



6. Нечаева О. В., Тихомирова Е. И., Заярский Д. А., Вакараева М. М. Антимикробная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода // ЖМЭИ. 2015. № 3. С. 88–92.
7. Вакараева М. М., Ульянов В. Ю., Нечаева О. В., Лунева И. О., Тихомирова Е. И., Шаповал О. Г., Заярский Д. А. Оценка антимикробной активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от его физико-химических характеристик // Саратов. науч.-мед. журн. 2015. Т. 11, № 3. С. 255–257.
8. Нечаева О. В., Заярский Д. А., Вакараева М. М., Веденева Н. В., Тихомирова Е. И. Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, и его модификаций в отношении микроорганизмов // Вестн. развития науки и образования. 2014. № 1. С. 32–36.
9. Шуришалова Н. Ф., Миндибекова Д. Е., Заярский Д. А., Нечаева О. В. Изучение антибактериальной активности новых препаратов на основе модифицированного биосовместимого полимера // Наука и образование в жизни современного общества : сб. науч. тр. по материалам междунар. науч.-практ. конф., (Тамбов, 30 апреля 2015 г.) : в 14 т. Тамбов, 2015. Т. 10. С. 156–159.
10. Федорова А. И. Практикум по экологии и охране окружающей среды. М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2001. 288 с.
11. Методическое руководство по биотестированию воды / Утверждено Минприродой России от 27 апреля 2001 г. ; Руководство по определению методов биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М. : РЭФИА, НИА-Природа, 2002.
12. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. : Изд-во мед. лит, 1986. 184 с.
13. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Главным государственным санитарным врачом СССР 6 апреля 1973 г. № 1045-73). URL: <https://www.tsvps.ru/fsvps/laws/182.html> (дата обращения: 22.02.2016).
14. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. Материалы фармкомитета РФ (Протокол № 13 от 25 декабря 1997 года) / сост. Е. В. Арзамасцев, Т. А. Гуськова, С. С. Либерман. URL: <https://www.medline.ru/public/fund/pharmcom/3.phtml> (дата обращения: 25.03.2016).
15. Лойт А. О., Савченков М. Ф. Токсикологическая оценка новых химических веществ : в 2 ч. Ч. 1. Иркутск : Изд-во Иркут. ун-та, 1992. С. 74–83.
16. Гуськова Т. А. Оценка безопасности лекарственных средств различных фармакологических групп // Новые препараты в фармакологии. 2003. № 9. С. 20–30.
17. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. : Медицина, 2005. 832 с.

УДК 674.812-419.4

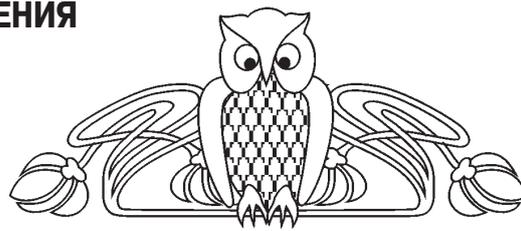
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *AZOTOBACTER VINELANDII* Д-08 ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА

Н. В. Новокупцев

Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва,
Саранск
E-mail: nikolay.novokuptsev@yandex.ru

В исследовании проведена оптимизация условий культивирования *Azotobacter vinelandii* Д-08 на питательных средах с различным содержанием мелассы – 20, 30, 40 и 50% (по массе). Установлено, что максимальное накопление полисахарида наблюдается на 72-м ч роста штамма в среде с 50% содержанием мелассы, которое составило 13,78 г/л. Результаты метода гель-хроматографии показали, что полученный полисахарид имеет молекулярную массу 0,93532 кДа и 312,5014 кДа. В ходе проведения ИК-спектроскопии Фурье и анализа полученных спектров идентифицирован исследуемый полисахарид, который по своим характеристическим пикам в областях 923 см⁻¹ и 830 см⁻¹ фуранозного кольца соответствует полисахариду левану.

Ключевые слова: *Azotobacter vinelandii* Д-08, микробный полисахарид, леван, меласса, ИК-спектроскопия.



