



14. Садчиков А. П., Кудряшов М. А. Экология прибрежно-водной растительности : учеб. пособие для студ. вузов. М. : Изд-во НИИ Природа, РЭФИА, 2004. 220 с.
15. Матвеев В. И., Соловьева В. В., Саксонов С. В. Экология водных растений : учеб. пособие. 2-е изд., доп. и перераб. Самара : Изд-во Самар. науч. центра РАН, 2005. 282 с.
16. Черепанов С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). СПб. : Мир и семья, 1995. 992 с.
17. Еришов И. Ю. Гидрофильный компонент урбанофлоры г. Ярославля // Гидрофильный компонент в сравнительной флористике фитобиоты России. Рыбинск : Рыбинск. дом печати, 2006. С. 150–156.
18. Седова О. В. Пространственно-временная динамика флоры и растительности Волгоградского водохранилища в административных границах Саратовской области : дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2007. 177 с.
19. Матвеев В. И. Динамика растительности водоемов бассейна Средней Волги. Куйбышев : Кн. изд-во, 1990. 192 с.
20. Серебряков И. Г. Жизненные формы растений и их изучение // Полевая геоботаника : в 3 т. М. ; Л. : Наука, 1964. Т. 3. С. 146–205.
21. Гейны С., Гроудова З., Гусак Ш. и др. Характеристика макрофитов переувлажненных территорий Украины и Чехословакии // Макрофиты – индикаторы изменений природной среды. Киев : Наукова думка. 1993. 434 с.
22. Соловьева В. В. Мониторинг флоры прудов г. Самары с 1936 по 2004 гг. // Гидробиотаника–2005 : материалы VI Всерос. конф. по водным макрофитам. Борок, 11–16 окт. 2005 г. Рыбинск : Рыбинск. дом печати, 2006. С. 352–354.

УДК 576.85:576.809.51:577.11

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ANCYLOBACTER ABIEGNUS* НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА

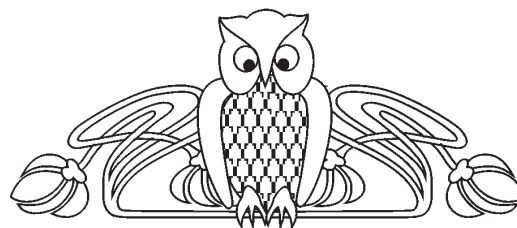
Н. В. Кичемазова¹, Е. Н. Бухарова¹, Ю. Ю. Берестовская²,
Л. В. Васильева², Л. В. Карпунина¹

¹Саратовский государственный аграрный университет

E-mail: natali8519@mail.ru

²Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, г. Москва

E-mail: jberestovskaja@mail.ru



Показано, что условия культивирования *Ancylobacter abiegnus* Z-0056 влияют на продукцию экзополисахаридов (ЭПС). Оптимальными для продукции ЭПС являются среда «МСО», температура 25 °С, встряхивание на шуттель-аппарате при 200 об/мин, наличие в среде: 1 г/л сукцината ; 0,25 г/л нитрата аммония (NH₄NO₃) и 0,14 г/л фосфата калия (KH₂PO₄).

Ключевые слова: экзополисахариды, бактерии-диссипотрофы, *Ancylobacter*, *Ancylobacter abiegnus*.

Influence of Cultivation Factors on Growth and Exopolysaccharide Production of *Ancylobacter Abiegnus*

N. V. Kichemazova, E. N. Boukharova,
Yu. Yu. Berestovskaja, L. V. Vasilyeva, L. V. Karpunina

It was shown that conditions of cultivating of *Ancylobacter abiegnus* influence on exopolysaccharide (EPS) production. Optimal conditions for production were: 25 °C, MSO growth medium, shaking at 200 rpm, succinate at 0,1 g/l, ammonium nitrate (NH₄NO₃) at 0,25 g/l and potassium phosphate (KH₂PO₄) at 0,14 g/l.

Key words: exopolysaccharides, dissipotrophs, *Ancylobacter*, *Ancylobacter abiegnus*.

Введение

В последние годы полисахариды микробного происхождения привлекают внимание исследователей в связи с возможностью их применения в различных отраслях народного хозяйства. Поиск новых продуцентов является актуальной задачей современной микробиологии и биотехнологии.

