

## Экзополимеры микроорганизмов в утилизации гидрофобных субстратов \*

В. В. Дмитриев, Т. Г. Русакова, В. В. Рогачевский, А. Н. Звонарев,  
Л. И. Ахметов, С. А. Колесникова, Е. Н. Музафаров

*Аннотация.* В работе описаны структурные адаптивные перестройки у некоторых дрожжей и бактерий (дрожжи: *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulopsis candida*, *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Candida maltosa*, *Candida paralipolytica*; бактерии: *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas putida*) при утилизации гидрофобных субстратов (углеводородов нефти) в водной среде. Электронномикроскопические цитохимические исследования показали, что экзоцеллюлярные структуры микроорганизмов могут участвовать в окислении углеводородов нефти. На базе серийных полутонких срезов ассоциатов бактерий при росте на нефти была проведена реконструкция их трёхмерной организации, которая показала, что экзополимеры структурируют пространство в виде сети гранул — «трофосом».

*Ключевые слова:* дрожжи, бактерии, углеводороды нефти, электронная микроскопия, экзополимеры.

### Введение

Работа посвящена изучению структурных перестроек микроорганизмов при утилизации гидрофобных субстратов в водной среде. Микроорганизмы, благодаря ферментативным системам, единственные живые существа, способные к деструкции нефти и нефтепродуктов. В этом плане деструкция нефти микроорганизмами в водной среде является прекрасной модельной ситуацией при изучении микроорганизмов с гидрофобными сложными субстратами. Биохимическим и генетическим аспектам микробной деструкции нефти посвящено множество работ [1,2], однако остаются малоизученными структурные перестройки этого процесса. Наиболее доступными для ферментов микроорганизмов, как для бактерий, так и для дрожжей, являются *n*-алканы нефти, поэтому в этом направлении достигнут наибольший прогресс в понимании механизмов микробной

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-97561-р\_центр\_а).

деградации углеводов нефти. Если в отношении метаболических путей и генов, ответственных за эти процессы, достаточно много известно, то в отношении локализации ферментов первичного окисления углеводов нефти много непонятного. До сих пор также неясно: каковы транспортные механизмы проникновения углеводов, если они проникают в клетки, например, длинноцепочечных *n*-алканов, в бактериальные и дрожжевые клетки [2,3]. Если рассмотреть возможную стратегию взаимодействия микроорганизмов с таким неудобным и гидрофобным субстратом, как углеводороды нефти, то можно представить себе их несколько: (1) первичная деградация субстрата вне клетки при помощи секретируемых ферментных систем, (2) проникновение субстрата через наружную мембрану у грамотрицательных бактерий, где между плоскостями двух мембран осуществляется непосредственный контакт и первичная деградация субстрата, (3) облегчение контакта клеток с гидрофобным субстратом посредством секреции биоэмульгаторов (4) формирование субстратзависимых экзоцеллюлярных структур, специализирующихся на связывании и утилизации углеводов нефти.

Совершенно очевидно, что такой сложный процесс, как деградацию основных углеводов нефти неспособны осуществить индивидуальные микроорганизмы, в этом случае важны процессы синтрофии и кометаболизма [3,4,5]. Лишь структурированная микробная ассоциация позволяет увеличить эффективность и глубину разложения компонентов нефти.

В данной работе на примере бактерий и дрожжей показаны структурные перестройки, отражающие характер взаимодействия микроорганизмов с гидрофобным трудноутилизуемым субстратом. На базе светооптических, электронномикроскопических, цитохимических данных и применения метода трёхмерной компьютерной реконструкции серийных полутонких срезов предлагается структурная модель функционирования микробных ассоциатов в процессе деструкции гидрофобных трудноутилизуемых субстратов (таких как нефть) в водной подвижной фазе.

