

Применение различных молекулярно-биологических методов в микробиологии дало возможность более глубокого изучения микробных сообществ. Например, метод реассоциации связан с определением скорости реассоциации ДНК, экстрагированной из почвы. Процесс реассоциации выделенной и расплавленной ДНК исследуют спектрофотометрически, используя геном *Escherichia coli* в качестве этанола. По мнению исследователей, константа реассоциации является идеальной количественной характеристикой, выражающей количество пар оснований в негомологичной ДНК. Она эквивалентна размеру генома в целом и может быть использована для характеристики разнообразия бактериальных сообществ, а также происходящих в них изменений, связанных с различными воздействиями – природными и антропогенными. Получить количественную информацию о метаболически активных или численно доминирующих популяциях в почве можно используя метод гибридизации с олигонуклеотидными маркерами *in situ*, мечеными флуоресцентными красителями. Метод основанный на выделении экстрактов ДНК из почвы при помощи дифференциального центрифугирования в градиенте CsCl позволяет в дальнейшем провести более детально исследование молекулярными методами – гибридизация, фингерпринт и т.д. Большинство работ по оценке биоразнообразия почв и изучению филогенетических взаимоотношений внутри сообществ микроорганизмов базируются на исследованиях нуклеиновых кислот при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.) [7, 8].

Определение микробного разнообразия почв при помощи молекулярно-генетических методов проводится давно. Так, Ueda T., et. al. при изучении почвы под посевами сои констатировал наличие крупных групп: грамположительные бактерии с высоким содержанием Г+Ц, зеленые серные бактерии, протеобактерии, креноархеи и клоны, которые не попадают ни в один из известных основных фило типов домена Bacteria, представленных в виде филогенетического дерева /8/. Широкое использование молекулярно-генетических методов приводят к описанию новых видов микроорганизмов. Так, при анализе атлантической лесной экосистемы (Бразилия) было описано, что преобладающими группами являются *Acidobacteria* (63%), далее следуют *Proteobacteria* (25,2%), *Gemmatimonadetes* (1,6%), *Actinobacteria* (1,2%), *Bacteroidetes* (1%), *Chloroflexi* (0,66%), *Nitrospira* (0,4%), *Planctomycetes* (0,4%) и *Firmicutes* (0,26%). 48 последовательностей (6,5%) представлены неизвестными бактериями /9/. Статистический анализ показал, что бактериальное разнообразие находится под влиянием таких факторов, как высота, соотношение Ca^{2+} / Mg^{2+} , содержание Al^{3+} и фосфора.

1Чернов И.Ю. Биологическое разнообразие: сущность и проблемы //Успехи совр. биологии. 1991, т.3, вып. 4. С 499-507.

2Розанов С.К. Показатели разнообразия в оценке сукцессионного состояния экосистем. //Успехи совр. биол. 1999, т. 119, №4. С. 404 -410

3Добровольская Т.Г., Лысак Л.В., Зенова Г.М., Звягинцев Д.Г. Бактериальное разнообразие почв: оценка методов, возможностей, перспектив. //Микробиология, 2001, №92. С. 149-167

4 Сыдыкбекова Р.К., Бержанова Р.Ж., Мукашев Т.Д., Шигаева М.Х. Численность бактерий в подзональных почвах равнинной территории Казахстана //Вестник КазНУ, серия экологическая 2011 № 4. - С. 14 – 17.

5Заварзин Г.А., Жилина Г.Н., Клевбрин В.В. Алкалофильное сообщество и его функциональное разнообразие. //Микробиология, 1999, т. 68. С. 579-5995

6 Звягинцев Д.Г., Бабьева И.Н., Зенова Г.М., Полянская Л.М. Разнообразие грибов и актиномицетов и их экологические функции. //Почвоведение, 1996, №6. С. 705-713

7 Kirk J. L., Beaudette L.A, Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. Methods of studying soil microbial diversity //Journal of Microbiological Methods. – 2004. - № 58. – P.69–188.

8 Ueda T., Suga Y., Matsuguchi T. Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field // Eur. J. Soil. Sci. - 1995. - V.46. - P.415 – 421.

9 Faoro H., Alves A. C., Souza E. M., Rigo L. U., Cruz L. M., Al-Janabi S. M., Monteiro R. A., Baura V. A., Pedrosa F. O. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic forest // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. - Vol. 76, № 14. - P. 4744-4749.

К.Х. Алмагамбетов, Н.Б. Молдагулова, С.С. Ануарбекова, З.С. Сармурзина
КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ
(Республиканская коллекция микроорганизмов, e-mail: rcmkz@list.ru)

В настоящей работе представлены сведения о коллекции промышленных микроорганизмов, касающиеся таксономии, численности, технологий хранения и генотипирования культур. Столь же актуальны вопросы оценки интеллектуального потенциала промышленных штаммов, развития коллекций тест-культур.

Микробиология является важной составляющей биологической науки, относится к фундаментальным дисциплинам высшей школы, как в университетах биологического профиля, так и в

медицинских вузах. Никто не сомневается в том, что достижения и перспективы развития биологических технологий в самых разных сферах человеческой деятельности основаны на использовании микроорганизмов, наряду с объектами животного и растительного происхождения.