Optimization of Cultivation Conditions of *Azotobacter Vinelandii* D-08 to Increase the Yield of Exopolysaccharide

N. V. Novokuptsev

In current research the optimization of culture conditions *Azotobacter vinelandii* D-08 on nutrient mediums with different content of molasses – 20, 30, 40 and 50% (by weight) was conducted. It is established that the maximum accumulation of polysaccharides was 13,78 g/l and it was observed at growth of the strain on the medium containing 50% molasses for 72 hours. The results of the method of gel permeation chromatography showed that the obtained polysaccharide has a molecular weight of 0.93532 kDa



and 312.5014 kDa. Carrying out of FT-IR-spectroscopy and analysis of the obtained spectrum allowed to find characteristic peaks in the areas 923 cm^{-1} and 830 cm^{-1} that corresponded to the furanose ring of the polysaccharide levan.

Key words: *Azotobacter vinelandii* D-08, microbial polysaccharide, levan, molasses, IR-spectroscopy.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-164-168

Полисахариды – это природные биополимеры, которые обладают уникальными свойствами и имеют широкий спектр применений [1, 2]. Значительный прогресс был достигнут в развитии отрасли по получению микробных внеклеточных полисахаридов (экзополисахаридов (ЭПС)), которые обладают новыми и уникальными промышленными свойствами [3, 4]. В настоящее время особенный интерес представляет использование микробных полисахаридов в качестве биологического связующего звена с целью получения древесных биокомпозиционных материалов [5–8]. Исследуемая бактерия *Azotobacter vinelandii* способна активно потреблять в качестве источника углерода сахарозу [9, 10]. В результате при культивировании данного микроорганизма на питательной среде, содержащей мелассу как источник сахарозы, образуются полисахариды [10, 11]. В связи с этим целью нашего исследования стал подбор условий культивирования штамма *Azotobacter vinelandii* Д-08 на питательных средах с различным содержанием мелассы для максимального накопления полисахарида и идентификации его структуры.

Материал и методы

Для поддержания культуры бактерий и получения посевного материала *A. vinelandii* Д-08 выращивали в биологических пробирках с использованием плотной агаризованной питательной среды следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 0,2; K_2HPO_4 – 0,8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; FeCl_3 – 0,05; Na_2MnO_4 – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0; агар-агар – 20,0, pH среды 6,8–7,2. Продолжительность культивирования 24 ч при 28°C.

Для получения инокулята *A. vinelandii* Д-08 использовали жидкую сахарозосодержащую среду того же состава без агара. Культивирование осуществляли в конических колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды. Исходным посевным материалом являлась культура на скошенной агаризованной среде, с которой делали смыв десятью миллилитрами приготовленной питательной среды. Суспензией микроорганизмов в количестве 10 мл засеивали посевные колбы со 100 мл среды. Культивирование *A. vinelandii*

проводили в термостатируемом шейкере Environmental shaker – Inkubator ES – 20/60 («BioSan», Рига, Латвия) 24 ч при 250 об/мин и температуре 28°C, pH среды 6,8–7,2. Режим стерилизации всех сред 121°C в течение 20 мин.

Осуществляли культивирование в конических колбах на 250 мл, содержащих 100 мл среды со свекловичной мелассой – 20, 30, 40 и 50% (по массе) при внесении посевного материала (инокулята) в количестве 10%.

Измерение pH питательных сред и полученных культуральных жидкостей бактерии *A. vinelandii* Д-08 проводили потенциометрическим методом с помощью портативного pH meter Waterproof марки HI 98129 («Hanna Instruments», Германия).

Экзополисахариды выделяются осаждением из культуральной жидкости. Полисахарид может быть осажден из супернатанта добавлением полярного органического растворителя, смешивающегося с водой, типа спирта или ацетона [12].

Для определения количества ЭПС проводили следующие операции: доводили массы фильтров до постоянного веса, осаждали ЭПС из супернатанта 96 % этиловым спиртом, определяли массу сухого ЭПС. Для осаждения ЭПС брали 5 мл супернатанта, к которому добавляли 10 мл 96% этилового спирта, выдерживали раствор сутки при комнатной температуре. Далее центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин с целью отделения осажденного экзополисахарид. Надосадочную жидкость сливали. К осадку полисахарида добавляли 10 мл 96% этилового спирта, тщательно перемешивали и снова центрифугировали. Такую операцию повторяли два раза. В результате получали экзополисахарид от светло-коричневой до кремово-белой окраски. Затем полученный осадок экзополисахарид переносили на предварительно взвешенные и высушенные фильтры и высушивали при 105°C до постоянной массы.