Из микобактериального сообщества выделен новый представитель рода *Ancylobacter* – *Ancylobacter abiegnus* – диссипотрофная бактерия, которая образует экзополисахарид в процессе роста [1].

Этот организм является представителем диссипотрофной группировки олиготрофных ацидофильных бактерий, использующих в качестве источника углерода и энергии вещества, образующиеся в процессе разложения древесины ксилотрофными грибами [2]. Он участвует в конечной стадии разложения древесины – сложного лигноцеллюлозного комплекса – и исполь-



зует простые соединения, в частности сукцинат, оксалат, ксилозу и ряд других [1].

Ранее нами было установлено, что в процессе роста клетки *A. abiegnus* выделяли экзополисахарид (ЭПС) [3]. ЭПС этой бактерии и условия его образования клетками не были исследованы. В связи с этим целью настоящей работы было изучение продукции экзополисахарида клетками *A. abiegnus* и влияние условий культивирования: состава питательной среды, температуры, аэрации, концентраций источников углерода, азота, фосфора на продукцию ЭПС клетками *A. abiegnus*.

Объект и методы исследования

Объектом исследований была культура *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, полученная из лаборатории реликтовых микробных сообществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института микробиологии им. С. Н. Виноградского Российской академии наук.

Культуру выращивали при 25 и 31 °С в течение 100 ч на термостатируемом шейкере-инкубаторе (шейкер-инкубатор ES-20 (Литва)), при 200 об/мин, 100 об/мин и без аэрации на среде «МС» (рН 5,5), содержащей модифицированные соли Хатнера (1 мл/л) в качестве минеральной основы, сукцинат натрия (1 г/л) в качестве субстрата, дрожжевой экстракт (0,1 г/л) в качестве фактора роста и 0,1 мл спиртовой раствор витаминов, и на среде «МСО», состоящей из среды «МС» и дополнительно внесенных нитрата аммония (NH_4NO_3) в концентрации 0,25 г/л и фосфата калия (KH_2PO_4) в концентрации 0,07 г/л [1]. В качестве источника углерода использовали натриевые соли органических кислот: сукцинат, цитрат, оксалат, а также углеводы: ксилан и ксилозу.

Количество клеток определяли по калибровочной кривой (график зависимости оптической плотности от концентрации бактериальной взвеси). Калибровочную кривую строили в интервале от 1×10^9 до 1×10^1 кл/мл. Статистическую обработку результатов проводили по стандартной методике [4].

Содержание углеводов определяли фенолсерным методом [5].

Результаты и их обсуждение

Первоначальным этапом наших исследований было выяснение влияния температуры на рост *A. abiegnus* Z-0056 и продукцию клетками этой культуры ЭПС на средах «МС» и «МСО» с сукцинатом в концентрации 1 г/л в качестве субстрата при встряхивании 200 об/мин. Для исследования были выбраны температуры 25 и 31 °С. Температура 25 °С соответствовала температур-

ному оптимуму роста культуры. Температура 31 °С была выбрана на основании предварительных экспериментов, проведенных в пределах температур 10–40 °С. Было показано, что изменения в синтезе ЭПС клетками *Ancylobacter abiegnus* происходили в интервале температур 31–35 °С, что соответствовало литературным данным, согласно которым оптимальная температура для синтеза ЭПС бактериальными клетками на несколько градусов выше, чем оптимальная температура роста культуры [6,7]. Значительной разницы в синтезе ЭПС клетками исследуемого организма в пределах температур 31–35 °С не наблюдалось. Исходя из соображений экономической целесообразности, была выбрана минимальная температура, при которой происходят изменения в синтезе полисахарида.

При температуре 25 °С на среде «МС» лаг-фаза составила 15 ч, после чего культура начала расти и вышла на стационарную фазу к 50 ч (рис. 1). В период активного роста выделения полисахарида не происходило. ЭПС начал выделяться клетками культуры к концу логарифмической фазы: 45–50 ч роста культуры и накопился в среде в начале стационарной фазы роста: 65–70 ч роста. На среде «МСО» логарифмическая фаза началась с 15-го ч и продолжалась до 50-го ч (рис. 2). Одновременно с началом логарифмической фазы роста началось выделение ЭПС культурой, накопление которого в среде произошло к 70–75-м ч роста. На среде «МС» продукция биополимера составила 0,5 г с 1 г сырых клеток. На среде «МСО», содержащей в своем составе большее количество азота и фосфора, продукция ЭПС с 1 г клеток была значительно больше и составила 3,1 г.