## Материалы и методы

**Дрожжи:** *Schwanniomyces occidentalis* ИБФМ-У-395, *Torulopsis candida* ИБФМ-У-451, *Candida tropicalis* ИБФМ-У-303, *Candida lipolytica* ИБФМ-У-155, *Candida maltosa* ИБФМ-У-820, *Candida paralipolytica* №739 (из отдела биосинтеза ферментов Института Микробиологии РАН) из ВКМ. **Бактерии:** *Rhodococcus sp.* S67, *Pseudomonas putida* BS3701 из коллекции лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино). Бактерии выращивали на круговой качалке (120 об/мин) в колбах, на среде Эванса с нефтью (2%) при 24°C. Для культивирования дрожжей использовали среду «Yeast Nitrogen

Base» (Дифко, США), где в качестве источника углерода добавляли 1% гексадекана или смесь *n*-алканов (C<sub>12</sub>–C<sub>20</sub>) или нефть.

**Количественное определение** углеводов нефти проводили по методу Махова и Довгун [6].

**Фракции дрожжевых клеточных стенок** получали путём дифференциального центрифугирования механически дезинтегрированных клеток.

#### **Электронная микроскопия.**

Электроннокриофрактографические исследования и приготовление реплик проводили по методике, описанной ранее [7].

Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Ultracut E (Австрия).

Ультратонкие срезы. Осадок клеток микроорганизмов фиксировали в 1,5% растворе глутарового альдегида в 0,05М какодилатном буфере (рН 7,2) при 4°C в течение 1 часа и дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> в 0,05М какодилатном буфере (рН 7,2) в течение 3 часов при 20°C. После обезвоживания материал заключали в эпоксидную смолу Епон 812. Ультратонкие срезы после электронноцитохимических реакций не контрастировали. При необходимости проводили дополнительное контрастирование цитратом свинца при 20°C в течение 4–5 минут.

#### **Электронно-цитохимическое выявление полисахаридов.**

Для выявления полисахаридных компонентов микробных клеток использовали методику фиксации с рутениевым красным по Luft [8].

#### **Электронно-цитохимическое выявление гемосодержащих окислительных ферментов.**

Для выявления окислительных ферментов использовали метод контрастирования окисленным диаминобензидином по Hirai [9].

#### **Иммуноцитохимия.**

Для иммуноцитохимических исследований клетки, фиксированные в 1,5% глутаральдегиде заключали в смолу Ловикрил К4, в которой они были полимеризованы при температуре –40°C. На ультратонкие срезы был использован метод двойного окрашивания: специфическими поликлональными антителами к дрожжевому цитохрому Р-450 и комплексом «белок А — золото» (диаметр золотых частиц — 15 нм).

Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

#### **Реконструкция трёхмерного изображения (3D).**

С поверхности образца по всей площади поперечного среза образца с помощью алмазного ножа получали полутонкие срезы (0,5 мкм толщиной). С каждого блока получали не менее 40 срезов на каждую серию. Для 3D реконструкции использовали серии микрофотоснимков, полученные на световом микроскопе AXIO Imager A1 (ZEISS) с помощью цифровой фотокамеры AxioCam (ZEISS) и программы AxioVision AC. На сериях выровненных срезов по контурам изображений при помощи программы IGL

Trace 1.26b [10] строили 3D объекты и экспортировали в WRML формат. Для окончательной реконструкции трёхмерного изображения использовали программу Aodesk 3ds Max 9.

## Результаты

### Рост дрожжей на углеводородах нефти.

Дрожжи по структурным изменениям поверхностных компонентов при росте на углеводородах нефти можно разделить на два типа, которые могут быть отражением их метаболических особенностей. Один тип дрожжей, включающий роды *Candida*, *Torulopsis*, *Shwanniomyces*, при росте на гексадекане или смеси *n* — алканов (C12–C20) или нефти образуют в клеточной стенке однотипные модифицированные участки — «каналы». Они располагаются по всей поверхности клеток и могут достигать до 100 нм на одну клетку. Особенно наглядно это видно на углеродно-платиновых репликах поверхности клеток (рис.1). При переносе клеток с «каналами» в среду с глюкозой в качестве источника углерода, происходило образование новых клеток, но уже без «каналов». Таким образом, совершенно очевидно, что образование «каналов» является субстратзависимым процессом. При этом в среде культивирования происходит накопление большого количества фибриллярного вещества. На ультратонких срезах и криосколах можно увидеть анатомическую связь «каналов» с экзосомом (рис.2,3).