Для измерения вязкости культуральной жидкости бактерий *A. vinelandii* использовали вискозиметр портативный роторный для определения вязкости растворов Viscotester VT-04F («RION», Токио, Япония).

Определение молекулярной массы изучаемого экзополисахарид проводили методом гель-фильтрации на установке высокого давления KNAUER HPLC Pump 64 («KNAUER», Берлин, Германия). Для этого делали разведение полученной культуральной жидкости дистиллированной водой в 2 раза с последующим ее центрифугированием в течение 15 мин при 7000 об/мин.



ИК-спектроскопию Фурье проводили с целью подтверждения природы полисахарида [13, 14]. Выделенный и очищенный полисахарид, культуральная жидкость и КВг подвергались дополнительному высушиванию в течение 12–16 ч при 60 °С. Брали навеску 2–4 мг выделенного и очищенного биополимера культуральной жидкости и 100 мг КВг и измельчали в агатовой ступке. Переносили полностью в пресс-форму для изготовления таблеток. Прессовали при помощи ручного гидравлического пресса при давлении 210 бар в течение 15 минут. Спектры регистрировались на приборе ИК-фурьеспектрометр IR Prestige – 21 («Shimadzu Corporation», Токио, Япония) и обрабатывались с помощью программы IRsolution.

Результаты и их обсуждение

Нами установлено, что при культивировании исследуемого штамма содержание полисахарида возрастает (рис. 1, 2).

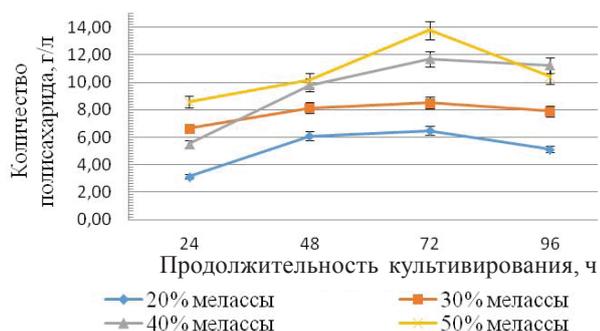


Рис. 1. Динамика накопления полисахарида в культуральной жидкости при культивировании *A. vinelandii* Д-08 при 250 об/мин и температуре 28 °С

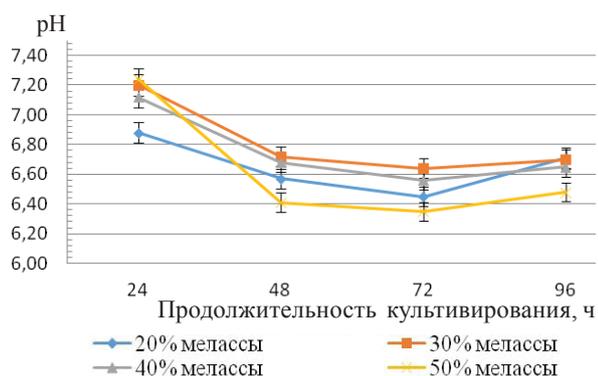


Рис. 2. Динамика изменения pH культуральной жидкости при культивировании *A. vinelandii* Д-08 при 250 об/мин и температуре 28 °С

Наибольшее накопление полисахарида наблюдается к 72 ч культивирования во всех опытах. При этом максимальное накопление было

установлено в среде, содержащей 50% мелассы, которое составило 13,78 г/л, что объясняется наибольшим содержанием сахарозы в данной среде (см. рис. 1).

Известно, что образование левана происходит за счет фермента левансахаразы, который гидролизует сахарозу на фруктозу и глюкозу. Фруктоза переносится на полимерную цепь, образуя полисахарид леван, а глюкоза включается в процессы метаболизма – используется для питания штамма *A. vinelandii* Д-08 и окисляется с образованием органических кислот [15]. В связи с этим снижается pH среды. Данные хроматограммы, полученной методом гель-фильтрации, показали, что синтезирован полисахарид с двумя разными молекулярными массами. Молекулярная масса первого пика составила 312,5014 кДа, второго пика – 0,93532 кДа.