При температуре 31 °С характер роста культуры *A. abiegnus* Z-0056 был одинаков на обеих средах (рис. 3). Выделение ЭПС клетками происходило параллельно с ростом культуры. Максимальное количество ЭПС образовывалось в конце стационарной фазы. Выход ЭПС составил 0,1 г с 1 г клеток.

Таким образом, повышение температуры до 31 °С приводило к изменению характера выделения ЭПС клетками *A. abiegnus* Z-0056. Продолжительность выделения ЭПС увеличивалась, однако общая продукция ЭПС бактериальными клетками на обеих средах уменьшалась.

Следующим этапом исследований было выяснение влияния аэрации на рост *A. abiegnus* Z-0056 и продукцию клетками ЭПС. Для этого бактерии выращивали на шейкере-инкубаторе при встряхивании с частотой 200 об/мин, 100 об/мин и без встряхивания – в стационарных условиях на средах «МС» и «МСО» с сук-

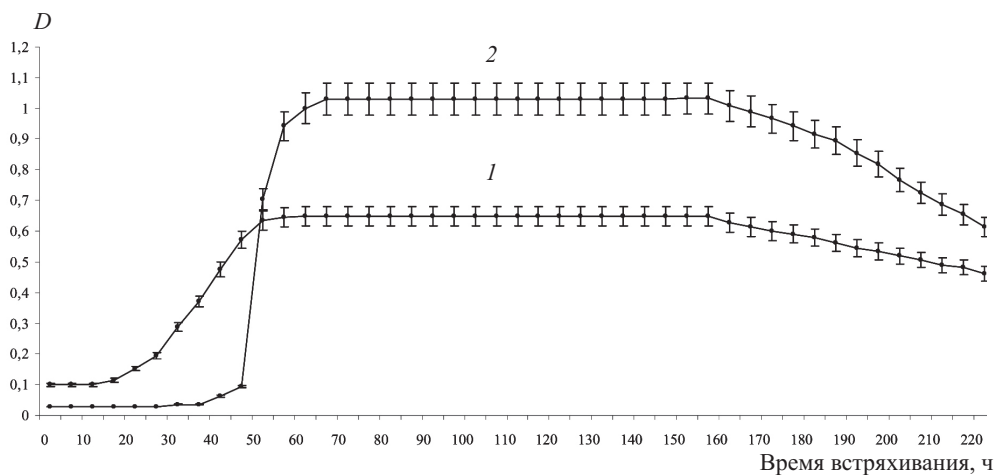


Рис. 1. Динамика роста ($1 - \lambda = 425$ нм) и продукции ЭПС ($2 - \lambda = 490$ нм) *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МС» при 25 °С

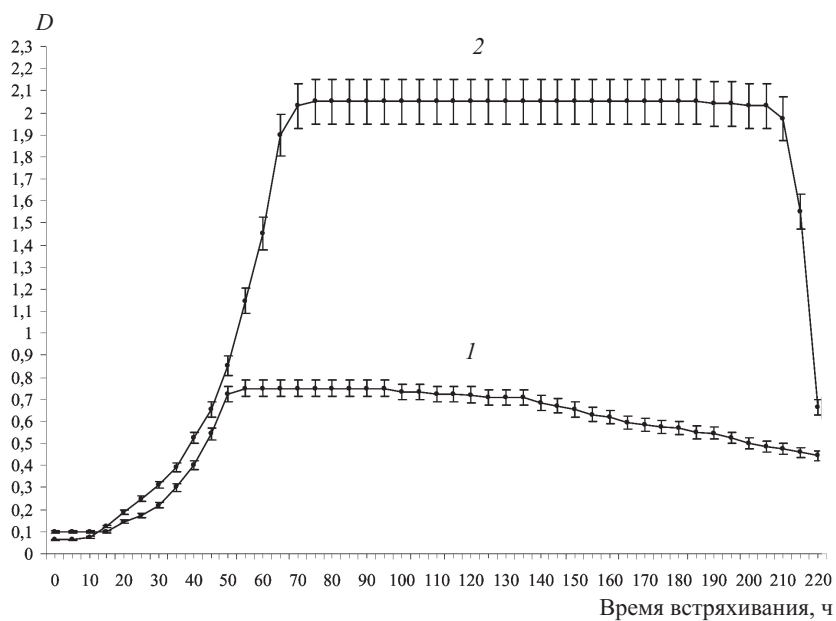


Рис. 2. Динамика роста ($1 - \lambda = 425$ нм) и продукции ЭПС ($2 - \lambda = 490$ нм) *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МСО» при 25 °С