Рис. 1. Углеродно-платиновая реплика поверхности дрожжей *Schwanniomyces occidentalis* при росте на *n*-алканах. С — «канал»

Другой тип дрожжей при росте на углеводородах нефти не связан с образованием «каналов» в клеточной стенке. Было обнаружено, что дрожжи *Candida lipolytica* и *Candida paralipolytica* при росте на углеводородах нефти не образуют «каналы», но также секретируют в среду культивирования большое количество фибриллярного вещества. При этом поверхность углеродноплатиновых реплик выглядит достаточно однородной. Вероятно,

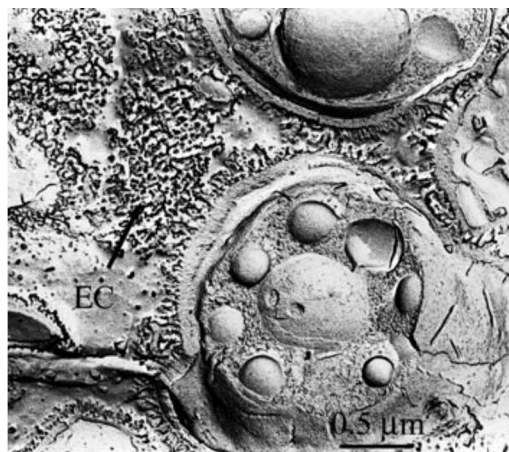


Рис. 2. Криофрактографический скол дрожжевой клетки *Torulopsis candida* при росте на *n*-алканах. EC — экзоцеллюлярные компоненты

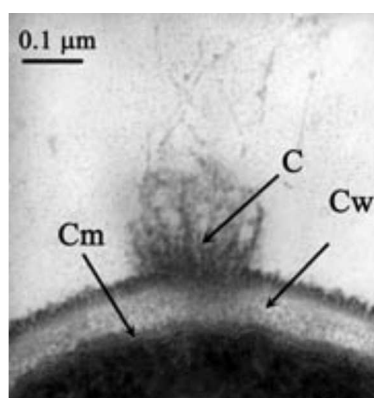


Рис. 3. Ультратонкий срез дрожжей *Torulopsis candida* при росте на *n*-алканах. C — «канал», CW — клеточная стенка, CM — цитоплазматическая мембрана

секреция фибриллярного вещества в культуральную среду происходит по всей поверхности дрожжевых клеток. При этом в среде культивирования происходит образование достаточно большого количества полимерных плёнок.

#### **Бактерии при росте на нефти.**

Как видно на Рис 4 клетки *Rhodococcus sp.* S67 проникают вглубь капли, а клетки *Pseudomonas putida* BS3701 «атакуют» каплю нефти снаружи. Это вероятно связано с характером модификации клеточной поверхности и особенностями взаимодействия этих видов бактерий с нефтяными каплями.

При этом было обнаружено, что бактерии секретируют в среду культивирования большое количество вещества полисахаридной природы.

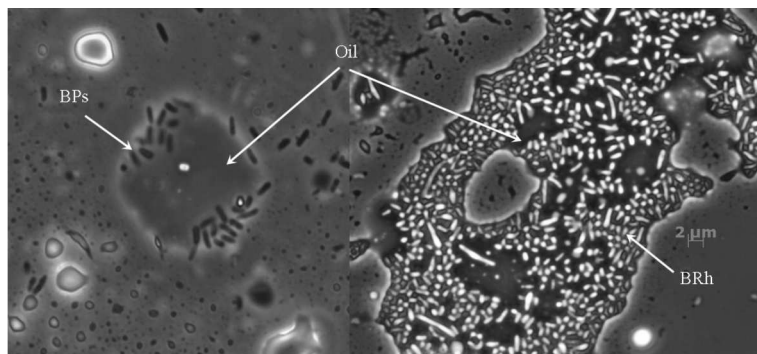


Рис. 4. Фазово-контрастная микроскопия (x100 увеличение). Взаимодействие бактерий с каплей нефти. (а) *Pseudomonas putida* BS3701, (б) *Rhodococcus* sp. S67 Условные обозначения: BPs — *Pseudomonas putida* BS3701, BRh — *Rhodococcus* sp. S67, Oil — капля нефти

