптимумов роста бактериальных культур при различных концентрациях NaCl в среде была использована жидкая питательная среда РСА с различным содержанием NaCl (от 0 до 120 г NaCl /л). Посевы производили во флаконах с ватными пробками в двух повторностях. Инкубировали посевы стационарно в течение 5-и суток при 24°С. Рост оценивали по накоплению биомассы в культуральной жидкости.

Способность бактериальных штаммов расти в микроаэрофильных условиях определяли в жидкой питательной среде РС в пенициллиновых флакончиках с резиновой пробкой. Создавали газовую фазу из аргона с

различным содержанием кислорода: во флакончики вносили по 1, 2, 5, 7.5, 10 мл воздуха, что соответствует 1.3, 2.7, 6.7, 10 и 13.3% кислорода в пересчёте на объём воздушной фазы флакончика. В качестве контролей использовались флакончики с газовой фазой – аргон и газовой фазой – воздух. Состав газовой фазы контролировали на хроматографе. Посевы инкубировали при постоянной комнатной температуре 24°С 5–7 суток.

Исследование планктонного и биопленочного роста чистых культур проводили с помощью МТТ-теста [61]. Штаммы-продуценты антимикробных веществ выращивали в течение 5–7 суток в жидкой питательной среде РС в присутствии твердых носителей для формирования пленок: тефлоновых кубиков со стороной 4.0 мм и стальных купонов 10х10х1.5 мм. Рост планктонной бактериальной культуры и формирование биопленок на носителях определяли по окраске клеток раствором МТТ (тиазолил синий/тетразолия бромид) с последующим экстрагированием образовавшегося формазана химически чистым диметилсульфоксидом (ДМСО) (Dimetilsulfoxide).

Приготовленную соответственно эксперименту стерильную питательную среду (РС) подогревали до 40°С и вносили в нее МТТ в количестве, соответствующем конечной концентрации при добавлении к планктонной культуре или к носителю с биопленками – 0.1%.

В инкубационных флаконах проводили разделение водной фазы (планктонной культуры) и твердой фазы (носителя с биопленками). К 5 мл культуральной жидкости (планктонной культуре) добавляли 5 мл 0.2 % раствора МТТ. К твердой фазе (биопленке) добавляли 5 мл 0.1% раствора МТТ в среде. Инкубировали планктонную культуру и биопленки в течение 2–3 часов при 24°С.

После инкубации планктонную культуру центрифугировали в течение 15 мин при 7000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость и к осадку добавляли 5 мл ДМСО. Носители с биопленками промывали 2 раза стерильной водопроводной водой и добавляли 5 мл ДМСО. Для экстракции

формазана в ДМСО оставляли все флаконы в темноте на сутки. Далее измеряли оптическую плотность экстрактов (экстрагированного в ДМСО формазана) на спектрофотометре при λ=540 нм. Контролем служил холостой опыт без клеток.

2.2.5. Микроскопические методы исследования

Световая микроскопия. Для определения наличия клеток в жидкой питательной среде и изучения морфологии бактерий проводили приготовление живого препарата, методом «раздавленная капля» и использовали световой микроскоп Olympus с фазово-контрастным устройством, при увеличении 100х10 с добавлением иммерсионного масла. Чистые культуры микроскопировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axio Imager.D1 ("CarlZeiss". Германия) с цифровой камерой AxioCamHRc и компьютерным программным обеспечением AxioVision, позволяющими определить размер клеток. Препараты для микроскопии готовили методом «раздавленная капля» путем внесения взвеси микроорганизмов на предметное стекло и прижиманием покровным стеклом данной капли. Иммерсионное масло капается на покровное стекло.

Сканирующая микроскопия. Для получения фотографий в сканирующем микроскопе культуры наращивали в соответствующих жидких средах или на металлических купонах для получения биопленочного роста. Среду декантировали, а биомассу на купонах дважды промывали фосфатным буфером (pH 7.0), поэтапно обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (от 30 до 100%). Затем дважды отмывали образцы в 100% ацетоне и высушивали в критической точке с помощью специальной камеры. Высушенные препараты монтировали на специальные столики, а затем напыляли на них тонкий слой металла для создания токопроводящего покрытия. Полученные образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 20 кВ при увеличениях 6500х, 15000х, 35000х.

2.2.6. Аналитические методы исследования

Определение прироста биомассы. Прирост биомассы в жидкой среде оценивали по величине оптической плотности (OD_{660}), которую измеряли на спектрофотометре «Ultrospec 2100 pro» (Amersham Biosciences, UK) в кюветах с длинной оптического пути 1 см и при длине волны λ=660 нм. В качестве контроля использовалась дистиллированная вода.

Определение экстрагированного формазана проводили на спектрофотометре «Ultrospec 2100 pro» (Amersham Biosciences, UK) в кюветах с длинной оптического пути 1 см и при длине волны λ=540 нм. В качестве контроля использовалась дистиллированная вода.

Величину pH определяли с помощью pH–метра-иономера «S220 SevenCompact» (MettlerToledo, Швейцария), снабженного комбинированным электродом. Электрод стандартизовали, используя буферные растворы (pH 4.01; pH 7.00; pH 9.21) (MettlerToledo, Швейцария).

Состав газовой фазы определяли на хроматографе «Кристалл 5000.2» (Хроматэк, Россия), снабженном детектором по теплопроводности, на колонке размером 2.0 м × 0.3 см, заполненной молекулярным ситом CaA. Температура колонки составляла 100°C, испарителя – 100°C, детектора – 150°C. Аргон, служивший в качестве газа-носителя, подавали под давлением 180 кПа.

2.2.7. Статистические методы

Статистический анализ полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Excel, в которой были составлены таблицы, произведены необходимые математические вычисления, построены графики и рассчитаны доверительные интервалы.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Культуральные и морфологические особенности исследованных в работе микроорганизмов

На первом этапе работы было проведено описание культуральных и морфологических признаков исследованных в работе чистых бактериальных культур, а также тест-культур, с целью выявления особенностей их роста на плотных питательных средах.

Бактерии рода *Bacillus* в работе были представлены видами: *B. cereus* (штаммы 2-13 и 62) и *B. Lioheriformis* (штаммы S8 и S10).

Колонии штаммов рода *Bacillus* округлой формы с неровным краем, бледно-желтого цвета, с гладкой глянцевой поверхностью, имели выпуклый профиль и однородную структуру. Размеры колоний не превышали 0.5–0.7 см в диаметре (после 5 суток роста). Рост на плотной питательной среде поверхностный. Консистенция колоний густая, при снятии с питательной среды биомасса не тянется (рис. 3).

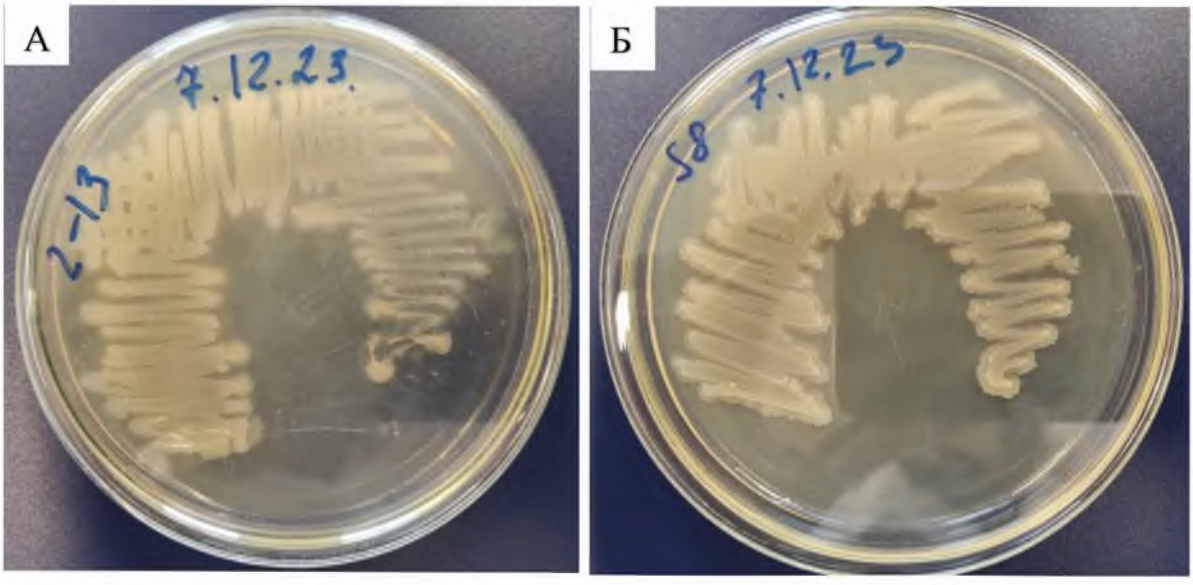


Рисунок 3. Рост на плотной питательной среде бактерий Bacillus cereus 2-13 (А) и Bacillus licheriformis S8 (Б).

Клетки исследуемых бактерий рода *Bacillus* имели вид палочек, размеры которых на плотной питательной среде составляют: ширина 0.3–0.5 мкм, длина до 5 мкм (рис. 4). Клетки подвижные, преобладали движения по прямой, что свидетельствовало о наличии жгутика, расположенного монотрихиально. Клетки грамположительные.

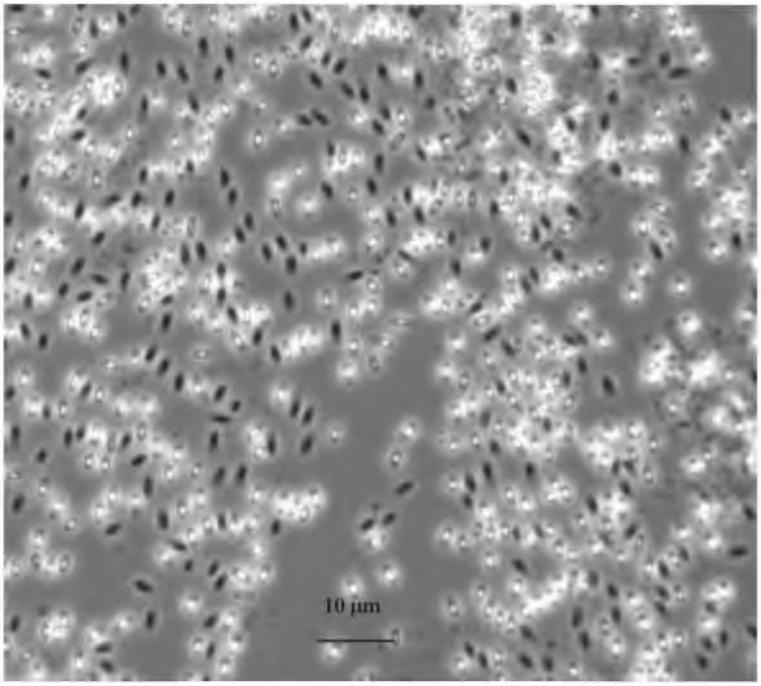


Рисунок 4. Bacillus cereus 2-13 под световым микроскопом, увеличение 100x10.

Бактерии рода *Pseudomonas* были представлены в работе видами: *P. fluorescens* (штамм А-6-5) и *P. putida* (штамм С-49-2).

Изученные штаммы имели следующие культуральные особенности: колонии округлые с ровным краем, светло-желтого цвета, однородные, выпуклые по профилю, поверхность гладкая блестящая (рис. 5). Колонии имели размер 2–3 мм в диаметре (после 5 суток роста). На плотной питательной среде рост поверхностный. Консистенция колоний густая, при снятии со среды биомасса не тянулась.

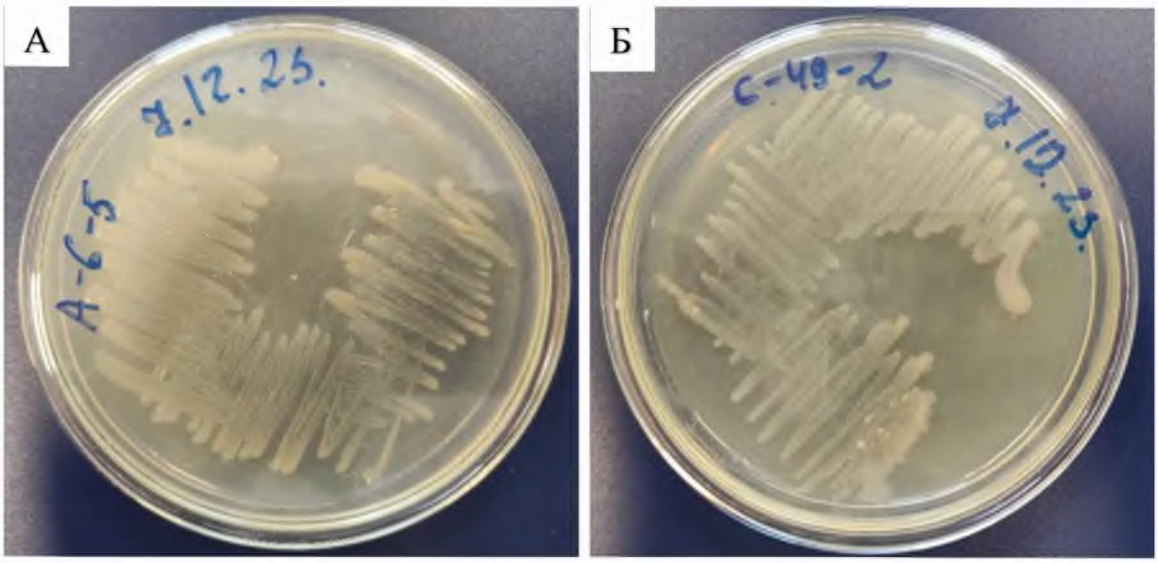


Рисунок 5. Рост на плотной питательной среде бактерий Pseudomonas fluorescens A-6-5 (А) и Pseudomonas putida C-49-2 (Б).

Клетки бактерий рода *Pseudomonas* имели вид палочек, размеры которых на плотной питательной среде составляли: ширина 0.2–0.3 мкм, длина до 3 мкм (рис. 6). Клетки подвижные, движения преобладали по прямой, что свидетельствовало о наличии жгутика, расположенного монотрихиально. Окраска клеток по Граму – отрицательная.