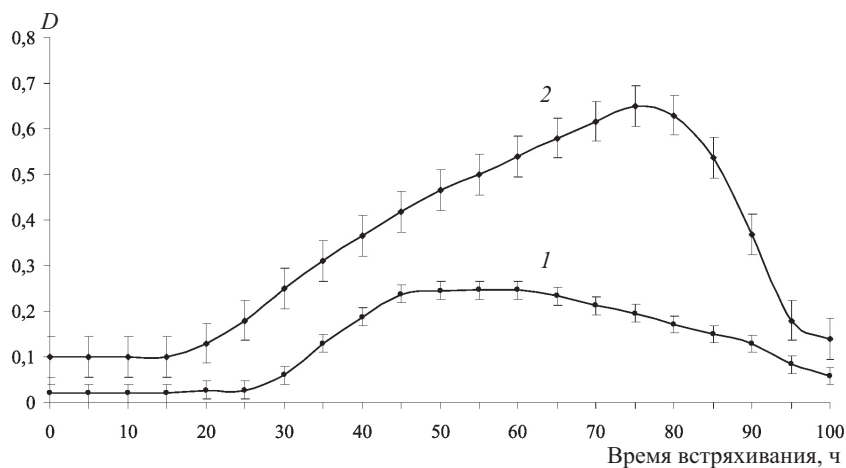


Рис.3. Динамика роста ($1 - \lambda = 425$ нм) и продукции ЭПС ($2 - \lambda = 490$ нм) *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МСО» при 31 °С



цинатом в качестве субстрата (табл.1). Аэрация способствовала росту клеток. Количество клеток увеличивалось приблизительно одинаково, как при 100, так и при 200 об/мин. Однако на среде «МСО» при обоих режимах встряхивания коли-

чество полисахарида было больше, чем на среде «МС». Максимальная продукция ЭПС – $200,0 \pm 0,8$ мг/л – была получена при выращивании клеток культуры при встряхивании с частотой 200 об/мин на среде «МСО».

Таблица 1

Влияние аэрации на рост *A. abiegnus* Z-0056 и продукцию ЭПС

Частота встряхивания, об/мин	Время культивирования, ч	Количество клеток, $\times 10^8$ кл./мл		Количество ЭПС, мг/л	
		МС	МСО	МС	МСО
200	24	4,2 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2	14,0 \pm 0,7	14,0 \pm 0,7
	46	14,2 \pm 0,7	14,0 \pm 0,7	20,0 \pm 0,9	14,0 \pm 0,7
	100	21,5 \pm 0,8	14,0 \pm 0,7	118,0 \pm 0,9	88,0 \pm 0,7
	136	20,5 \pm 0,6	11,8 \pm 0,6	96,0 \pm 0,8	200,0 \pm 0,8
100	24	2,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,3	6,0 \pm 0,3
	46	9,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,4	14,0 \pm 0,7	8,0 \pm 0,4
	100	12,8 \pm 0,6	9,4 \pm 0,5	76,0 \pm 0,8	56,0 \pm 0,8
	136	18,2 \pm 0,7	10,4 \pm 0,52	94,0 \pm 0,7	118,0 \pm 0,6
Без встряхивания	24	0	0	0	0
	46	4,2 \pm 0,2	5,6 \pm 0,3	28,0 \pm 0,4	48,0 \pm 0,4
	100	5,5 \pm 0,3	6,6 \pm 0,3	52,0 \pm 0,8	56,0 \pm 0,8
	136	6,6 \pm 0,3	6,6 \pm 0,3	68,0 \pm 0,6	64,0 \pm 0,5

Дальнейшие исследования были связаны с изучением влияния различных концентраций нитрата аммония (0,125; 0,25; 0,5 г/л) и фосфата калия (0,035; 0,07; 0,14 г/л) на рост и продукцию ЭПС *A. abiegnus* Z-0056. Рост культуры на среде «МС» при добавлении различных концен-

траций нитрата аммония был максимальным ($2,5 \times 10^9$ клеток/мл) при концентрации этого соединения в среде 0,25 г/л (рис. 4, а)). При этой же концентрации нитрата аммония продукция ЭПС была максимальной (144 мг/л) (рис. 4, б)).