Об этом свидетельствуют данные по анализу полутонких срезов и данные электронной микроскопии по контрастированию полисахаридов рутениевым красным (рис.5). Особенно выраженный эффект образования экзоцеллюлярных веществ был у бактерий при культивировании их в смешанной культуре. Сравнительное измерение степени деструкции нефти отдельными культурами и их ассоциатом (рис.6) показало, что наиболее эффективным является ассоциат, это указывает на полезное сложение свойств двух бактерий разных родов — деструкторов нефти.

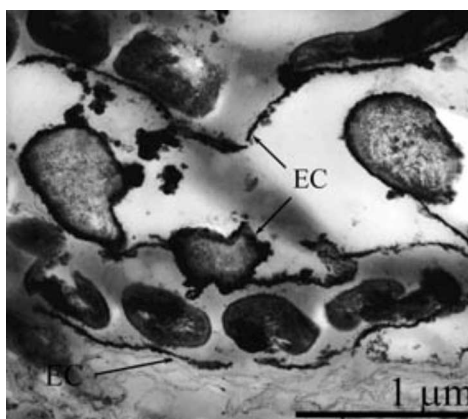


Рис. 5. Ассоциат бактерий (*Pseudomonas putida* BS3701, *Rhodococcus* sp. S67). Электронноцитохимическая реакция на полисахариды (контрастирование Рутениевым красным). Рост на нефти. Условные обозначения: EC — экзоцеллюлярные компоненты. Стрелками показан продукт реакции

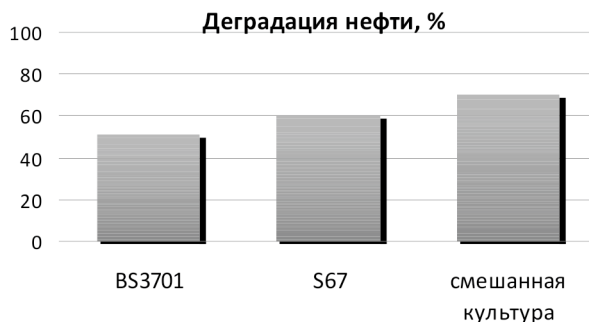


Рис. 6. Деградация нефти (%) за 20 суток в жидкой подвижной среде

### Локализация окислительных ферментов. Электронноцитохимический анализ

#### 1. Рост дрожжей на углеводородах нефти.

Электронноцитохимическая реакция на окислительные ферменты у дрожжей образующих «каналы» при росте на углеводородах нефти показывает, что продукт реакции локализован в веществе «каналов», указывая на то что эти структуры принимают участие в утилизации углеводов. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что при переносе дрожжей в культуральную среду с глюкозой в качестве источника углерода происходит исчезновение (удаление) «каналов» из клеточной стенки и клеточная стенка при этом приобретает обычную структуру, характерную для аскомицетных дрожжей. Нами было также показана локализация окислительных ферментов в «каналах» на фракциях (рис.7) клеточных стенок (т.к. называемых «чехлах»), что свидетельствует о прочности связывания ферментов с модифицированными участками клеточной стенки. О том, что модифицированный участок клеточной стенки («канал») может быть местом первичного окисления углеводов свидетельствуют также данные о иммуноцитохимической локализации цитохрома P-450 (рис.8) у дрожжей при росте на углеводородах нефти. Была показана концентрация метки в определённых участках клеточной стенки.