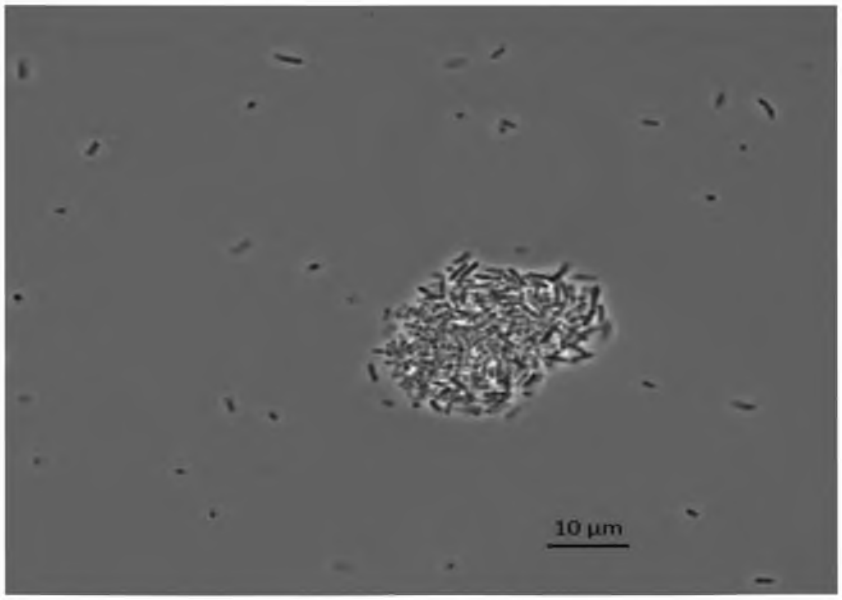


Рисунок 6. Pseudomonas putida C-49-2 под световым микроскопом, увеличение 100x10.

Микроорганизмы рода *Streptomyces* были представлены в работе следующими видами: *S. albogriseolus* (штамм S1a), *S. marokkonensis* (штамм S8a), *S. anthocyanicus* (штамм S15a) и *S. euryhalinus* (штамм S29a).

Колонии стрептомицетов на среде Гаузе-1 округлые, с ровным краем, однородные, матовые, воздушный мицелий бледно–белого цвета, субстратный – бесцветный, растворимого пигмента не образовывали. Колоний имели размер 5–10 мм в диаметре (после 5 суток роста). По профилю колонии: выпуклые, поверхность шероховатая, консистенция плотная, при снятии с агара не тянулись, а снимались целиком с субстратным мицелием (рис. 7А).

В световом микроскопе стрептомицеты имели вид разветвленного мицелия диаметром 0.5–2.0 мкм (рис. 7Б). Гифы бактерий не подвижны. Окраска клеток по Граму – положительная.

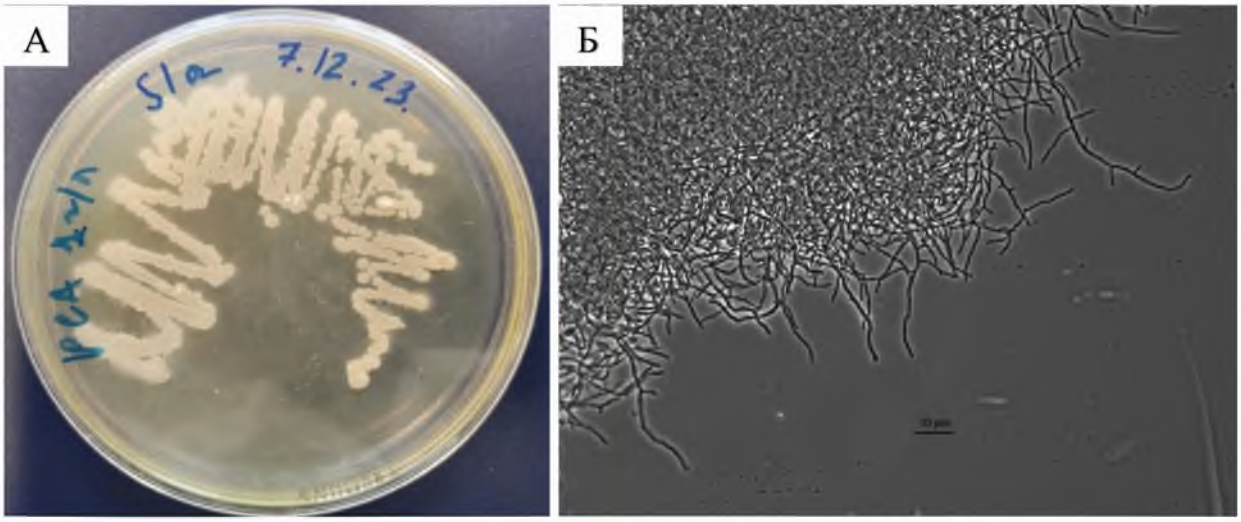


Рисунок 7. Рост бактерий Streptomyces albogriseolus S1a на плотной питательной среде (А) и вид под световым микроскопом (Б), увеличение 100x10.

В таблице 4 представлены сводные сведения по культуральным и морфологическим характеристикам ряда исследованных штаммов.

Таблица 4 Культуральные особенности исследованных штаммов

Признак	Штамм				
	Bacillus cereus 2-13	*Pseudomonas putida* С-49-2	*Bacillus licheniformis* S10	*Streptomyces euryhalinus* S29a	*Streptomyces albogriseolus* S1a
Рост на плотной среде	поверхност.	поверхност.	поверхност.	поверхност.	поверхност.
Размер колоний	2–3 мм	5 мм	2–3 мм	5–10 мм	1–2мм
Цвет колоний	бледно-желтый	бледно-желтый	светло-желтый	бледно-белый	белый
Форма колоний	округлая	округлая	округлая	округлая	округлая
Профиль колоний	выпуклый	выпуклый	выпуклый	выпуклый	выпуклый
Поверхность колоний	гладкая	гладкая	шероховатая	шероховатая	шероховатая
Блеск колоний	блестящая	блестящая	матовая	матовая	матовая
Края колоний	гладкие	гладкие	гладкие	шероховатые	шероховатые
Структура колоний	однородная	однородная	однородная	не однородная	не однородная
Консистенция биомассы	густая, при снятии с агара тянется	густая, при снятии с агара тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, тяжело снимается с агара	густая, тяжело снимается с агара
Рост по штриху	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с неровным краем	сплошной с волнистым краем	сплошной с волнистым краем
Выделение раств.пигмента	нет	нет	нет	нет	нет

Таким образом, в работе были исследованы разнообразные по своим свойствам бактерии, в том числе мицелиальные, по литературным данным являющиеся продуцентами антимикробных веществ.

Далее рассмотрим тест-культуры, которые были использованы в работе.

Колонии бактерий *Escherichia coli* штамм K12 округлые, однородные, с ровным краем, бледно-желтого цвета, имеющие блеск (рис. 8А). Размер колоний не превышает 0.1–0.3 мм в диаметре. Рост колоний на плотной питательной среде поверхностный. По профилю колоний выпуклые, поверхность гладкая. Консистенция исследуемых колоний густая, при снятии с питательной среды биомасса не тянется.

Клетки *Escherichia coli* K12 имеют вид палочек, размеры которых на плотной агаризованной среде составляли: ширина 0.3–0.5 мкм, длина до 3 мкм (рис. 8Б). Бактерии подвижны, движения преобладают по прямой и по своей оси, что свидетельствует о наличии жгутиков, расположенных перетрихиально. Клетки грамотрицательные.

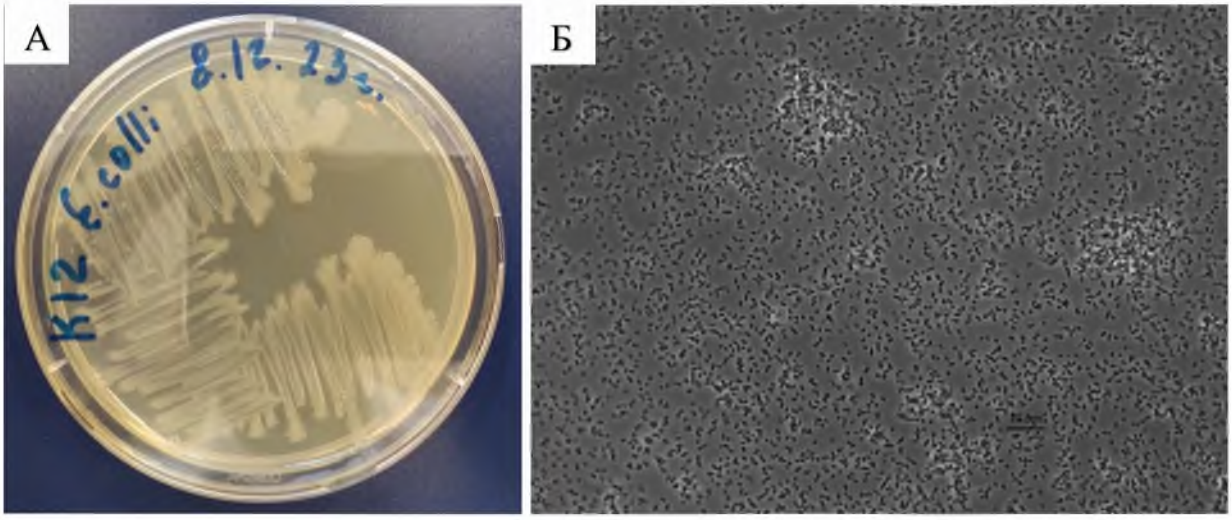


Рисунок 8. Рост бактерий Escherichia coli K12 на плотной питательной среде (А) и вид под световым микроскопом (Б), увеличение 100х10.

Колонии бактерий *Staphylococcus aureus* штамм 209Р округлые, с ровным краем, однородные, светло–желтого цвета, блестящие (рис. 9А). Диаметр колоний на плотной питательной среде составлял 0.2–0.5 мм. Рост поверхностный. По профилю колонии выпуклые с гладкой поверхностью и густой консистенцией, при снятии с питательной среды биомасса не

тянулась. Клетки *Staphylococcus aureus* 209P кокковидные, от 0.5 до 1 мкм в диаметре, не подвижные, грамположительные (рис. 9Б).

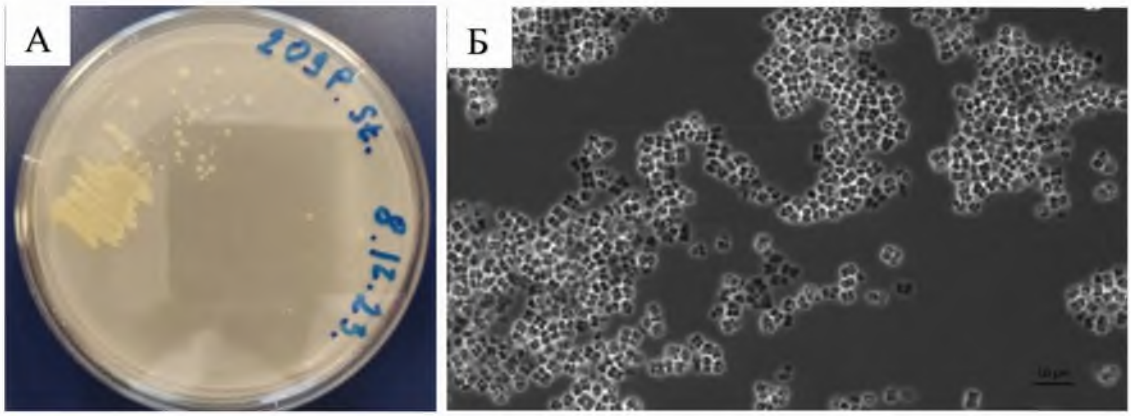


Рисунок 9. Рост бактерий Staphylococcus aureus 209P на плотной питательной среде (А) и вид под световым микроскопом (Б), увеличение 100х10.

Колонии бактерий *Micrococcus luteus* штамм NCIMB 13267 округлые, однородные, с ровным краем, желтого цвета, имеющие блеск (рис. 10А). Размер колоний не превышал 1–2 мм в диаметре. На плотной питательной среде рост поверхностный. По профилю колонии выпуклые, поверхность гладкая. Консистенция колоний густая, при снятии с питательной среды биомасса не тянулась.

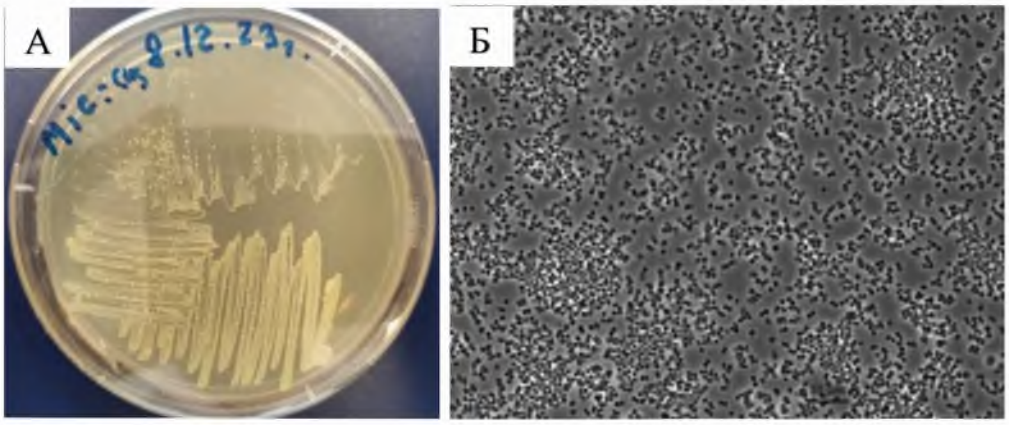


Рисунок 10. Рост бактерий Micrococcus luteus NCIMB 13267на плотной питательной среде (А) и вид под световым микроскопом (Б), увеличение 100х10.

Клетки штамма NCIMB 13267 имели вид кокков, образующих тетрады. Размеры клеток – 0.3–0.7 мкм в диаметре. Бактерии неподвижны, грамположительные (рис. 10Б).

Колонии бактерий *Pseudomonas aeruginosa* штамм 4.8.1. округлые, с ровным краем, светло–желтого цвета, имеющие блеск, размеры не превышали 10 мм в диаметре. На плотной питательной среде рост поверхностный. По профилю колонии выпуклые, поверхность гладкая. Консистенция колоний густая, при снятии с питательной среды биомасса не тянулась (рис. 11А).