Для идентификации исследуемого полисахарида использован метод ИК-спектроскопии Фурье. Известно, что бактерии *A. vinelandii* являются продуцентами левана и альгината [16]. Согласно паспорту штамма, выданного Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов, *A. vinelandii* Д-08 при культивировании на стандартной среде продуцирует леван. Однако в своей работе мы использовали нестандартную среду, и чтобы убедиться в том, что и при этих условиях штамм синтезирует полисахарид леван, с учетом, что метод ИК-спектроскопии является одним из самых эффективных для идентификации веществ, мы провели сравнительный анализ Фурье ИК-спектров левана, выделенного из культуральной жидкости и коммерческого препарата альгината. Полученные результаты представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, кривые 1, 2, в ИК-спектрах альгината и левана имеются полосы поглощения, характерные для всех полисахаридов – 3000–3500 см⁻¹ (колебания ОН-групп), 2900–2950 см⁻¹ (колебания СН₂-групп), 1010–1050 см⁻¹ (колебания С-О-С групп сахаров). В то же время в ИК-спектрах альгината (см. рис. 3, кривая 1) наблюдаются полосы поглощения в области 1616 и 1419 см⁻¹, обусловленные присутствием карбоксилат-ионных групп, характерных для альгинатов. В ИК-спектрах левана эти полосы отсутствуют, но четко прослеживаются пики поглощения в области 923 и 830 см⁻¹, обусловленные колебаниями ν(CO) групп и свидетельствующие о присутствии фуранозного кольца, характерного для левана [17–21].

Таким образом, сравнительный анализ ИК-спектров левана и альгината показал, что при культивировании бактерий *A. vinelandii* Д-08 на

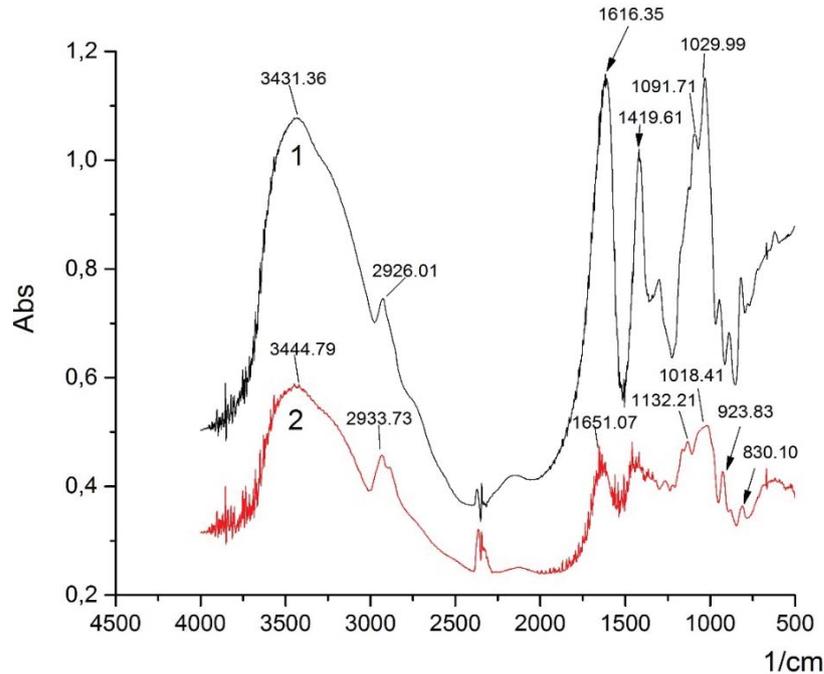


Рис. 3. ИК-спектры полисахарида альгината (1) и исследуемого полисахарида, синтезируемого *A. vinelandii* Д-08 (2)

средах, содержащих отходы перерабатывающей промышленности, образуется полисахарид леван и наибольшее его количество синтезируется через 72 ч от начала культивирования на среде с содержанием мелассы 50%.

Работа выполнена в рамках фундаментальной НИР 53/45-14 «Создание высокопродуктивных штаммов бактерий и получение на их основе биокomпозиционных материалов», поддержанной Правительством РФ [15.684.2014К] от 17 июля 2014 г.