У дрожжей другого типа (*Candida paralipolytica* и *Candida lipolytica*), не образующих «каналы» при росте на углеводородах нефти, продукт реакции на окислительные ферменты обнаруживался по всей поверхности клеток и на экзоцеллюлярных плёнках (рис.9).

#### 2. Рост бактерий на углеводородах нефти.

Локализации продукта реакции с диаминобензидином у бактериальных клеток *Rhodococcus sp. S67* и *Pseudomonas putida* при росте на нефти была сходной с таковой, которую мы наблюдали у дрожжей не образующих «каналы» при росте на углеводородах: в клеточной стенке и на экзоцеллюлярной плёнке (рис.10,11).

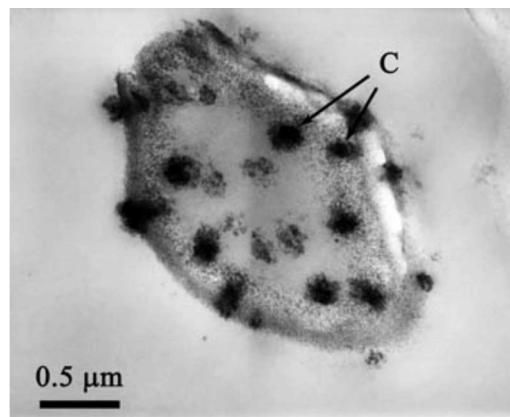


Рис. 7. Фракция клеточных стенок дрожжей *Torulopsis candida*. Электронноцитохимическая реакция на окислительные ферменты (реакция с 3'3'-диаминобензидином). С — «канал»

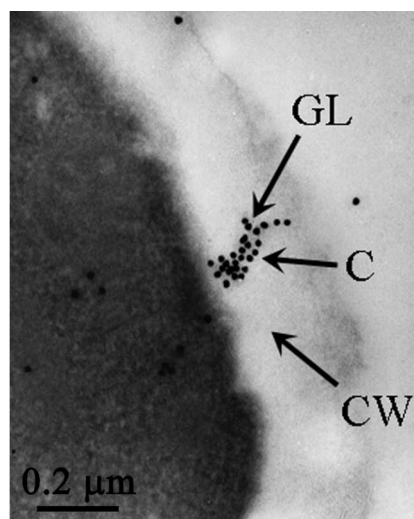


Рис. 8. Дрожжи *Candida maltosa*, рост на *n*-алканах. Иммуноцитохимическая реакция с цитохромом P-450. (Protein A- Gold метка = 15 нм). С — «канал», CW — клеточная стенка, GL — золотая метка

### Трёхмерная компьютерная реконструкция бактериального ассоциата при росте на углеводородах нефти.

Следующий этап нашей работы был попыткой выяснить следующий вопрос: имеется ли какая-либо целесообразность в наличии в культуральной среде при росте микроорганизмов на углеводородах нефти большого количества полимерных образований в виде фибрилл и плёнок или же этот процесс хаотичный. Происходит ли формирование структур,



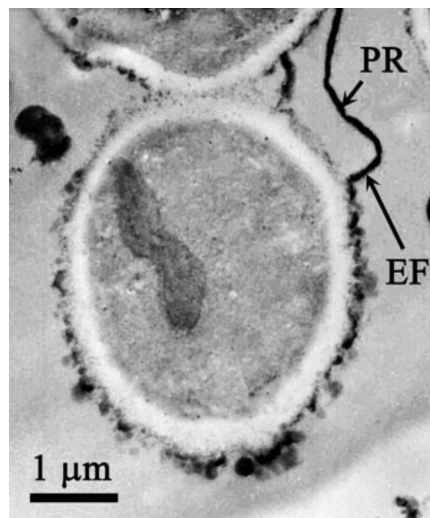


Рис. 9. Дрожжи *Candida paraliipolytica* при росте на *n*-алканах. Электронноцитохимическая реакция на окислительные ферменты (реакция с ДАБ) Условные обозначения: Е — экзоцеллюлярная пленка. Стрелкой обозначен продукт реакции