Клетки штамма штамм 4.8.1. имели вид палочек, размеры которых на плотной агаризованной среде составляли в ширину 0.3–0.5 мкм, в длину до 3 мкм (рис. 11Б). Клетки подвижные, движения преобладали по прямой и по своей оси, что свидетельствовало о наличии жгутиков, расположенных монотрихиально. Бактерии грамотрицательные.

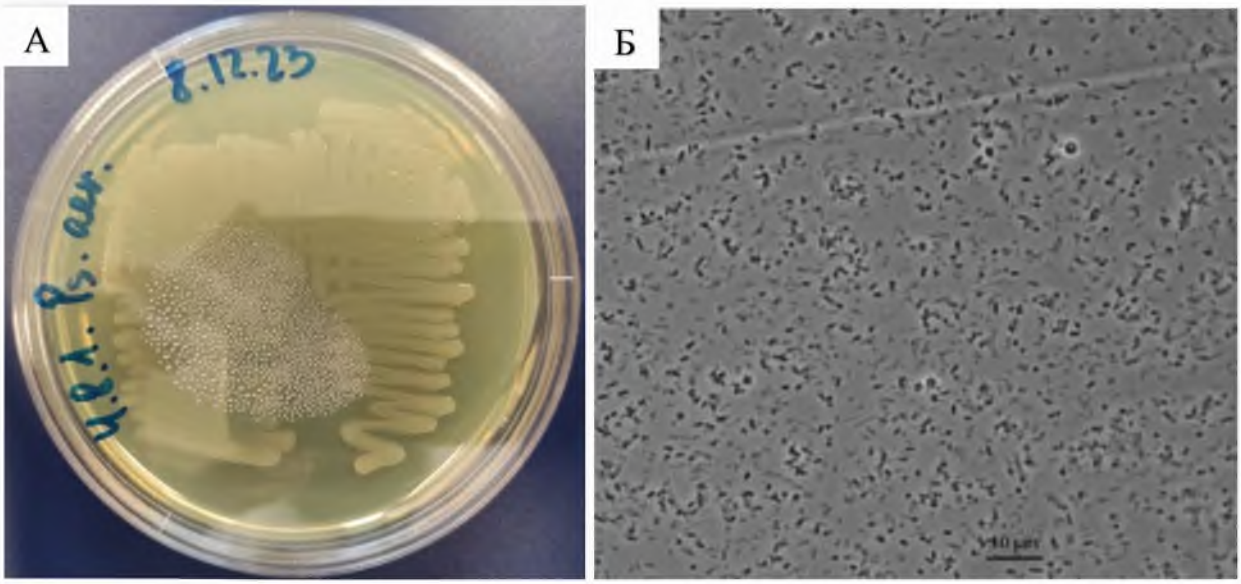


Рисунок 11. Рост бактерий Pseudomonas aeruginosa 4.8.1на плотной питательной среде (А) и вид под световым микроскопом (Б), увеличение 100х10.

Колонии дрожжи *Yarrowia lipolytica* штамм 367-2 матовые, округлые, с неровным краем, бело-желтого цвета. Размеры колоний варьировали от 4 до

10 мм в диаметре, имели поверхностный рост на плотной питательной среде. По профилю колонии выпуклые, поверхность шероховатая. Консистенция колоний густая, при снятии с питательной среды биомасса не тянулась (рис. 12). Клетки штамма 367-2 неподвижные, овальные, крупные, размеры их составляли до 2 мкм в диаметре (рис. 13).

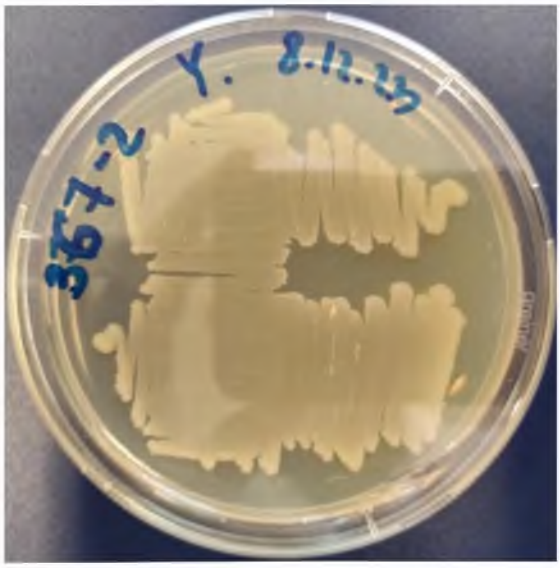


Рисунок 12. Рост на плотной питательной среде дрожжей Yarrowia lipolytica 367-2.

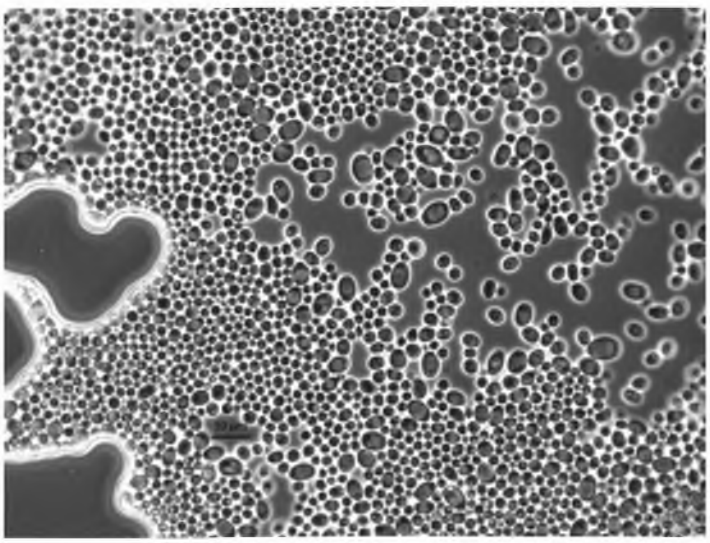


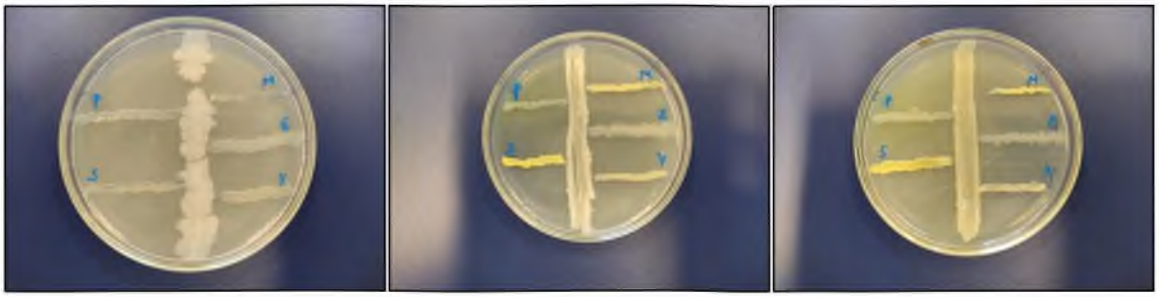
Рисунок 13. Yarrowia lipolytica 367-2 под световым микроскопом, увеличение 100x10.

3.2. Определение антимикробной активности бактерий-продуцентов по отношению к тестовым культурам

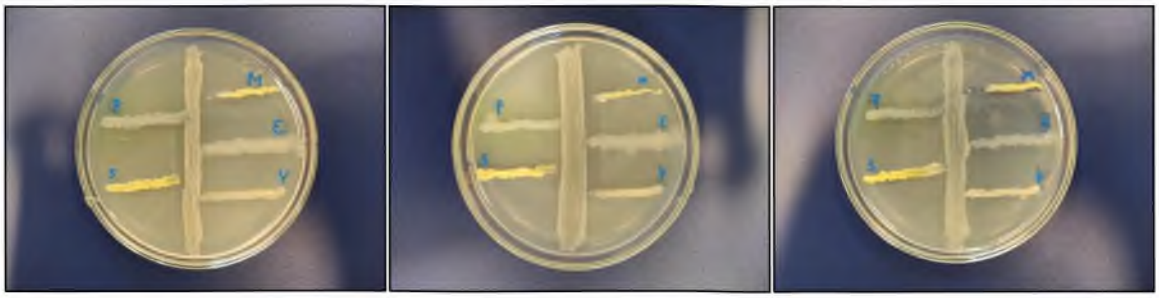
В рамках выполнения основной задачи нашей работы была исследована антимикробная активность всех 10 выбранных штаммов бактерий, принадлежащих родам *Bacillus, Brevibacillus, Pseudomonas* и *Streptomyces* (табл. 2), выросших на плотных питательных средах – «Методом перпендикулярных штрихов» и «Методом агаровых блочков», и выросших в жидкой питательной среде – «Методом бумажных дисков». В качестве тест-культур использовали штаммы *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus* и *Yarrowia lipolytica.*

Все перечисленные биологические методы учета антимикробной активности, так называемые «чашечные методы», основаны на том, что антимикробные вещества широкого спектра действия, образуемые бактериями-продуцентами, как правило, являются экзометаболитами, на их диффузии в субстрат (агар, жидкую среду), и дальнейшее непосредственное воздействие этих метаболитов на живые клетки чувствительного к данному веществу микроорганизма (тест-культуры), задержке или подавлении его роста в зоне диффузии метаболитов [7].

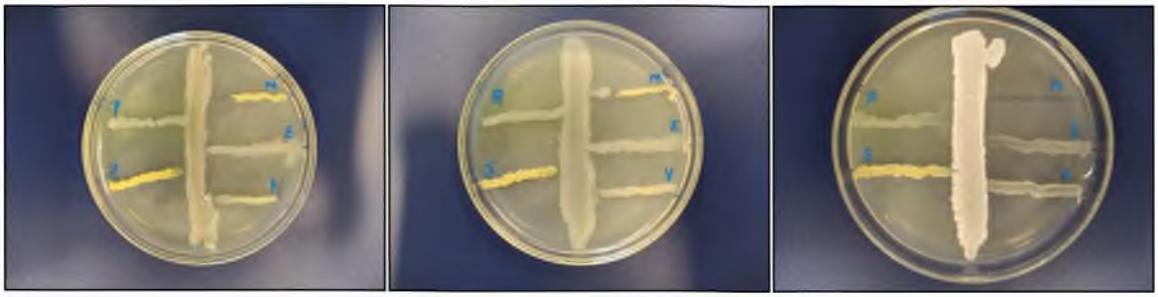
При использовании ***«Метода перпендикулярных штрихов»*** образование штаммами-продуцентами антимикробных веществ и действие их на тест-культуры определяли по длине зоны подавления роста по штриху (рис. 14). Отметим, что было проведено несколько вариантов опыта, в которых были использованы как богатые органические среды (PCA, Rich), так и минеральная среда Адкинса с глюкозой (5 г/л) в качестве единственного источника углерода. Культивировали посевы при комнатной температуре 24–25°С. Измерение зоны подавления роста проводили через 1, 4 и 7 суток.



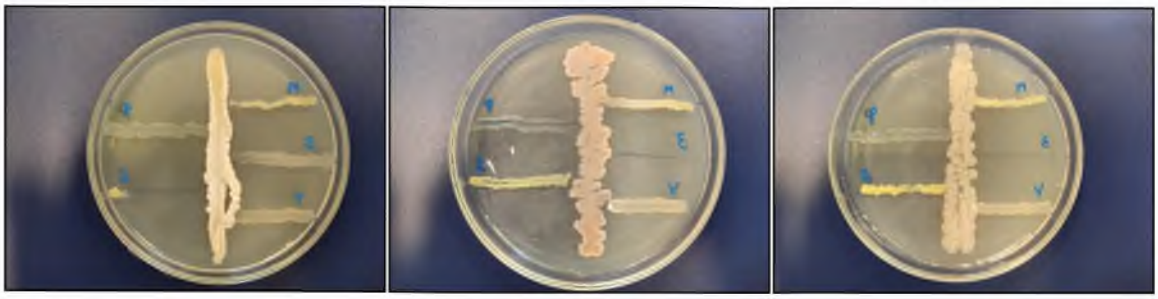
***B.cereus* 2-13** ***B. cereus* 62** ***P. fluorescens* A-6-5**



***Brevibacillus agri* Ar-8-1** ***Brevibacillus agri* Ar-8-2** ***P. putida* C-49-2**



***B. licheniformis* S8** ***B. licheniformis* S10** ***S. albogriseolus* S1a**



***S. marokkonensis* S8a** ***S. anthocyanicus* S15a** ***S. euryhalinus* S29a**

Рисунок 14. Определение антимикробной активности исследуемых штаммов-антагонистов «Методом перпендикулярных штрихов» на среде PCA: ***P*** *– Ps. aeruginosa,* ***S*** *– St. aureus,* ***M*** *– M. luteus,* ***E*** *– E. coli,* ***Y*** *– Y. lipolytica.*

При использовании ***«Метода агаровых блочков»*** и ***«Метода бумажных дисков»*** ширину зоны отсутствия или задержки роста (зоны просветления) тест-культур определяли по формуле: D = (D2 – D1) / 2, где D – ширина зоны подавления роста, D1 – диаметр блочка или диска, D2 – диаметр зоны подавления роста (рис. 15). Примеры посевов методами бумажных дисков и агаровых блочков представлены на рисунках 16, 17 и 18.

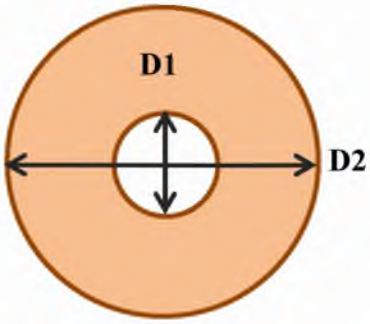


Рисунок 15. Схема измерения области подавления роста тест-культур при росте на плотных питательных средах.