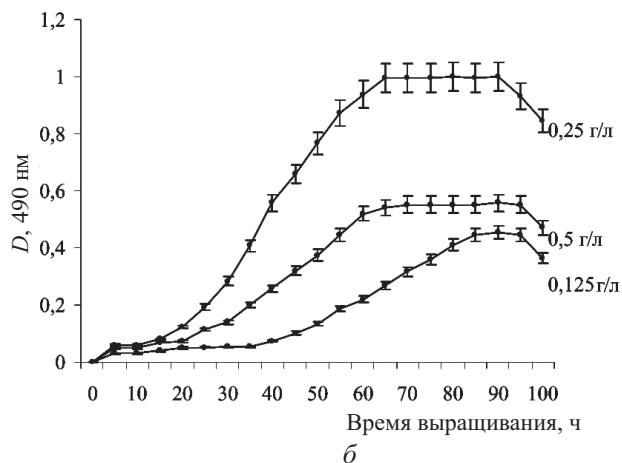
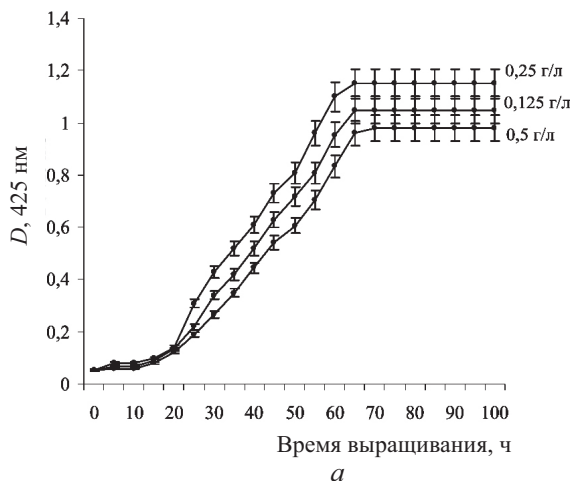


Рис.4. Динамика роста (а) и продукции ЭПС (б) *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МС» с добавлением различных концентраций азота при 25 °С

При добавлении в среду «МС» различных концентраций фосфата калия наблюдали одинаковый рост культуры при 0,035; 0,07; 0,14 г/л (рис. 5, а). Однако продукция ЭПС была максимальной (158 мг/л) при концентрации фосфата в среде 0,14 г/л (рис. 5, б).

Известно, что источники углерода также влияют на продукцию ЭПС [9]. Поэтому мы исследо-

вали влияние различных источников углерода и их концентрации на продукцию ЭПС. В качестве углерода в среду «МС» добавляли одно из следующих соединений: сукцинат, цитрат, оксалат, ксилозу и ксилан в концентрациях 1 и 3 г/л.

При культивировании *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МС» с различными источниками углерода максимальный рост ($1,6 \times 10^9$ клеток/мл) был