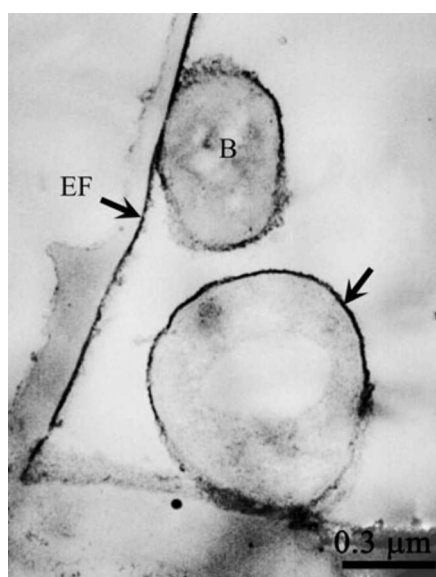


Рис. 10. Бактерии *Rhodococcus sp.* S67 при росте на нефти. Электронноцитохимическая реакция на окислительные ферменты (с ДАБ). В — бактерии. Стрелкой показан продукт реакции

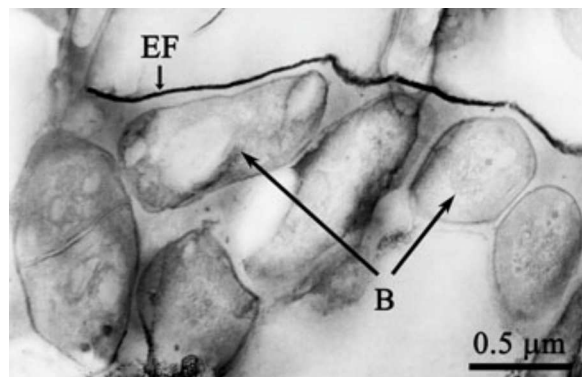


Рис. 11. Бактерии *Pseudomonas putida* BS3701 при росте на нефти. Электронноцитохимическая реакция на окислительные ферменты. В — бактерии. Стрелкой показан продукт реакции

улучшающих трофическую ситуацию в условиях потребления таких сложных гидрофобных субстратов, каким являются нефть и её отдельные компоненты? В качестве моделей для выяснения структурных особенностей поведения микроорганизмов в подвижной водной среде при утилизации гидрофобных субстратов мы использовали ассоциат бактериальных клеток *Rhodococcus sp.* S67 и *Pseudomonas putida* при росте на нефти в качестве единственного источника углерода при культивировании в качалочных колбах. Для этой цели была применена трёхмерная компьютерная реконструкция серийных полутонких срезов вышеупомянутого ассоциата (рис.12). Полученные данные указывают на большую вероятность того, что в данной физиологической ситуации происходит формирование «трофических» везикул — гранул, в которые заключены и субстрат и метаболически связанные различные виды микроорганизмов. В сети «трофических» гранул могут встречаться, как полностью замкнутые, так и разомкнутые гранулы — представляющие собой, вероятно, «ловушки» для питательного субстрата. Анализ серийных срезов показывает, что вероятней всего, «трофическая» единица «трофосома» после полной утилизации субстрата распадается и процесс утилизации субстрата в целом выглядит как «распад и сборка» функциональных единиц в общей сети экзоцеллюлярных гранул-везикул.

### Обсуждение

В данной работе на дрожжах и бактериях рассмотрена ситуация, в которой микроорганизмы в водной подвижной фазе утилизируют гидрофобные субстраты, в частности, углеводороды нефти. Определённые виды дрожжей обладают уникальной способностью при росте на углеводородах нефти модифицировать свою клеточную стенку образуя «каналы». Была изучена биохимия образования «каналов», связанная с