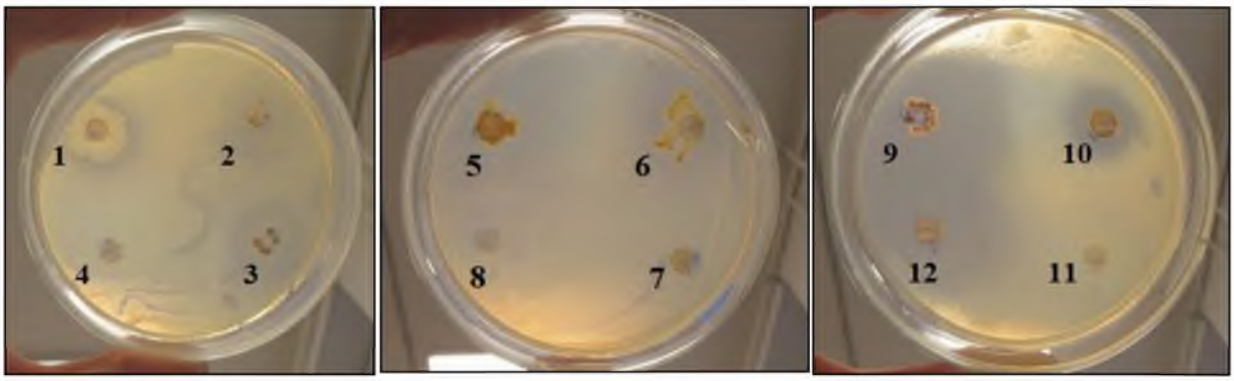


*Рисунок 16. Определение антимикробной активности исследуемых штаммов «Методом бумажных дисков» на среде РСА на тест-культуре Micrococcus luteus. Штаммы-продуценты:: **1** – B. cereus 2-13; **2** – S. marokkonensis S8a; **3** – S. albogriseolus S1a; **4** – S. euryhalinus S29a; **5** – P. putida C-49-2; **6** – P. fluorescens A-6-5; **7** – B. licheniformis S10; **8** – B. cereus 62; **9** – S. anthocyanicus S15a; **10** – B. licheniformis S8; **11** – Br. agri Ar-8-1; **12** – Br. agri Ar-8-2.*

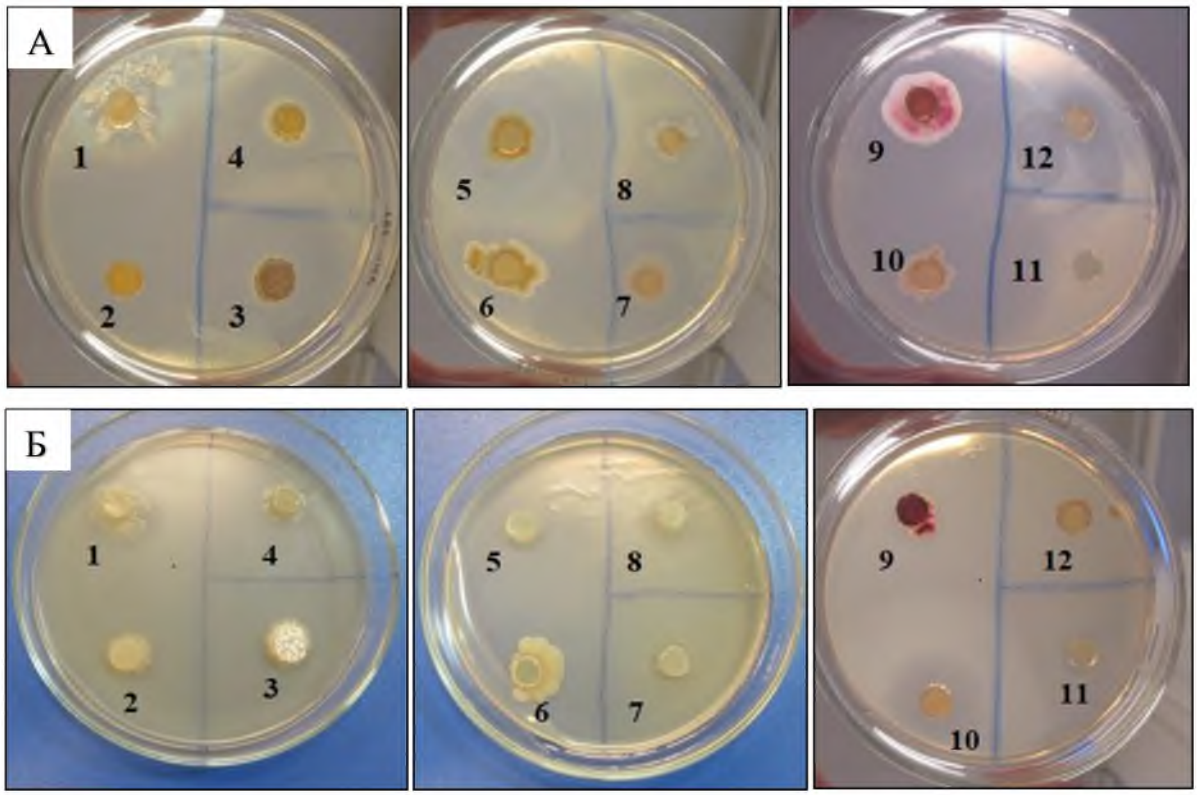


Рисунок 17. Определение антимикробной активности исследуемых штаммов «Методом агаровых блочков» на среде РСА на тест-культурах Micrococcus luteus (А) и Yarrowia lipolytica (Б). Штаммы-продуценты: ***1*** *– B. cereus 2-13;* ***2*** *– S. marokkonensis S8a;* ***3*** *– S. albogriseolus S1a;* ***4*** *– S. euryhalinus S29a;* ***5*** *– P. putida C-49-2;* ***6*** *– P. fluorescens A-6-5;* ***7*** *– B. licheniformis S10;* ***8*** *– B. cereus 62;* ***9*** *– S. anthocyanicus S15a;* ***10*** *– B. licheniformis S8;* ***11*** *– Br. agri Ar-8-1;* ***12*** *– Br. agri Ar-8-2.*

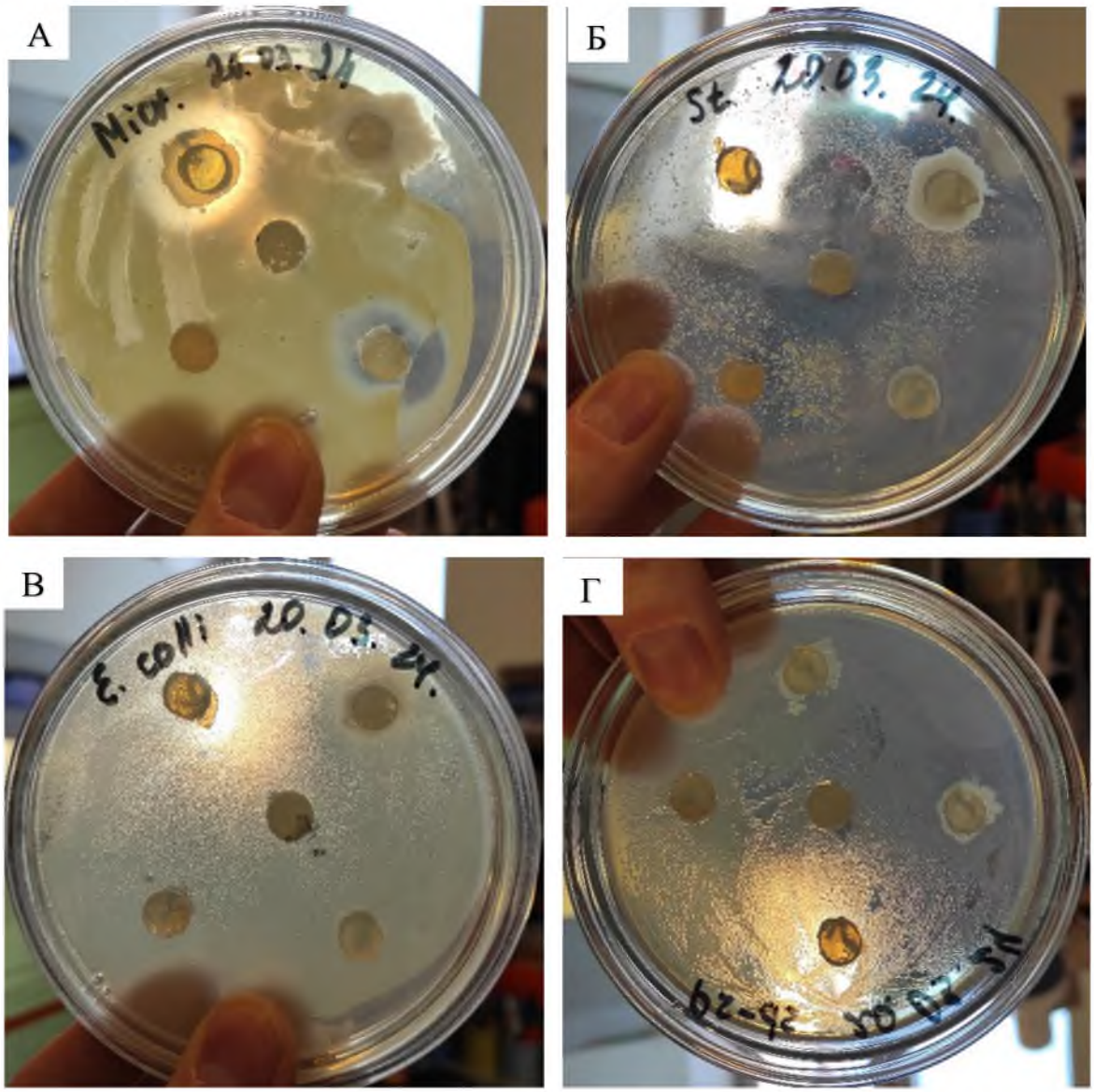


Рисунок 18. «Метод агаровых блочков» на среде Rich на тестовых культурах: Micrococcus luteus (А), Staphylococcus aureus (Б), Escherichia coli (В), Pseudomonas aeruginosa (Г).

Результаты определения бактерицидного (вызывающего гибель) или бактериостатического (задерживающего рост и размножение) действия исследуемых штаммов-продуцентов на тест-культуры «чашечными методами» представлены в сводной таблице

Таблица 5 – Антимикробная активность исследованных штаммов

Штамм-продуцент	Тест-культуры															
	M. luteus NCIMB 13267			*St. aureus* 209P			*P.aeruginosa* 4.8.1.			*E. coli* K12 (MG1651)			*Y. lipolytica* 367-2			Примечание****
	штрих	диск	блочок	штрих	диск	блочок	штрих	диск	блочок	штрих	диск	блочок	штрих	диск	блочок	
B. cereus 2-13	+*	+ 7/7**	+ 4***	–	+ 1/3	–	–	–	–	–	+/– 0.5/2	+/–	–	–	+/– 4-7	10^7
B. cereus 62	–	+/– 0/3	+ 1-2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+/–	–	–	10^6
B. licheniformis S8	+	+ 6/1.5	+ 12-16	+/–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+ 8	10^6
B. licheniformis S10	+	+/– 0/2	+ 5-6	–	+ 2/0	+/– 5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	105
P. fluorescens A-6-5	+	+ 3/4.5	+ 5-7	–	+ 1.5/0	+/–	–	–	–	–	+/– 1.5/1	–	–	+/– 1/0	+/–	$\geq 10^9$
P. putida C-49-2	+	+ 7/0	+ 4-6	+/–	+ 1/0.5	+ 5-7	+/–	–	–	–	+/– 1.5/1	–	–	+/– 1.5/0	–	$\geq 10^9$
S. albogriseolus S1a	+	+ 8.5/1	+ 7-8	–	+ 0.5/1	+ 0.5	+/–	+ 0/2.5	+ 10	+	–	–	–	+ 2/0	–	10^6
S. marokkonensis S8a	+/–	–	+ 8	+	–	–	+/–	–	–	+/–	–	–	–	–	–	10^6
S. anthocyanicus S15a	–	+ 1.5/4.5	+ 5-6	–	+ 1/0.5	–	+/–	–	–	+	–	–	–	–	–	10^6
S. euryhalinus S29a	–	– 0.5/0	+ 5	–	–	–	+/–	–	–	+	–	–	–	–	–	10^4

* + полное подавление роста (бактерицидное действие), +/– слабое подавление роста (бактериостатическое действие), – нет подавления роста, цифры – ширина зоны подавления роста (D).

** ширина зоны подавления роста (мм) на среде Адкинса / на РСА.

*** на среде РСА.

**** плотность культуральной жидкости (кл/мл, для стрептомицетов КОЕ/мл), которую использовали для теста с дисками.

При исследовании штаммов микробных культур на антимикробную активность (табл. 5), методами перпендикулярных штрихов, а также методами агаровых блочков и бумажных дисков было установлено что:

- Изучаемые штаммы-продуценты показали полное подавление тестовой культуры *Micrococcus luteus* NCIMB 13267, кроме бактерий рода *Streptomyces* (штаммы: S8a, S15a и S29a). Ширина зоны подавления роста варьировала от 1 мм (*B. cereus* 62) до 12–16 мм (*B. licheniformis* S8) (рис. 16–18).
- По отношению к тестовой культуре *Staphylococcus aureus* 209P штаммы-продуценты действовали по-разному, однако бактерии рода *Bacillus* (штаммы: 2-13, 62, S8 и S10) не смогли подавить рост тест-культуры.
- Посевы на тестовой культуре *Pseudomonas aeruginosa* 4.8.1. показали, что только бактерии рода *Streptomyces* (штаммы: S1a, S8a, S15a и S29a) вызывали ее подавление.
- Посевы на тестовой культуре *Escherichia coli* K12так же показали подавление ее роста только при бактериях рода *Streptomyces*.
- На тестовой культуре дрожжей *Yarrowia lipolytica* 367-2 бактерии-продуценты показали слабые результаты, бактерии рода *Pseudomonas* (штаммы: A-6-5 и C-49-2) смогли частично подавить рост данной тест-культуры.
- Бактерии *B. cereus* 2-13, *B. licheniformis* S10, *P. putida* C-49-2, *S. albogriseolus* S1a проявляли высокую антимикробную активность по отношению к тестовым культурам, например, ширина зоны подавления, полученная методами блочков и бумажных дисков, для этих культур составляла 2–8 мм. Однако для тестовой культуры *P. aeruginosa* 4.8.1. подавление роста отсутствовало или было слабым, что указывает на высокую резистентность этих бактерий к штаммам-антагонистам. Другие исследуемые штаммы-продуценты показали незначительное подавление роста тестовых культур.

На основании полученных результатов была составлена сводная таблица действия штаммов-продуцентов антимикробных веществ на тест-культуры (табл. 6).