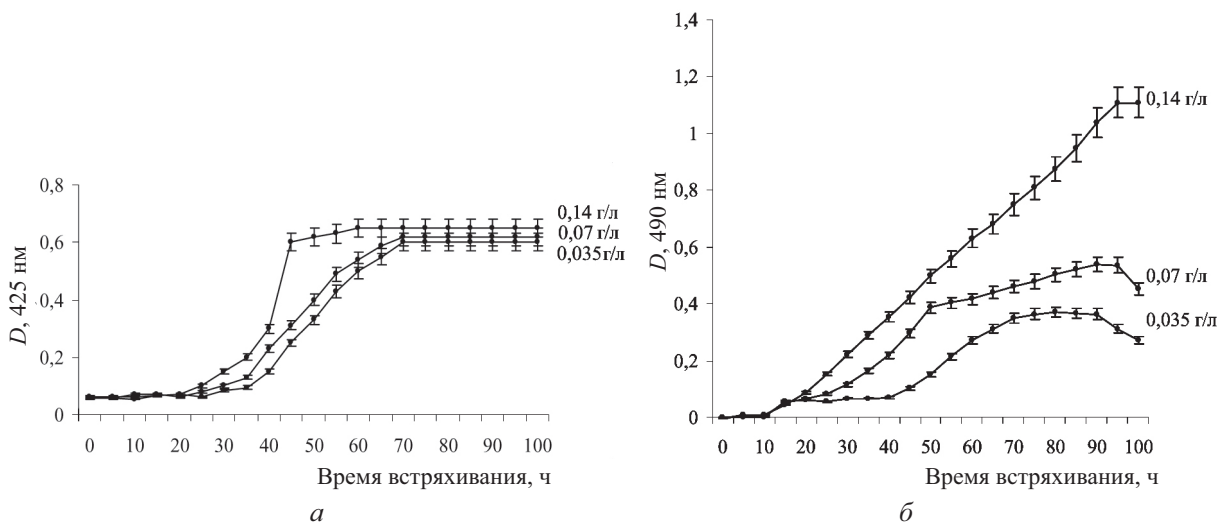


Рис. 5. Динамика роста (а) и продукции ЭПС (б) *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МС» с добавлением различных концентраций фосфора при 25 °С

установлен при использовании ксилозы и сукцината в концентрации 3 г/л (табл. 3). Несколько хуже культура росла на среде с ксилозой ($1,4 \times 10^9$ клеток/мл), сукцинатом ($1,4 \times 10^9$ клеток/мл) и цитратом ($1,0 \times 10^9$ клеток/мл) в концентрациях 1 г/л для каждого субстрата (табл. 2). В условиях эксперимента при концентрации субстрата 1 г/л рост бактерий и выделение ЭПС практически отсутствовали на средах с оксалатом и ксиланом (табл. 2), а при концентрациях 3 г/л – с ксиланом, оксалатом, а также цитратом (табл. 3).

Таблица 2

Влияние источников углерода в концентрации 1 г/л на рост *A. abiegnus* Z-0056 и продукцию ЭПС

Источник углерода (1 г/л)	Время выращивания, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС, мг/л
Сукцинат	24	6,5±0,3	52,0±0,6
	46	12,8±0,6	76,0±0,8
	72	12,8±0,6	96,0±0,8
	96	13,8±0,7	118,0±0,9
Оксалат	24	2,5±0,1	14,0±0,7
	46	3,5±0,2	14,0±0,7
	72	3,5±0,2	14,0±0,7
	96	3,5±0,2	14,0±0,7
Цитрат	24	2,0±0,1	14,0±0,7
	46	3,0±0,1	16,0±0,8
	72	6,4±0,3	34,0±0,7
	96	9,5±0,5	56,0±0,8
Ксилоза	24	5,4±0,3	0
	46	9,6±0,5	0
	72	11,4±0,6	0,6±0,03
	96	13,5±0,7	0,6±0,03
Ксилан	24	2,0±0,1	0
	46	3,6±0,2	0,5±0,02
	72	3,6±0,2	0,5±0,02
	96	3,6±0,2	0,5±0,02

Таблица 3

Влияние источников углерода в концентрации 3 г/л на рост *A. abiegnus* Z-0056 и продукцию ЭПС

Источник углерода (3 г/л)	Время выращивания, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
Сукцинат	24	6,5±0,3	43,0±0,4
	46	12,8±0,1	56,0±0,8
	72	13,0±0,1	68,0±0,4
	96	15,4±0,8	66,0±0,3
Оксалат	24	2,4±0,1	14,0±0,7
	46	3,6±0,2	14,0±0,6
	72	3,6±0,2	14,0±0,4
	96	3,6±0,2	14,0±0,5
Цитрат	24	2,0±0,1	14,0±0,3
	46	2,1±0,1	14,0±0,6
	72	2,1±0,1	14,0±0,5
	96	2,1±0,1	14,0±0,4
Ксилоза	24	7,3±0,4	0
	46	11,9±0,6	0,1±0,05
	72	17,0±0,8	0
	96	17,0±0,8	0
Ксилан	24	1,0±0,05	0
	46	2,0±0,1	0,08±0,01
	72	2,0±0,1	0,08±0,01
	96	2,0±0,1	0,08±0,01

Продукция ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 была максимальной (118 мг/л) на среде с сукцинатом в концентрации 1 г/л (см. табл. 2). Менее выраженную продукцию ЭПС наблюдали на среде с сукцинатом в концентрации 3 г/л (68 мг/л) (см. табл. 3), цитратом в концентрации 1 г/л (56 мг/л) (см. табл. 2). На средах с содержанием оксалата, ксилана в концентрации 1 г/л в условиях эксперимента не было роста культуры; на средах с



оксалатом, ксилозой, ксиланом в концентрации 1 г/л в условиях эксперимента отсутствовала продукция ЭПС культуры (см. табл. 2). На средах с оксалатом, цитратом, ксиланом в концентрации 3 г/л в условиях эксперимента рост культуры отсутствовал; а на средах с оксалатом, цитратом, ксилозой, ксиланом в концентрации 3 г/л отсутствовала продукция ЭПС (см. табл. 3).