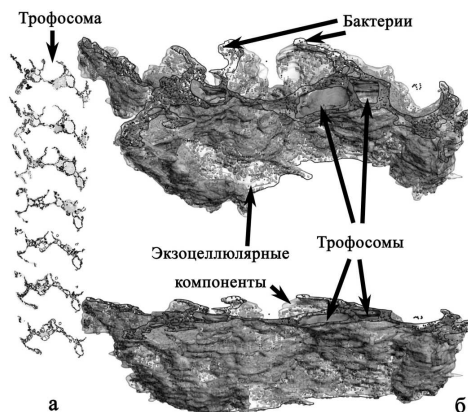


Рис. 12. Компьютерная реконструкция сети везикул-гранул (б) на базе серийных полутонких срезов (а)

реконструкцией основных полисахаридов клеточной стенки аскомицетных дрожжей, также выявлена гидрофобность и наличие в них большого количества белкового материала. В данной работе приводятся данные указывающие на то, что «каналы» способствуют утилизации углеводов нефти. Локализация продукта реакции на окислительных ферментах в «каналах» предполагает, что комплекс ферментов, участвующий в первичном окислении углеводов, может быть заложен именно в этих структурах. Об этом же свидетельствует и локализация цитохрома P-450 в экзоцеллюлярных компонентах дрожжей. Обычно в литературе обсуждаются два класса ферментных систем, участвующих в первичном окислении длинноцепочечных *n*-алканов: (1) класс энзимов, относящихся к цитохрому P-450, выявляемых у дрожжей и бактерий и (2) класс алкановых гидроксилаз бактерий [2,4]. Можно предположить, что «каналы» являются частью субстратзависимого комплексного образования состоящего из экзополимеров, в состав которых могут входить эмульгаторы, способствующие связыванию углеводов и самих «каналов», в которых концентрируются ферменты первичного окисления. Трудно представить, чтобы эти сложные экзоцеллюлярные и достаточно прочные полимерные конструкции, требующие для их создания много энергии, выполняли функцию только биоэмульгаторов, но и принимали участие в начальных этапах утилизации субстратов. Очевидно, что существует несколько механизмов утилизации микроорганизмами отдельных компонентов нефти. Предполагается, что микробная деструкция *n*-алканов — более доступных для утилизации, может происходить по выше описанному сценарию. Понятно, что для фундаментального доказательства этого факта недостаточно использованных нами методов и дальнейшее развитие высказанного предположения потребует использования дополнительных современных аналитических и генетических подходов. Полученные в

данной работе результаты позволяют предположить схему кооперативного микробного сообщества, взаимодействующего со средой обитания на основе трофических связей. Физическая организация такого микробного сообщества подчиняется правилу, обеспечивающему наиболее быстрый обмен веществами между взаимодействующими организмами. С этой точки зрения, возникают физико-химические взаимодействия, которые связаны с локализацией клеток друг относительно друга и обусловлены формированием структур за счет секретируемых клеткой экзополимеров. За счет образования экзополимеров микробное сообщество создает нечто вроде наружной ткани, которая в зависимости от физиологической ситуации может выполнять различные функции. Например, (1) экзополимеры могут удерживать микроорганизмы внутри локального пространства и обеспечивать макростабильность по отношению к физическим факторам, прежде всего вымыванию, (2) обеспечивать макроструктуру сообщества с оптимальными диффузионными расстояниями, (3) связывать питательные вещества, (4) ограничивать проникновение вредных факторов как химической природы, так и питающихся микроорганизмами хищников-протист.

В практическом отношении полученные данные могут быть полезны для поиска путей повышения устойчивости и жизнеспособности ассоциатов микробных клеток, используемых в биопрепаратах. При моделировании различных микробных препаратов очень важно учитывать структурно-функциональную организацию микробного сообщества, формирование которого происходит при участии экзополимеров, способных к структурированию элементов путём гранулообразования.

### Список литературы

1. *Cerniglia C.E.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Biodegradation*. 1992. V.3. P.351–368.
2. Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes / A. Wentzel [et al.] // *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2007. V.76. P.1209–1222.
3. Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy / E. Distra [et al.] // *Scanning*. 2005. V.27. P.176–180.
4. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases / J.B. Van Beilen [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V.72. P.59–65.
5. GESNOMA. Novel microarray design strategy to study complex bacterial communities / A. Huyghe [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V.74. P.1876–1885.
6. *Махов А.А., Довгун Л.И.* Способ определения биомассы и остаточных углеводов в культуральной жидкости в условиях непрерывного процесса выращивания кормовых дрожжей на средах с высоким содержанием парафинов // *Микробиол. синтез*. 1969. Т.11–12. С.46–49.