Таблица 6 – Действие штаммов-продуцентов антимикробных веществ на тест-культуры

Штамм-продуцент	Действуют сильно на	Действуют слабо на
Bacillus cereus 2-13	***Micrococcus luteus***, *Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli* , *Yarrowia lipolytica*
Bacillus cereus 62	*Micrococcus luteus*	*Yarrowia lipolytica*
Bacillus licheniformis S8	***Micrococcus luteus,*** *Yarrowia lipolytica*	*Staphylococcus aureus,*
Bacillus licheniformis S10	***Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus***	
Pseudomonas fluorescens A-6-5	***Micrococcus luteus,*** *Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli, Yarrowia lipolytica*
Pseudomonas putida C-49-2	***Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus***	*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli , Yarrowia lipolytica*
Streptomyces albogriseolus S1a	***Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa,*** *Escherichia coli, Yarrowia lipolytica*	*Mucilaginibacter polytrichastri, Microbacterium phyllosphaerae*
Streptomyces marokkonensis S8a	***Staphylococcus aureus,*** *Micrococcus luteus*	*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*
Streptomyces anthocyanicus S15a	***Micrococcus luteus,*** *Staphylococcus aureus,* ***Escherichia coli***	*Pseudomonas aeruginosa*
Streptomyces euryhalinus S29a	*Micrococcus luteus,* ***Escherichia coli***	*Pseudomonas aeruginosa, Mucilaginibacter polytrichastri, Microbacterium phyllosphaerae*

*выделены тест-культуры, к которым штамм-продуцент проявлял особенно высокую активность.

Культуры, которые проявили высокую антимикробную активность можно считать штаммами-антагонистами. Из 10 исследуемых штаммов было выделено 5, которые показали наибольшую результативность во время тестов и посевов на антимикробную активность различными методами. Это бактерии видов: *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10, *Pseudomonas putida* C-49-2, *Streptomyces albogriseolus* S1a и *Streptomyces euryhalinus* S29a. Т.к. мицелиальные актинобактерии рода *Streptomyces* являются активными продуцентами антибиотиков и достаточно хорошо изучены, для дальнейшего подробного исследования физиологических особенностей были взяты три штамма 2-13, S10 и C-49-2.

3.3. Реакция тест-культур на препараты антибиотиков

Для интерпретации результатов «чашечных методов» тест-культуры были проверены на действие на них препаратов антибиотиков. Для этого были использованы диски (D1 = 6 мм) с антибиотиками производства HiMedia (Индия): канамицин 300 мг/диск; гентамицин 10 мг/диск; эритромицин 15 мг/диск.

Природным продуцентом Эритромицина Е – бактериостатического антибиотика из группы макролидов – являются почвенные актинобактерии *Streptomyces erythreus*. Спектр действия включает грамположительные микроорганизмы: *Staphylococcus* spp., продуцирующие и не продуцирующие пенициллиназу, в том числе *Staphylococcus aureus; Streptococcus* spp. (в том числе *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes)*, альфа-гемолитический стрептококк (группы *Viridans*), *Bacillus anthracis, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium minutissimum;* грамотрицательные микроорганизмы: *Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae, Campylobacter jejuni, Bordetella pertussis, Brucella* spp., *Legionella* spp., в том числе *Legionella pneumophila* и другие микроорганизмы: *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Treponema* spp., *Rickettsia* spp., *Entamoeba histolytica, Listeria monocytogenes.* К препарату устойчивы

грамотрицательные палочки: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* а также *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Bacteroides fragilis, Enterobacter* spp..

Природным продуцентом Гентамицина – антибиотика группы аминогликозидов широкого спектра действия – являются актинобактерии рода *Micromonospora.* Высокоактивен в отношении аэробных грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli, Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter* spp.. Активен также в отношении аэробных грамположительных кокков: *Staphylococcus* spp., некоторых штаммов *Streptococcus* spp.. К гентамицину устойчивы *Neisseria meningitidis, Treponema pallidum,* некоторые штаммы *Streptococcus* spp., анаэробные бактерии.

Природным продуцентом Канамицин К – аминогликозидного антибиотика – являются актинобактерии *Streptomyces kanamyceticus.* Активен в отношении *Mycobacterium tuberculosis,* грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli, Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis;* грамположительных кокков: *Staphylococcus* spp. (в т.ч. штаммы, продуцирующие пенициллиназу). К канамицину малочувствительны или устойчивы *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. К канамицину устойчивы анаэробные бактерии, дрожжи, вирусы и большинство простейших.

Посев проводили на среде Rich. Инкубировали посевы при комнатной температуре 24–25°С. Результаты (табл. 7, рис. 19) снимали через 1 и 6 суток.

Отмечено высокое антибиотическое действие (независимо от концентрации) всех трех исследованных антибиотиков на *Micrococcus luteus.* Хорошо действовали на все тест-культуры канамицин и гентамицин, тогда как эритромицин показал неравномерное действие на микроорганизмы – высокое на *Staphylococcus aureus,* слабое на *Pseudomonas aeruginosa* и не подействовал на *Escherichia coli.* В опытах со штаммами-продуцентами

ширина зон просветления была сопоставима с полученными в этом опыте результатами.

Таблица 7 – Ширина зоны подавления роста D (мм) на 6 сутки инкубации посевов

Тест-культура	Антибиотик, концентрация		
	Канамицин, 300 мг	Гентамицин, 10 мг	Эритромицин, 15 мг
Micrococcus luteus NCIMB 13267	>22	>22	>22
Staphylococcus aureus 209P	9.5	9	17
Pseudomonas aeruginosa 4.8.1.	2.5	8	1
Escherichia coli K12 (MG1651)	10	9	0

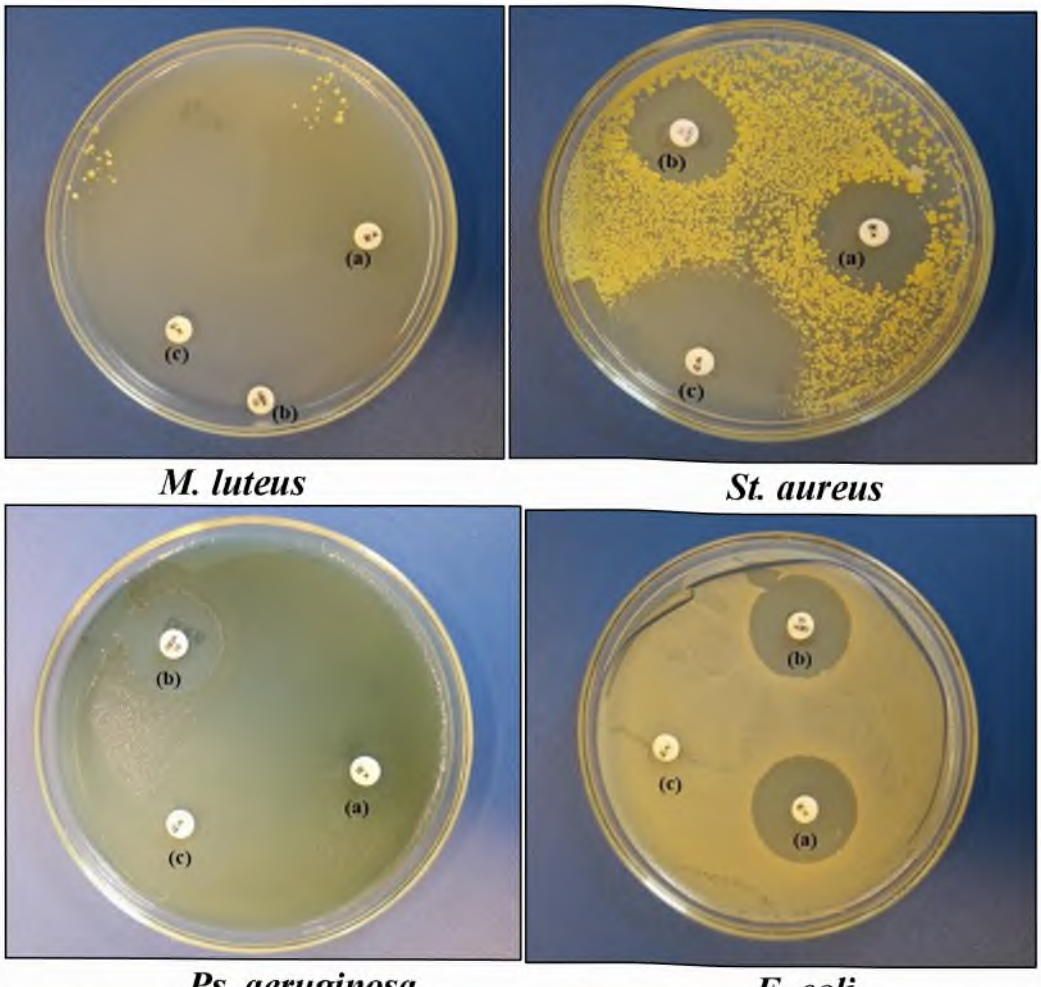


Рисунок 19. Подавление роста тест-культур препаратами антибиотиков катамицина (a), гентамицина (b) и эритромицина (c) на среде Rich.

3.4. Определение физиологических параметров роста штаммов-антагонистов

3.4.1. Кривая роста и время удвоения

Для определения скорости роста, времени деления и выхода роста популяции бактериальных клеток, в стационарную фазу выбранные штаммы-антагонисты *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10 и *Pseudomonas putida* С-49-2 выращивали аэробно на среде РС в колбах объемом на 500 мл. Инкубировали посевы при 30°С, на качалке 60 об/мин. Через определенные промежутки времени в двукратной повторности отбирали 5 мл культуральной жидкости и измеряли на спектрофотометре прирост биомассы по величине оптической плотности при длине волны λ=600 нм. На основании полученных данных были построены кривые роста (рис. 20) и рассчитаны показатели: максимальная скорость роста и время генерации (удвоения).

Кривая роста для исследованных штаммов родов *Bacillus* и *Pseudomonas* имеет S-образную форму.

Максимальный прирост биомассы в единицу времени в линейной фазе роста (максимальную скорость роста) рассчитывали по формуле:

$r = (X_2 - X_1) / (t_2 - t_1)$,

где X_2 и X_1 оптическая плотность культуральной жидкости в моменты времени t_2 и t_1 (ч).

Время генерации (удвоения) клеток рассчитывали по формуле:

$g = \ln 2 / r = 0.693 / r$.

Результаты расчетов представлены в таблице 8.

Выявлено, что наибольшую скорость роста (0.532 $ч^{-1}$) и наименьшее время удвоения (1.30 ч) имеет штамм *B. cereus* 2-13, т.е. среди исследованных культур он наиболее быстро растущий.

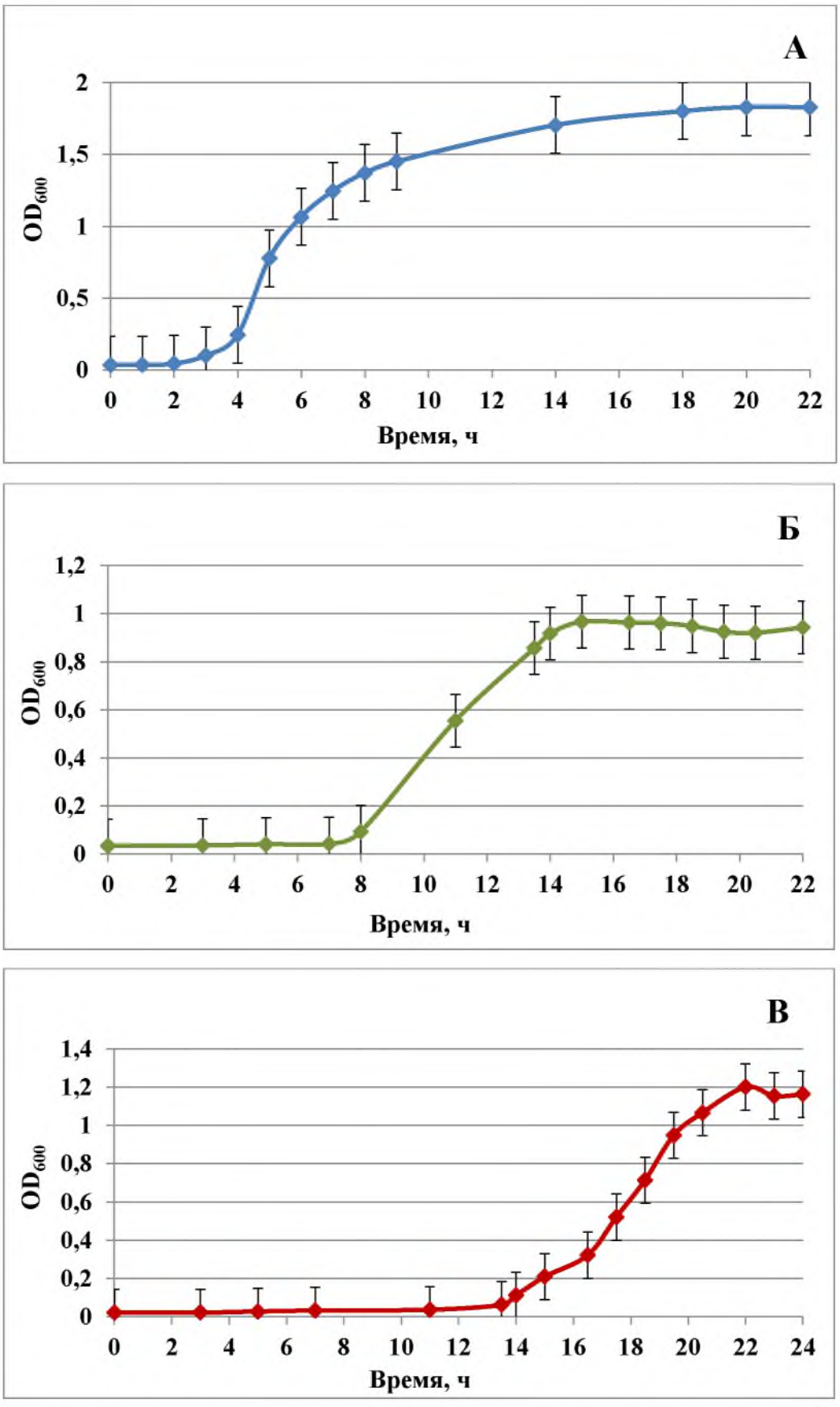


Рисунок 20. Кривые роста штаммов B. cereus 2-13 (А), P. putida C-49-2 (Б), B. licheniformis S10 (В).

Таблица 8 – Показатели роста изученных штаммов

Штамм	Максимальная скорость роста, $ч^{-1}$	Время удвоения, ч
B. cereus 2-13	0.532	1.30
B. licheniformis S10	0.154	4.50
P. putida C-49-2	0.209	3.32

3.4.2. Определение интервалов роста

Для выявления условий роста исследуемых штаммов *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10 и *Pseudomonas putida* C-49-2 были определены интервалы и оптимальные показатели роста при разных значениях температуры и содержании NaCl в среде. Все посевы проводили во флаконах в жидкой питательной среде РС в двукратной повторности, культивировали посевы в течение 5–7 суток. Рост бактерий определяли по накоплению биомассы, измеряя оптическую плотность культуральной жидкости при длине волны λ=600 нм.