Список литературы

1. Аркадьева З. А., Безбородов А. М., Блохина И. Н. Промышленная микробиология. М.: Высш. шк., 1989. 688 с.
2. Kumar A. S., Mody K., Jha B. Bacterial exopolysaccharides – a perception // J. of Bas. Microbiol. 2007. Vol. 47, iss. 2. P. 103–117.
3. Freitas F., Alves V. D., Reis M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications // Trends in Biotechnology. 2011. Vol. 29, iss. 8. P. 388–398.
4. Nicolaus B., Kambourova M., Oner E. T. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology // Environmental Technology. 2010. Vol. 31, iss. 10. P. 1145–1158.
5. Revin V., Novokuptsev N., Kadimaliev D. Preparation of Biocomposites using Sawdust and Lignosulfonate with a Culture Liquid of Levan Producer *Azotobacter vinelandii* as a Bonding Agent // Bioresources. 2016. Vol. 11, iss. 2. P. 3244–3258.
6. Ревин В. В., Шутова В. В., Новокупцев Н. В. Биокomпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 // Фундаментальные исследования. Технические науки. 2016. № 1. С. 53–57.
7. Ревин В. В., Шутова В. В., Кадималиев Д. А., Атыкян Н. А., Ведяшкина Т. А., Ивинкина Т. И. Теоретические и прикладные основы получения биокomпозиционных материалов с помощью биологических связующих. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. 280 с.
8. Шутова В. В., Ведяшкина Т. А., Ивинкина Т. И., Ревин В. В. Получение клеевых составов и материалов при использовании культуральной жидкости полисахаридсинтезирующих микроорганизмов // Изв. вузов. Сер. Строительство. 2010. № 3. С. 31–36.
9. Лияськина Е. В., Ревин В. В., Грошев В. М., Лияськин Ю. К. Биотехнология бактериальных полисахаридов: учеб. пособие. Саранск: Изд-во Мордов. гос. ун-та, 2010. 120 с.
10. Четвериков С. П., Логинов Я. О., Пикульцова С. А., Черкасова Д. В., Логинов О. А. Оптимизация условий культивирования и биосинтеза экзополисахарида *Azotobacter vinelandii* // Башкир. хим. журн. 2006. Т. 13, № 5. С. 8–11.
11. Пат. 2073712 Российская Федерация, С12N1/20, С12P19/04, С12N1/20, С12R1:065 Штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* (Limpan) – продуцент экзополисахарида / Краснопевцева Н. В., Чернягин А. В., Яроцкий С. В.; заявитель и патентообладатель Товарищество с ограниченной ответственностью

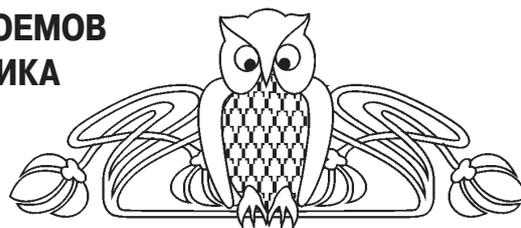


- «ИТИН» РФ. – 93000503/13 ; заявл. 05.01.2003 ; опубл. 20.02.1997, Бюл. № 23. 3 с.
12. Sutherland I. W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides // Cambridge Studies in Biotechnology 9. Cambridge : Cambridge University Press, 1990. 163 p.
 13. Базарнова Н. Г., Карпова Е. В., Катраков И. Б., Маркин В. И., Микушина И. В., Ольхов Ю. А., Худенко С. В. Методы исследования древесины и ее производных : учеб. пособие. Барнаул : Изд-во Алт. гос. ун-та, 2002. 160 с.
 14. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / пер. с англ. М. : Мир, 1982. 328 с.
 15. Yanase H., Maeda M., Hagiwara E., Yagi H., Taniguchi K., Okamoto K. Identification of functionally important amino acid residues in Zymomonas mobilis levansucrase // J. of Biochemistry. 2002. Vol. 132, iss. 4. P. 565–572.
 16. Larsen B., Haug A. Biosynthesis of alginate. Part I. Composition and structure of alginate produced of Azotobacter vinelandii (Lipman) // Carbohydrate Research. 1971. Vol. 17, iss. 2. P. 287–296.
 17. Barone J. R., Medynets M. Thermally processed levan polymers // Carbohydrate Polymers. 2007. Vol. 69. P. 554–561.
 18. Mahmood S. J., Siddique A. Ionic studies of sodium alginate isolated from Sargassum terrarium (brown alga) karachi coast with 2,1-electrolyte // J. of Saudi Chem. Soc. 2010. Vol. 14. P. 117–123.
 19. Srikanth R., Sundhar Reddy C., Siddartha G., Ramaiah M. J., Uppuluri K. B. Review on production, characterization and applications of microbial levan // Carbohydrate Polymers. 2015. Vol. 120. P. 102–114.
 20. Grube M., Bekers M., Upite D., Kaminska E. IR-spectroscopic studies of Zymomonas mobilis and levan precipitate // Vibrat. Spectroscopy. 2002. Vol. 28, iss. 2. P. 277–285.
 21. Abdel-Fattash A. F., Mahmoud D. A., Esawy M. A. Production of levansucrase from Bacillus subtilis NRS 33a and enzyme synthesis of levan and fructooligosaccharides // Current Microbiology. 2005. Vol. 51, iss. 6. P. 402–407.