7. Физте Б.А., Заичкин Э.И., Ратнер Е.Н. Новые метода физического препарирования биологических объектов для электронномикроскопических исследований. Пущино-на-Оке: Наука, 1973. 147 с.
8. Luft J.H. Fine structure of capillary and endcapillary layer as revealed by ruthenium red // Feder. Proc. 1966. V.25. P.1773–1783.
9. Hirai K.-I. Comparison between 3,3'-diaminobenzidine and autooxidized 3,3'-diaminobenzidine in the cytochemical demonstration of oxidative enzymes // J. Histochem. Cytochem. 1971. V.19. P.434–442.
10. Fiala J.C. Three-dimensional structure of synapses in the brain and on the web // Proceedings of the 2002 International Joint Conference on Neural Networks. Honolulu. Hawaii, 2002. 1–4.

Дмитриев Владимир Васильевич (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), к.б.н., старший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино.

Русакова Татьяна Геннадьевна (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), младший научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрыбина РАН, Пущино.

Рогачевский Вадим Валерьевич (rog\_v@mail.ru), к.б.н., старший научный сотрудник, Институт биофизики клетки РАН, Пущино.

Звонарев Антон Николаевич (xelic@rambler.ru), аспирант, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрыбина РАН, Пущино.

Ахметов Линар Имамметдинович (akhmetovscience@rambler.ru), к.б.н., научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрыбина РАН, Пущино.

Колесникова Светлана Александровна (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), младший научный сотрудник Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино.

Музафаров Евгений Назибович (emuzafarov@mail.ru), д.б.н. профессор, зав. кафедрой, кафедра биотехнологии, Тульский государственный университет.

## Role of microbial exopolymers in the utilization of hydrophobic substrates

V. V. Dmitriev, T. G. Rusakova, V. V. Rogachevsky, A. N. Zvonarev,  
L. I. Akhmetov, S. A. Kolesnikova, E. N. Muzafarov

*Abstract.* Yeasts *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulopsis candida*, *Candida tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. maltosa*, *C.paralipolytica* and bacteria *Rhodococcus*

*sp.*, *Pseudomonas putida* undergo structural changes when adapting to utilization of hydrophobic substrates (oil hydrocarbons) in aquatic media. Electron microscopic and cytochemical examinations showed that exocellular structures of microorganisms can participate in oxidation of oil hydrocarbons. The 3D reconstruction of the structure of bacterial associations, based on their semi-thin series sections, showed that exopolymers, excreted by these bacteria when grown on oil hydrocarbons, are able to structure the environment in the form of granules called «trophosomes».

*Keywords:* yeast, bacteria, oil hydrocarbons, electronic microscopy, exopolymers.

*Dmitriev Vladimir* (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), candidate of biological sciences, senior researcher, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of RAS, Pushchino.

*Rusakova Tatyana* (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), junior researcher, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of RAS, Pushchino.

*Rogachevsky Vadim* (rog\_v@mail.ru), candidate of biological sciences, senior researcher, Institute of cell biophysics of RAS, Pushchino.

*Zvonarev Anton* (xelie@rambler.ru), postgraduate student, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of RAS, Pushchino.

*Akhmetov Linar* (akhmetovscience@rambler.ru), candidate of biological sciences, researcher, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of RAS, Pushchino.

*Kolesnikova Svetlana* (dmitriev@ibpm.pushchino.ru), junior researcher, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms of RAS, Pushchino.

*Muzafarov Evgeny* (emuzafarov@mail.ru), doctor of biological sciences, professor, head of department, department of biotechnology, Tula State University.

*Поступила 20.06.2012*