Температурный интервал роста культур определяли в диапазоне от +5 до +55°С. Результаты представлены на рисунке 21. Рост штаммов при различной солености среды определяли в диапазоне от 0 до 120 г NaCl/л, культивировали посевы при 24°С. Результаты представлены на рисунке 22.

Штаммы 2-13 и S10 росли при 15–42 и 15–50°С соответственно, имея широкий оптимальный температурный диапазон, являясь мезофильными бактериями. За пределами этих интервалов рост культур резко снижался. Оптимум роста штамма 2-13 – 30°С, штамма S10 – около 40°С. Штамм С-49-2 хорошо рос в интервале от 5°С до 30°С и не рос при 37°С и выше, что позволяет считать его психротолерантным организмом. Наиболее оптимальная температура роста штамма С-49-2 лежала в интервале 24–30°С.

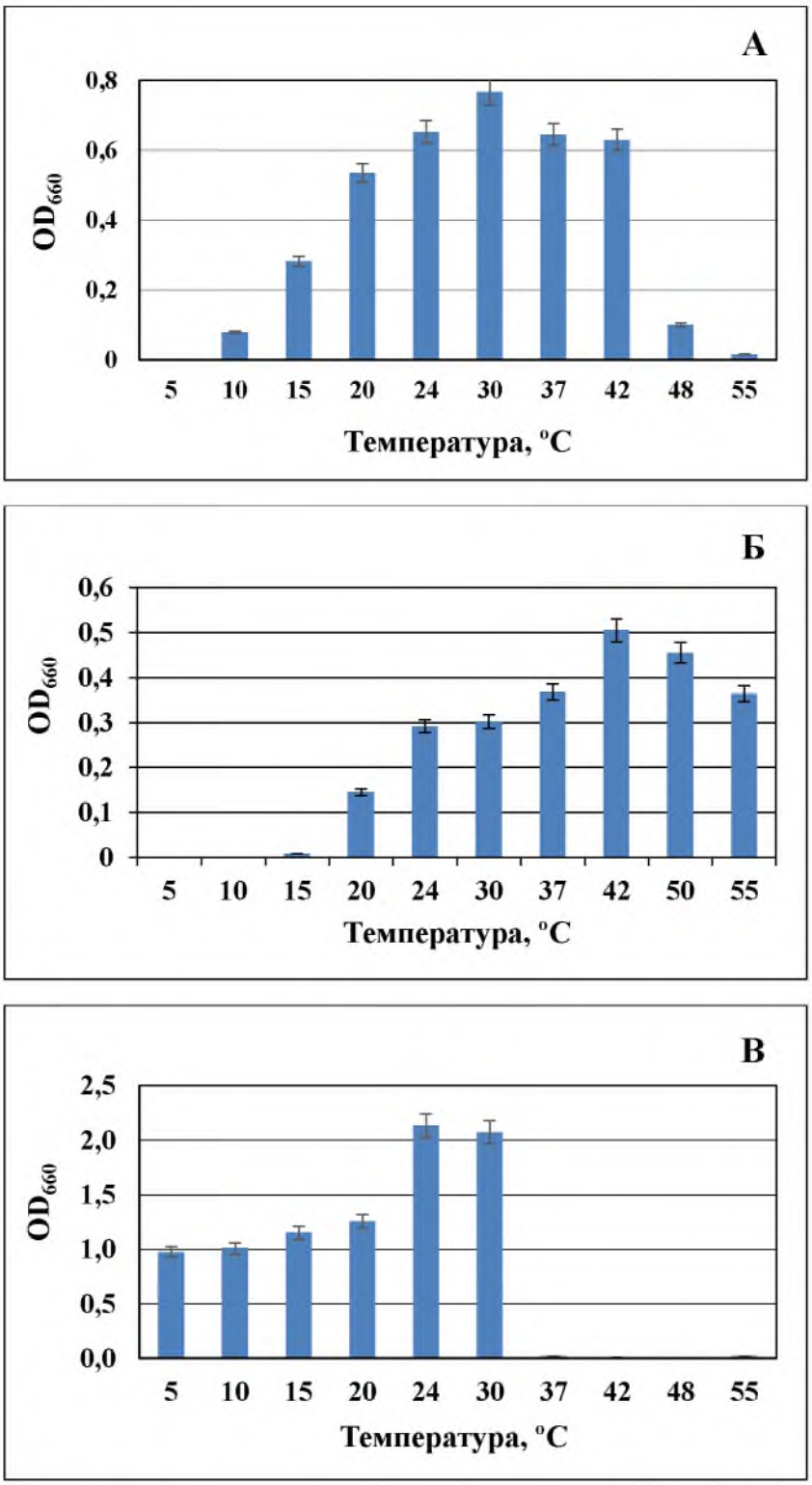


Рисунок 21. Рост штаммов B. cereus 2-13 (А), B. licheniformis S10 (Б) и P. putida C49-2 (В) при разных значениях температуры.

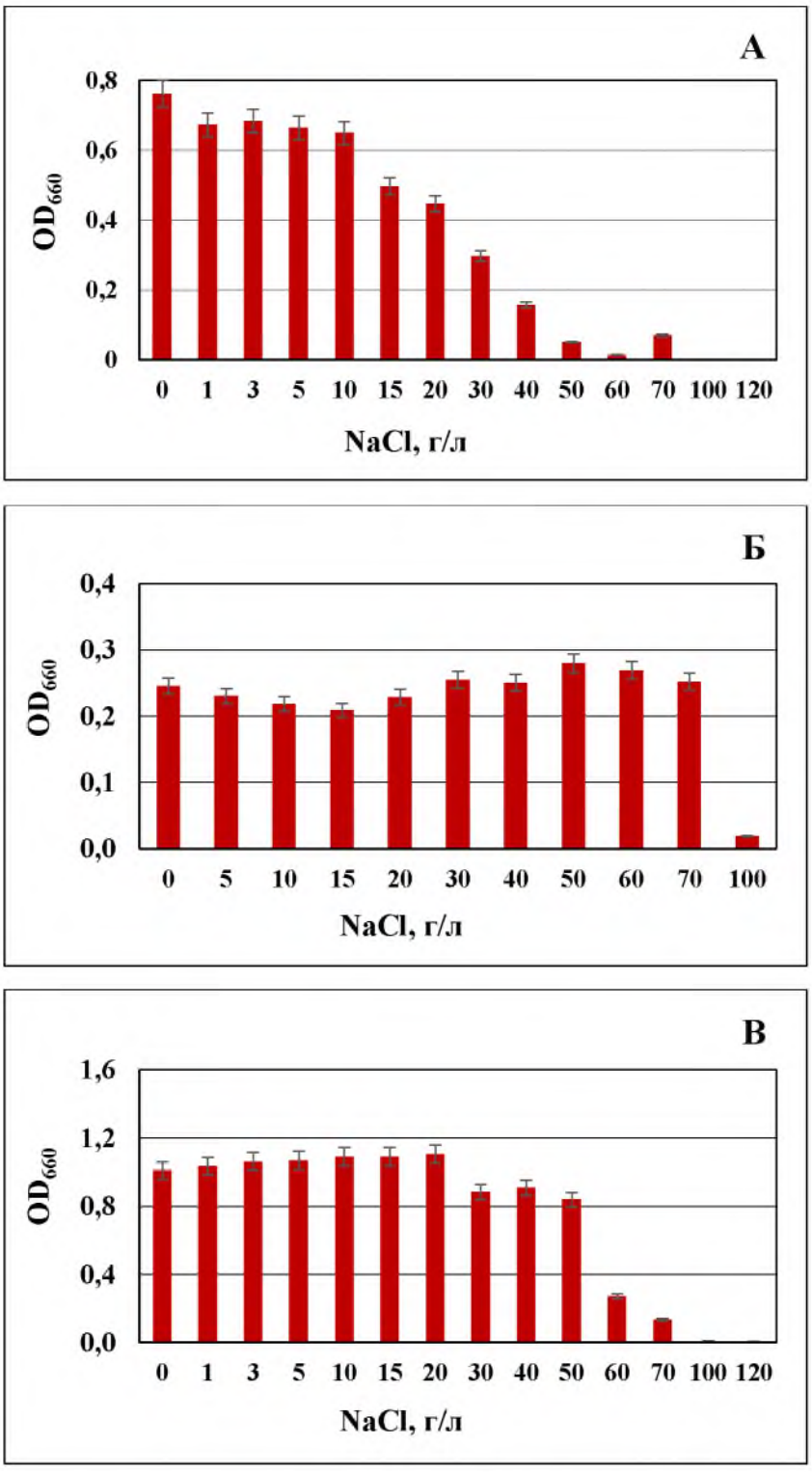


Рисунок 22. Рост штаммов B. cereus 2-13 (А), B. licheniformis S10 (Б) и P. putida C49-2 (В) при разном содержании NaCl (г/л) в среде.

Выявлено, что исследованные штаммы являются галотолерантными бактериями и могут расти в среде с соленостью от 0 до 40–70 г NaCl/л.

Наиболее благоприятным для роста штамма *Bacillus cereus* 2-13 является диапазон концентрации NaCl в жидкой питательной среде от 0–20 г/л, оптимум 0–10 г/л. При 50 г NaCl /л в среде культура не растет.

Штаммы *B. licheniformis* S10 и *P. putida* C49-2 хорошо растут при солености среды от 0 до 70 и 50 г NaCl /л соответственно, не имея выраженного оптимума.

3.4.3. Рост бактерий при разном содержании кислорода

При исследовании роста штаммов-антагонистов при разном содержании кислорода в газовой фазе проводился посев в пенициллиновых флаконах под резиновыми пробками в жидкую питательную среду Адкинса (pH 7.0, 5 г NaCl/л) с использованием в качестве воздушной фазы воздуха (аэробные условия, 21% O_2), аргона (анаэробные условия, 0% O_2) или аргона с добавлением разного количества воздуха (микроаэрофильные условия). После 5–7 суток культивирования содержание O_2 и CO_2 в воздушной фазе измеряли на газовом хроматографе и прирост биомассы по оптической плотности при длине волны λ=660 нм. Результаты представлены в таблице 9.

В результате опыта было показано, что бактерии *B. cereus* 2-13 и *B. licheniformis* S10 являются факультативными анаэробами и могут расти, как в присутствии O_2,, так и в его отсутствие, штамм S10 образует биопленки на поверхности жидкой питательной среды. Штамм *P. putida* C49-2 является облигатным аэробом и могут расти только в присутствии O_2, минимальная концентрация которого в среде должна быть не ниже 2.8%. Так же штамм C49-2 при высоких концентрация кислорода образовывает биопленки на поверхности жидкой питательной среды.

Таблица 9 – Состав газовой фазы и прирост биомассы штаммов-антагонистов

Штамм	O_2, в составе газовой фазы перед началом опыта, %	CO_2 в составе газовой фазы после культивирования, %	OD_{600} за вычетом OD посева	Рост
B. cereus 2-13	0	1.562	0.384	+
	1.4	1.976	0.458	+
	2.8	2.306	0.489	+
	7.0	2.989	0.587	+
	9.8	3.162	0.629	+
	14.0	3.316	0.695	+
	21.0	4.572	0.992	++
P. putida C49-2	0	0.404	0.034	-
	1.4	0.751	0.074	+/-
	2.8	1.072	0.120	+
	7.0	1.685	0.173	+ биопленка
	9.8	2.242	0.195	+ биопленка
	14.0	2.588	0.211	+ биопленка
	21.0	3.868	0.242	+ биопленка
B. licheniformis S10	0	5.733	0.118	+
	1.4	3.638	0.133	+ биопленка
	2.8	3.759	0.127	+ биопленка
	7.0	3.930	0.124	+ биопленка
	9.8	4.264	0.133	+ биопленка
	14.0	4.846	0.146	+ биопленка
	21.0	8.355	0.230	+ биопленка
Воздух	21.0	0.024		
Аргон	0	0.042		

++ интенсивный рост, + хороший рост, +/– слабый рост, – роста нет.

3.4.4. Денитрифицирующая способность штаммов-антагонистов

Так как исследуемые штаммы показали способность расти в микроаэрофильных и даже анаэробных условиях, была проверена их способность вести процесс денитрификации – анаэробного восстановления нитратов до молекулярного азота через ряд промежуточных соединений:

$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2\uparrow$

В пенициллиновые флаконы с резиновой пробкой с жидкой минеральной средой Адкинса вносили $NaNO_3$ (0,85 г/л) и глюкозы или сахарозу (по 2.5 г/л) в качестве органического субстрата. Воздушную фазу заменяли очищенным аргоном. Инокулировали среды штаммами *B. cereus* 2-13, *B. licheniformis* S10 и *P. putida* C49-2. Инкубировали посевы при 24°C 7–14 суток и измеряли на газовом хроматографе состав газовой фазы во флаконах. По соотношению N_2/O_2 определяли протекание процесса денитрификации до конечной стадии. Результаты измерений представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Определение денитрифицирующей способности бактерий

Штамм	N_2/O_2	CO_2	Реакция с реактивом Грисса	Денитрификация идет до
На сахарозе				
Контроль	2.69	0.028	-	-
B. cereus 2-13	13.51	2.001	++	NO_2, N_2
B. licheniformis S10	18.89	2.037	++	NO_2, N_2
P. putida C-49-2	5.32	0.192	+	слабо NO_2, слабо N_2
На глюкозе				
Контроль	3.95	0.067	-	-
B. cereus 2-13	4.44	1.158	++	NO_2, слабо N_2
B. licheniformis S10	21.54	16.057	-	N_2
P. putida C-49-2	4.60	0.383	++	NO_2, слабо N_2

Для определения накопления в среде промежуточного продукта денитрификации – нитрита NO_2^- (возможно, как конечного продукта денитрификации) проводили цветную реакцию с реактивом Гисса (раствор сульфаниловой кислоты и альфа-нафтиламина в разбавленной уксусной кислоте). В микропланшете смешивали культуральную жидкость и реактив Грисса. Интенсивность окраски служила показателем концентрации нитрита в среде (рис. 23, табл. 10).