Таким образом, в процессе исследований было показано, что различные условия культивирования влияют на продукцию ЭПС клетками *A. abiegnus* Z-0056. Оптимальными из исследованных условиями для продукции ЭПС является выращивание культуры *A. abiegnus* Z-0056 на среде «МСО» при температуре 25 °С и встряхивании при 200 об/мин. Максимальному выходу экзополисахарида способствует наличие в среде сукцината в качестве источника углерода в концентрации 1 г/л, нитрата аммония и фосфата калия в концентрациях 0,25 и 0,14 г/л соответственно.

Бактерии-олиготрофы мало изучены с биотехнологической точки зрения как возможные продуценты экзополисахарида, хотя они могут быть экономически выгодны, так как не требуют богатых питательных сред для культивирования. В данной работе изучено влияние стандартных биотехнологических параметров (температуры, аэрации, концентрации фосфора, азота и различных источников углерода) на продукцию ЭПС и намечены пути оптимизации этого процесса.

Список литературы

1. Зайчикова М. В., Берестовская Ю. Ю., Акимов В. Н., Кизилова А. К., Васильева Л. В. *Ancylobacter abiegnus* sp. nov. – олиготрофный представитель микобактериального сообщества // Микробиология. 2010. Т. 79, № 4. С. 483–490.
2. Зайчикова М. В., Берестовская Ю. Ю., Васильева Л. В. Диссипотрофные бактерии ксилотрофного сообщества в пресноводных экосистемах // Актуальные аспекты современной микробиологии : V молодеж. школа-конф. с междунар. участием. М., 2009. С. 77–78.
3. Кичемазова Н. В., Бухарова Е. Н., Жемеричкин Д. А., Берестовская Ю. Ю., Васильева Л. В., Карпунина Л. В. Экзополисахариды бактерий-диссипотрофов // Химия и биохимия углеводов : материалы IV Всерос. школы-конф. 14–16 сент. 2011 г. Саратов, 2011. С. 60–61.
4. Воробьев В. Я., Елсуков А. И. Теория и эксперимент. Минск : Выща шк., 1989. 109 с.
5. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28, № 3. P. 350–356.
6. Haggstrom L. Mutant of *Methylomonas metanolica* and its characterization with respect to biomass production from methanol // Appl. Environ. Microbiol. 1977. Vol. 33, № 3. P. 567–576.
7. Manresa A., Espuny M. J., Guinea J. et al. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910 // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 26, № 4. P. 347–351.
8. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р., Пинчук Г. Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. Киев : Наук. думка, 1992. 212 с.

УДК 630.182.2

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ИВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ МАЛЫХ РЕК ЗАУРАЛЬЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ЖИЗНЕННОГО СОСТОЯНИЯ И ГЕМЕРОБИИ



Л. Г. Курманова, А. Ю. Кулагин

Институт биологии Уфимского научного центра РАН
E-mail: kurmanova_lilia@mail.ru
E-mail: coolagin@list.ru

В составе ивняков в поймах рек Таналык, Худолаз и Карагайлы произрастают 6 видов ив: *Salix alba*, *S. cinerea*, *S. dasyclados*, *S. triandra* (f. *discolor* и f. *concolor*), *S. viminalis* и *S. vinogradowii*, при этом максимальным обилием и постоянством обладает вид *S. triandra* (f. *discolor*). Относительное жизненное состояние ивовых зарослей в условиях различ-

ной степени антропогенного загрязнения характеризуется, преимущественно, как «здоровое». В качестве наиболее устойчивых можно выделить виды *S. triandra*, *S. cinerea* и *S. alba*.

Ключевые слова: растительное сообщество, фитоценоз, ива, гемеробия, устойчивость.