УДК 574.587

МАКРОЗООБЕНТОС ГИПЕРГАЛИННЫХ ВОДОЕМОВ БОГДИНСКО-БАСКУНЧАКСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

М. Ю. Воронин¹, К. А. Гребенников², А. С. Сажнев³, С. И. Белянина⁴,
Е. Ю. Мосолова¹, З. О. Алиева¹, Ю. В. Белоногова³



¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

²Государственный заповедник «Богдинско-Баскунчакский», Ахтубинск

³Институт биологии внутренних вод имени И. Д. Папанина РАН, Борок

⁴Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

E-mail: voroninmj@yandex.ru

Macrozoobenthos of Hyperhaline Waterbodies of Bogdino-Baskunchakski Nature Reserve

M. Yu. Voronin, K. A. Grebennikov, A. S. Sazhnev,
S. I. Belianina, E. Yu. Mosolova,
Z. O. Alieva, Yu. V. Belonogova

В результате впервые проведенного исследования макрозообентоса гипергалинных водоемов (р. Горькая и прибрежная зона оз. Баскунчак) Богдинско-Баскунчакского заповедника (Астраханская область) отмечено 14 таксонов: полужесткокрылых – 3 (из семейства Corixidae: *Cymatia rogenhoferi* (Fieber, 1864), *Paracorixa concinna* (Fieber, 1848) и *Sigara assimilis* (Fieber, 1848)), хирономид – 2 (*Baeotendipes noctivaga* Kieffer, 1911, *Orthocladius* sp.), прочих двукрылых – 4 (личинки представителей семейств Limoniidae, Dolichopodidae, Ephydriidae и Tabanidae (род *Chrysops*)), жесткокрылых – 5 (Dytiscidae: *Cybister* (s. str.) *lateralimarginalis* (DeGeer, 1774) и *Dytiscus circumflexus* Fabricius, 1801, *Helophorus* (*Rhopalohelophorus*) *kirgisticus* Knisch, 1914 (Helophoridae), *Berosus* (*Enoplurus*) *frontifoveatus* Kuwert, 1888 (Hydrophilidae) и *Ochthebius* (s. str.) *zugmayeri* Kniz, 1909 (Hydraenidae)).

Ключевые слова: гипергалинные водоемы, макрозообентос, Богдинско-Баскунчакский заповедник.

Macrozoobenthos assay carried out in hyperhaline waterbodies (Gor'kaya river and Lake Baskunchak littoral) of Bogdino-Baskunchakski nature reserve yielded 14 taxa: bugs – 3 (from family Corixidae: *Cymatia rogenhoferi* (Fieber, 1864), *Paracorixa concinna* (Fieber, 1848) and *Sigara assimilis* (Fieber, 1848)), chironomids – 2 (*Baeotendipes noctivaga* Kieffer, 1911, *Orthocladius* sp.), other dipterans – 4 (Limoniidae, Dolichopodidae, Ephydriidae and Tabanidae (род *Chrysops*) larvae), beetles – 5 (Dytiscidae: *Cybister* (s. str.) *lateralimarginalis* (DeGeer, 1774) and *Dytiscus circumflexus* Fabricius, 1801, *Helophorus* (*Rhopalohelophorus*) *kirgisticus* Knisch, 1914 (Helophoridae), *Berosus* (*Enoplurus*) *frontifoveatus* Kuwert, 1888 (Hydrophilidae) and *Ochthebius* (s. str.) *zugmayeri* Kniz, 1909 (Hydraenidae)).

Key words: hyperhaline waterbodies, Macrozoobenthos, Bogdino-Baskunchakski nature reserve.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-168-170

Гипергалинные водоемы – характерный элемент ландшафта аридных территорий. Фауна