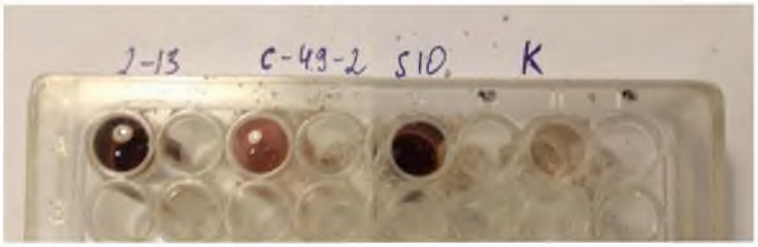


Рисунок 23. Результаты реакции культуральной жидкости (с сахарозой) с реактивом Грисса.

Из таблицы 10 видно, что все исследуемые штаммы ведут процесс анаэробного восстановления нитратов до конечного продукта – N_2, однако, штамм С-49-2 слабо. При этом бациллы при росте на сахарозе активно накапливают нитриты в среде (на рисунке 21 – очень темный цвет раствора в лунках 2-13 и S10). При росте на глюкозе штамм S10 не накапливает промежуточные продукты реакции, а интенсивно ведет процесс денитрификации до конца (N_2/O_2=21.54), переводя все нитраты в среде в молекулярный азот.

3.5. Рост штаммов-антагонистов в планктонной и биопленочной культурах

Для определения характера роста исследуемых культур в природных условиях или, например, в промышленных ферментерах, в ходе работы исследован планктонный и биопленочный рост штаммов-продуцентов антимикробных веществ в присутствии двух твердых носителей: тефлоновых

кубиков (4х4х4 мм) и металлического купона (10х10х1.5 мм). Во флакон с жидкой питательной средой РС вносили 8 кубиков (общей массой 1 г) или один металлический купон (1.2 г). Инкубировали посевы при 30°С 17 суток. Накопление биомассы в среде и на носителях определяли с помощь МТТ-теста. Данные оптической плотности для носителей пересчитывали на единицу площади поверхности (мм^2), при измерении OD_{540} планктонной культуры образец разводили в 10 раз. Результаты представлены на рисунках 24 и 25.

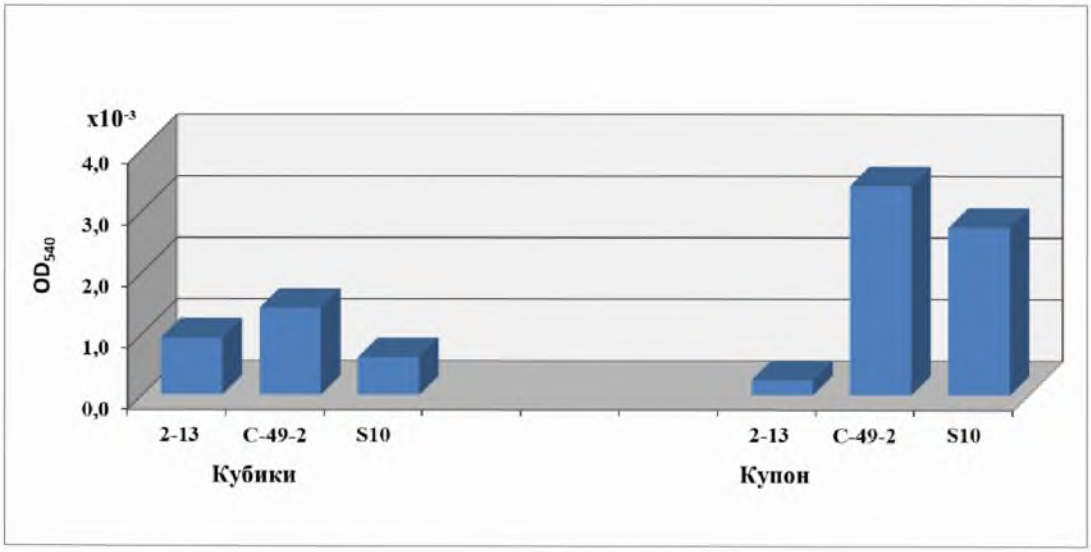


Рисунок 24. Биопленочный рост штаммов-продуцентов на твердых носителях.

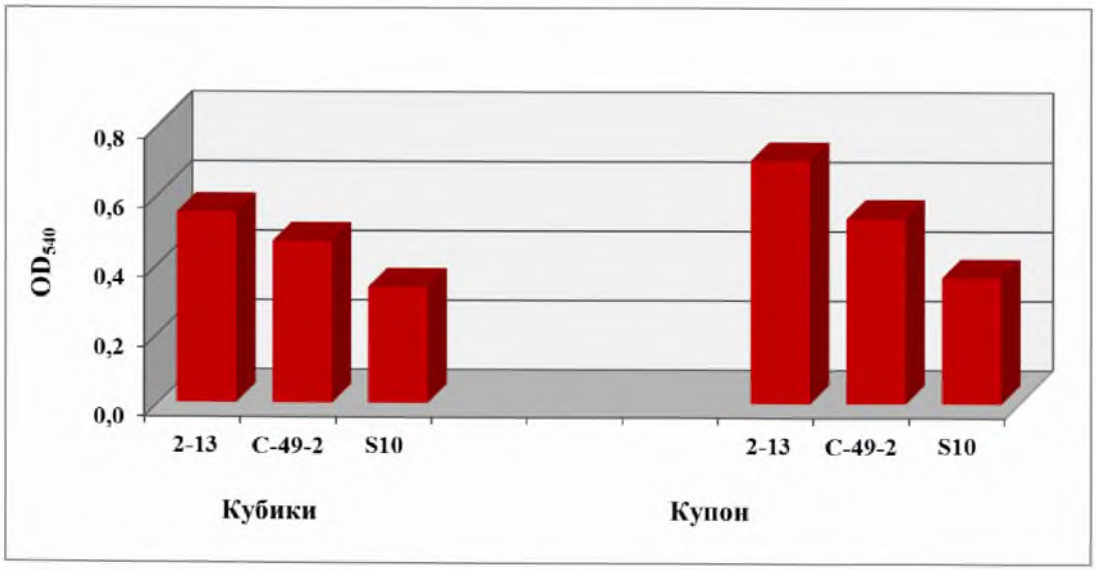


Рисунок 25. Рост штаммов-продуцентов в планктонной культуре.

Исследованные штаммы активно росли в планктонной культуре, образовывая неплотные пленки и на тефлоновых кубиках, и на металлическом купоне. Тем не менее, количество прикрепленных клеток на носителях у разных штаммов сильно различалось. Лучшие количественные показатели у штаммов *P. putida* C49-2 и *B. licheniformis* S10 на купоне. Штамм *B. cereus* 2-13 плохо образовывал пленку на купоне, оставаясь в планктонной культуре (рис. 26). Фотографии роста штаммов-продуцентов на металлическом купоне представлены на рисунке 26.

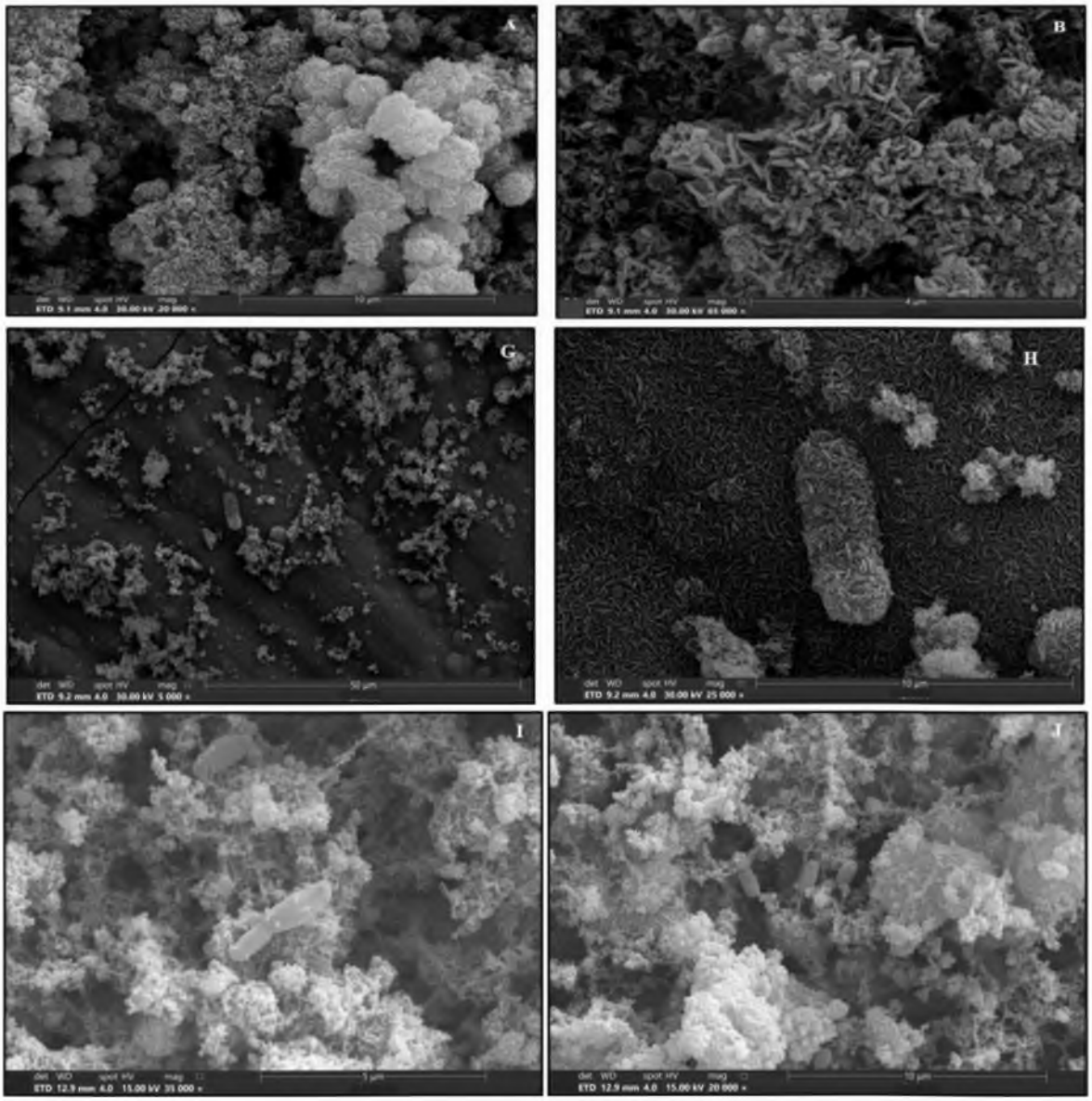


Рисунок 26. Микрофотографии культур B. cereus 2-13 (A, B); P. putida C-49-2 (G, H) и B. licheniformis S10 (I, J) на металлическом купоне. Сканирующий микроскоп.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Произведен скрининг продуцентов антимикробных веществ среди штаммов бактерий родов *Bacillus, Pseudomonas* и *Streptomyces* из коллекции микроорганизмов лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН. Тремя «чашечными методами» – «Методом перпендикулярных штрихов», «Методом агаровых блочков» и «Методом бумажных дисков» – показано, что штаммы *S. albogriseolus* S1a, *S. euryhalinus* S29a, *B. licheniformis* S10, *B. cereus* 2-13 и *P. putida* C49-2 обладают выраженной антимикробной активностью против G+ и G- тест-культур.

Действие исследованных штаммов-продуцентов на тест-культуры было различным (бактерицидным, бактериостатическим, отсутствовало), т.к. этот процесс зависит от ряда факторов: строения клеточной стенки тестового микроорганизма, ее проницаемости для внешних соединений; состава и принципа действия антимикробных метаболитов штаммов-продуцентов, выделения ими ферментов, выработанной ранее резистентности штаммов тест-культур к антибиотиками и т.д. Отобранные штаммы-антагонисты (2-13, C49-2, S10, S1a и S29a показали наиболее активное антимикробное действие на большинство использованных в работе тест-культур.

Штамм 2-13 имеет широкий температурный интервал роста: от 15 до 42°C, являясь мезофильным организмом. Штамм S10 растет в интервале температур от 20 до 55°C, что указывает на его термотолерантные свойства, а штамм C49-2, имея оптимум роста при 5–30°C является психротолерантным организмом. Все исследованные штаммы являются галотолерантными бактериями и могут расти в среде с соленостью от 0 до 40–70 г NaCl/л. Большинство исследованных штаммов-продуцентов способны расти в микроаэрофильных и даже в анаэробных (штаммы 2-13, S10) условиях, образуя биопленки на твердых поверхностях и осуществляя процесс денитрификации в присутствии нитратов в среде. Получены кривые роста, позволяющие определить время начала экспоненциального роста и выход в

стационарную фазу, рассчитаны ростовые параметры штаммов-продуцентов. Штаммы *B. cereus* 2-13, *P. putida* С-49-2, *B. licheniformis* S10 имеют наибольшую скорость роста и минимальное время регенерации.

В свою очередь согласно полученным данным, в ходе этой работы можно сделать следующие выводы:

1. «Чашечными методами» проверена антимикробная активность 10 коллекционных чистых культур бактерий родов *Bacillus, Pseudomonas* и *Streptomyces* по отношению к тест-культурам. Выявлены активные штаммы-антагонисты, принадлежащие видам: *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10, *Pseudomonas putida* С-49-2, *Streptomyces albogriseolus* S1a и *Streptomyces euryhalinus* S29a.
2. Тестовые культуры проявили различную резистентность к исследованным штаммам-продуцентам антимикробных веществ: только мицелиальные бактерии рода *Streptomyces* сильно подавляли рост тест-культур *Pseudomonas aeruginosa* 4.8.1. и *Escherichia coli* K12, бактерицидное действие на рост *Micrococcus luteus* NCIMB 13267 оказывали бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, а на *Staphylococcus aureus* 209P – бактерии родов *Pseudomonas* и *Streptomyces*. На тест-культуру *Yarrowia lipolytica* 367-2 только некоторые из штаммов-продуцентов оказали бактериостатическое действие.
3. Определены характеристики роста трех выбранных активных штаммов-антагонистов *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10 и *Pseudomonas putida* С-49-2, наиболее быстро растущий из которых – штамм 2-13: скорость роста (прирост биомассы в единицу времени) 0.532 $ч^{-1}$, время удвоения 1.3 ч.
4. Выявлены широкие физиологические показатели штаммов-антагонистов *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10 и *Pseudomonas putida* С-49-2: рост в диапазоне температур 5–55°С и содержании NaCl в среде от 0 до 40–70 г/л, рост в микроаэрофильных и в анаэробных (штаммы 2-13 и S10) условиях, осуществление процесса денитрификации при наличии

нитратов в среде, формирование устойчивых биопленок на твердых поверхностях.

5. Штаммы *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10, *Pseudomonas putida* C-49-2, *Streptomyces albogriseolus* S1a и *Streptomyces euryhalinus* S29a, обладающие антимикробной активностью, рекомендованы для использования в биотехнологических целях, в частности в нефтяной микробиологии

Таким образом, по физиологическим характеристикам штаммы-продуценты *Bacillus cereus* 2-13, *Bacillus licheniformis* S10, *Pseudomonas putida* C-49-2, *Streptomyces albogriseolus* S1a и *Streptomyces euryhalinus* S29a, относятся к бактериям способным вырабатывать стойкие антимикробные вещества, проявляя высокую антимикробную активность, и могут быть рекомендованы для использования в биотехнологических целях.

В ходе данной работы автор выражает глубокую благодарность заведующей лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН д.б.н. Тамаре Николаевне Назиной за организацию прохождения учебных практик, доброжелательное отношение и помощь в работе. Особая признательность с.н.с., к.б.н. Тамаре Леонидовне Бабич за помощь в освоении методов микробиологических исследований, поддержку и бесценный опыт, а также с.н.с., к.б.н. Дияне Шамилевне Соколовой за сотрудничество и помощь в идентификации чистых культур микроорганизмов. Благодарность всем сотрудникам лаборатории нефтяной микробиологии за поддержку и прекрасную дружескую атмосферу в коллективе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакаева М. Д., Смолова О. С., Логинов О. Н. Использование для биорекультивации микроорганизмов-деструкторов углеводородов рода *Pseudomonas* с микостатической активностью // Биотехнология. 2014. № 6. С. 62–72.
2. Васильев Д. А., Калдыркаев А. И., Феоктистова Н. А., Алёшкин А. В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П. А. Столыпина, 2013. 6 с.
3. Виноградов К. А., Булгаков В. Г., Полин А. Н. Стрептомицеты в свете концепции «многоклеточности» бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61. № 7–8. С. 33–47.
4. Виноградова К. А., Булгакова В. Г., Полин А. Н., Кожевин П. А. О биоплёнках стрептомицетов. I. Распространение и формирование // Антибиотики и химиотер. 2015. Т. 60. №1–2. С. 44–55.
5. Вольпе И. М. Патогенные микроорганизмы / Вольпе И.М., Чернова Т.И. М: МГУ, 1967. 280с.
6. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов: Роды *Streptomyces, Streptoverticillium, Chainia* // Отв. ред. Е.Н. Мишустин. Москва: Наука, 1983. 246 с.
7. Егоров Н. С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: «Высшая школа», 1965. 211 с.
8. Захарова В. А., Фидоровская Ю. С., Хлыстова Т. С., Кильдеева Н. Р. Производные альгиновой кислоты: особенности строения, свойства и перспективы использования в медицине // Промышленные процессы и технологии. 2022. Т. 2. № 5(7). С. 64–70.
9. Ишевский А. Л, Успенская М. В., Гунькова П. И., Давыдов И. А., Василевская И. А. Направления использования альгинатов в пищевой

промышленности (обзор) // Известия СПбГТИ (ТУ). 2019. № 51 (77). С. 61–69.

10. Карасевич Ю. Н. Экспериментальная адаптация микроорганизмов. М.: Наука, 1975. 180 с.
11. Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. М: Наука, 1983. 149с.
12. Ларин Ф. И., Жукова Л. И., Лебедев В. В., Рафеенко Г. К. Интерфирирующее взаимодействие вирусов в регуляции эпидемического процесса // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. № 1. С. 25–91.
13. Логинова Л. Г., Кравцова Г. И., Егорова Л. А., Богданова Т. И. Ацидофильная облигатно термофильная бактерия *Bacillus acidocaldarius*, выделенная из горячих источников и почв ост. Кунашир // Микробиология. 1978. № 47. С. 771–775.
14. Миллер Г. Г. Биологическое значение ассоциаций микроорганизмов // Вестник Российской академии медицинских наук. 2000. № 1. С. 45–51.
15. Навашин С. М., Фомина И. П. Справочник по антибиотикам. М.: Медицина, 1974. 416 с.
16. Назина Т. Н., Беляев С. С. Биологическое и метаболическое разнообразие микроорганизмов нефтяных месторождений // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. М.: Наука, 2004. Вып. XII. С. 289–316.
17. Плотникова Е. Г., Алтынцева О. В., Кошелева И. А., Пунтус И. Ф., Филонов А. Е., Гаврилов Е. Ю., Демаков В. А., Боронин А. М. Бактерии – деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработки // Микробиология. 2001. Т. 70. № 1. С. 61–69.
18. Рубан Е. Л Микология и фитопатология. 1986. № 5. С. 395–401.
19. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. 262 с.

20. Теппер Е. З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Под ред. Шильниковой В.К. – 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004. С. 160–164.
21. Яковлев А. А., Раков А. В., Показеева Ю. Н., Щелканов М. Ю. Моделирование процессов меж- и внутривидового взаимодействия микроорганизмов в эксперименте на периодической культуре // Тихоокеанский медицинский журнал. 2023. № 3. С. 9–14.
22. Abdul Majeed, Zahir Muhammad and Habib Ahmad. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. Journal: Plant Cell Reports, 2018, Vol. 37, N. 12, P. 1599
23. Adkins J. P., Cornell L. A., Tanner R. S. Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids. // Geomicrobiol. J.1992. V. 10. P. 87–97.
24. Akbari S., Pirbodaghi T. Microfluidic encapsulation of cells in alginate particles via an improved internal gelation approach // Microfluidics and Nanofluidics. 2014. V. 16.
25. Albrecht M. T., Schiller N. L. Alginate lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa // Journal of bacteriology. – 2005. V. 187. № 11. P. 3869–3872.
26. Alikhanian S. I., Orlova N. V., Mindlin S. Z., Zaitzeva Z. M. Genetic control of oxytetracycline biosynthesis // Nature. 1961. V. 189. P. 939–940.
27. Allen D. A., Austin B., Colwell R. R. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery // J Gen. Microbiol. 1983. № 129. P. 2043-2062.
28. Barnett M. L., Linder J. A. Antibiotic Prescribing to Adults With Sore Throat in the United States, 1997-2010 // JAMA Intern Med. 2014. V. 174. № 1. P. 138–140.
29. Beech I. B., Campbell S. A. Accelerated low water corrosion of carbon steel in the presence of a biofilm harbouring sulphate-reducing and sulphur-oxidising bacteria recovered from a marine sediment // Electrochim. Acta. 2008. V. 54. P. 14–21.

30. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. 2005. V. 58. № 1. P. 1–26.
31. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // J. Antibiot. 2012. V. 65. P. 385–395.
32. Bonde G. I. Bacillus from marine habitats: Allocation to phena established by numerical techniques // The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification (R. C. W. Berkeley and M. Goodfellow, eds.) London, 1981. P. 181-215.
33. Brunk C. F., Avaniss-Aghajani E., Brunk C. A. A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial small-subunit rRNA sequences // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 61. P. 872–879.
34. Chongdar S., Gunasekaran G., Kumar P. Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm // Electrochim Acta. 2005. V. 50. P. 4655–4665.
35. Cross T. Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats // J. Appl. Bacteriol. 1981. № 50. P. 597–424.
36. Davey M. E., O'toole G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol Mol Biol Rev. 2000. V. 64. № 4. P. 847–67.
37. De Vos P., Van Landschoot A., Segers P., Tytgat R., Gillis M., Bauwens M., Rossau R., GoöR M., Pot B., Kersters K., Lizzaraga P., De Ley J. Genotypic Relationships and Taxonomic Localization of Unclassified Pseudomonas and Pseudomonas-Like Strains by Deoxyribonucleic Acid:Ribosomal Ribonucleic Acid Hybridizations // Int. J. Syst. Bacteriology 1989. V. 39. № 1. P. 35–49.
38. Dunne W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 2. P. 155–166.
39. Fickers P. Antibiotic compounds from Bacillus: why are they so amazing? // Am. J. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 8. № 1. P. 40–46.
40. Flärdh K., Buttner M. J. Streptomyces morphogeneticus: dissecting differentiation in a filamentous bacterium // Nat Rev Microbiol. 2009. V. 7. № 1. P. 36–49.

41. Flemming H. C., Wingerder J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. P. 563–575.
42. Franklin T. J. Resistance of Escherichia coli to tetracyclines. Changes in permeability to tetracyclines in Escherichia coli bearing transferable resistance factors // Biochem. J. 1967. № 15. P. 98–100.
43. Fujimoto K., Fujita S., Ding B., Shiratori S., Fabrication of layer-by-layer self-assembly films using roll-to-roll process // Jpn. J. Appl. Phys. 2005. V. 44. L126–L128.
44. Gadekar S., Nemati M., Hill G. A. Batch and continuous biooxidation of sulfide by Thiomicrospira sp. CVO: reaction kinetics and stoichiometry // Water Res. 2006. V. 40. P. 2436–2446.
45. Jayaraman A, Cheng E. T., Earthman J. C., Wood T. K. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion // Appl Microbiol Biotechnol.1997. V. 48. P. 11–17.
46. Johnson A. C., Morata T.C. 142. Occupational exposure to chemicals and hearing impairment. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals. Nordic Expert Group. – Gothenburg. Arbete och Hälsa, 2010. V. 44(4). P. 177.
47. Korenblum E., von Der Weid I., Santos A. L. S., Rosado A. S., Sebastián G. V., Coutinho C. M. L. M., Magalhães F. C. M., de Paiva M. M., Seldin L. Production of antimicrobial substances by Bacillus subtilis LFE - 1, B. firmus HO - 1 and B. licheniformis T6 - 5 isolated from an oil reservoir in Brazil // Journal of Applied Microbiology.2005. V. 98. Is. 3. P. 667–675.
48. Lambert P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites // Advanced Drug Delivery Reviews. 2005. V. 57. P. 1471–1485.

49. Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin Ch. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014. V. 78. № 3. P. 510–543.

50. Liedberg H, Lundeberg T. Silver coating of urinary cathethers prevents adherence and growth of Pseudomonas aeruginosa // Urol Res. 1989. V. 17. P. 357–358.

51. Logan N. A., Berkeley R. C. W. Classification and identification of members of the genus Bacillus using API tests // The Aerobic Endospore-Forming Bacteria (R. C W. Berkeley and M. Goodfellow, eds.). London: Academic Press, 1981. P. 105–140.

52. Magot M., Ollivier B., Patel B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs // Ant. van Leeuwenhoek.2000. V. 77. P. 103–116.

53. Marston H. D., Dixon D. M., Knisely J. M., Palmore T. N., Fauci A. S. Antimicrobial Resistance // JAMA. 2016. V. 316. № 11. P. 1193–1204.

54. Moreira A, Lawson D, Onyekuru L., Dziemidowicz K., Angkawinitwong U., Costa P. F., Radacsi N., Williams G. R. Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying // J Control Release. 2021. V. 329. P. 1172–1197.

55. Nazina T. N., Shestakova N. M., Grigor'yan A. A., Mikhailova E. M., Turova T. P., Poltaraus A. B., Qingxian Feng, Fangtian Ni, and Belyaev S. S. Phylogenetic Diversity and Activity of Anaerobic Microorganisms of High-Temperature Horizons of the Dagang Oilfield (P. R. China) // Mikrobiologiya. 2006. V. 75. № 1. P. 70–81 [Microbiology (Engl. Transl.). V. 75. № 1. P. 55–65.]

56. Pannekens M., Kroll L., Műller H., Mbow F. T., Meckenstock R. U. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms // New Biotechnology. 2019. V. 49. P. 1–9.

57. Pedersen A, Hermansson M. Inhibition of metal corrosion by bacteria // Biofouling.т1991. V. 3. P. 1–11.

58. Peix A., Ramírez-Bahena M. H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas // Infec. Gen. Evol. 2009. V. 9. P. 1132–1147.

59. Peypoux, F., Bonmatin J.M., Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin // Applied Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 553–563.

60. Pfennig N., Lippert K. D. Uber das vitamin B12 – Bedurfnis phototropher Schweferel bakterien // Arch. Microbiol. 1966. V. 55. P. 245–256.

61. Plakunov V. K., Mart'yanov S. V., Teteneva N. A., Zhurina M. V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology. 2016. V. 85. № 4. P. 509–513.

62. Potekhina J. S., Sherisheva N. G., Povetkina L. P., Pospelov A. P., Rakitina T. A., Warnecke F., Gottschalk G. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats // Appl Microbiol Biotechnol. 1999. V. 52. P. 639–646.

63. Simões M., Simões L. C., Vieira M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies // LWT-Food Sci Technol. 2010. V. 43. P. 573–583.

64. Singh S. B., Pelaez F. Progress in Drug Research // Biodiversity, chemical diversity and drug discovery / Petersen F. and Amstutz R. (eds.). – Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 2008. V. 65. P. 141–174.

65. Skerman V. B. D., McGowan V., Sneath P. H. A. Approved list of bacterial names // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. V. 30. P. 225–420.

66. Sun J., Gao M., Feldmann J. Electric field directed layer-by-layer assembly of highly fluorescent CdTe nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol. 2001. V. 1. P. 133–136.

67. Taylor J., Hafner M., Yerushalmi E., Smith R., Bellasio J., Vardavas R., Binkowska-Gibbs T., Rubin J. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: model and results. // RAND Corporation. (Research Reports). 2014. 113 p.

68. Videla H. A, Herrera L. K. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future // Int Microbiol. 2005. V. 8. P. 169–180.

69. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.

70. Yoshizawa S., Fourmy D., Puglisi J. D. Structural origins of gentamicin antibiotic action // EMBO J. 1998. V. 16. № 17(22). P. 6437–48.

71. Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bidlingmaier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean R. A., Gerstein M., Snyder M. Global analysis of protein activities using proteome chips // Science. 2001.V. 293(5537). P. 2101-2105.

72. Zobell C. E., Upham R. C. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species / C. E. Zobell and // Bull. Scripps. Inst. Oceanography, University of California. 1944. № 5. P. 239–292.

73. Zuo R. Biofilms: Strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms // Applied Microbiology and Biotechnology. 2007. V. 76. № 6. P. 1245-1253.