История развития микробиологии в нашей республике подобна вчерашним общесоюзным и сегодняшним мировым тенденциям ее развития. Начиналась она с микробиологии почвы и воды, с сельскохозяйственной микробиологии, далее самостоятельное развитие получили медицинская и санитарная микробиология, затем и промышленная микробиология. Со второй половины прошедшего столетия берет начало развитие микробиологической промышленности, производство биопрепаратов на основе микробиологического синтеза и процессов брожения, а с конца ее – развиваются технологии получения при помощи генно-модифицированных микроорганизмов рекомбинантных белков, в том числе медицински значимых гормонов и цитокинов.

Развитие микробиологии в Казахстане связано с научной и педагогической деятельностью ученых-микробиологов, открывавших соответствующие научные институты и кафедры при вузах, создавших научные школы, являющихся авторами монографий, учебников и учебных пособий по микробиологии, а также крупных внедрений практических разработок в производство. Это Макиров К.А., Шамес Д.Л., Жуматов Х.Ж., Чулаков Ш.А., Иллыетдинов А.Н., Шигаева М.Х., Ахматуллина Н.Б., Никитина Е.Т., Тулемисова К.А., Жубанова А.А., медицинские микробиологи - Котова А.Л., Снопкова В.А, Сарбасова Ш.И. и др.

Среди научных организаций и вузов республики большой вклад в развитие микробиологии внесли коллективы Института микробиологии и вирусологии (ИМиВ) и кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии КазНУ им. аль-Фараби. В лабораториях этих организаций начиналось интенсивное развитие фундаментальных и прикладных исследований; они и сегодня остаются в Казахстане признанными флагманами научных исследований и разработок в области микробиологии.

Каковы сегодняшние направления научных исследований и разработок в области микробиологии? Анализ тематик грантов, выигравших конкурс Комитета науки МОН РК на 2012 -2014 годы по направлениям «Науки о жизни», «Интеллектуальный потенциал...», «Глубокая переработка...» и «Энергетика...» показало следующее.

По направлению «Науки о жизни» тематика 14 грантовых исследований связана с разработкой микробных биопрепаратов. Это пробиотики, заквасочные культуры, кормовые добавки, биоинсектициды, биоудобрения и нефтедеструкторы.

По направлению «Интеллектуальный потенциал» - 11 грантов, в том числе 2 по разработке биопрепаратов для ростостимуляции и борьбы с фитопатогенами сельскохозяйственных растений, 1 по селекции энтомопатогенных микроорганизмов, 2 по исследованию гетеротрофных бактерий реки Есиль, 2 по селекции микроорганизмов-нефтедеструкторов и 4 гранта по сохранению и развитию коллекций промышленных микроорганизмов.

По направлению «Глубокая переработка.» 5 грантов, в том числе по разработке пробиотиков для птицеводства, получению пробиотических продуктов на основе верблюжьего молока, по биконсервантам на основе бактериоцинопродуцирующих лактобацилл и 1 по биовыщелачиванию урана.

По направлению «Энергетика» - 1 грант по разработке технологий получения биодизельного топлива на основе микроводорослей, 1 грант нацелен на получение рекомбинантных микроорганизмов, эффективно экспрессирующих целлюлазы (табл.1).

Таблица 1. Количество «микробных» грантов в рамках приоритетных направлений развития науки на 2012-2014 гг.

Темы грантов	<i>Науки о жизни</i>	<i>Интеллектуальн. потенциал</i>	<i>Глубокая переработка</i>
Биопрепараты:			
Пробиотики	4	-	1
Корм. добавки	1	-	1
Нефтедеструкторы	1	-	-
Биоудобрения	3	1	-
Закваски	1	-	-
Биоинсектициды	-	-	1
Биоконсерванты	-	-	1
Диагнс. препараты	2	1	-
Сохран. и развитие коллекций	-	4	-

Формально по названию тематик грантов можно говорить о классике, в какой-то мере об устоявшихся направлениях научных разработок по биопрепаратам. Но при оценке содержания грантов

однозначно то, что запланированные исследования отличаются от прошлых по таксономическим группам микроорганизмов (родам, видам и штаммам), используемым в качестве объекта научных исследований и разработок. Более важно то, что в научных исследованиях и разработках все шире используются современные, а именно молекулярно-биологические и генетические методы и технологии.

Вместе с тем очень мало грантов по энзимологии микроорганизмов. Определение ферментативной активности, выделение, очистка и стабилизация фермента очень важны при оценке качества штаммов. Как пример можно привести всего лишь один грант - "Разработка научных основ применения микробных липаз для очистки сточных вод предприятий пищевой промышленности и бытовых стоков» (ИМиВ).

Отсутствуют грантовые исследования по мутагенезу и селекции промышленных штаммов, получению штаммов-сверхпродуцентов. В 1970-80 годы штаммы-сверхпродуценты антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов и других биологически активных соединений были получены именно этими методами.

Не менее актуальна проблема разработки генно-модифицированных микроорганизмов, продуцирующих рекомбинантные белки, биологически активные низкомолекулярные пептиды. Особенно остро они востребованы в медицинской практике. Это инсулин, интерлейкины, интерфероны, ростовые факторы и др. Можно привести в качестве примера лишь два гранта, нацеленных на получение рекомбинантных белков, используемых в диагностической практике и в переработке растительного сырья. Соответственно, это гранты «Получение рекомбинантных полимераз, востребованных в научных исследованиях и диагностической практике» (НЦБ) и «Создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов, эффективно экспрессирующие гены целлюлазы для получения биотоплива из целлюлозосодержащего сырья» (КазНУ).

Такова картина грантовых исследований, связанных с использованием в качестве биообъекта микроорганизмов.

Микробиологические ресурсы, это, прежде всего, промышленные микроорганизмы, используемые в разных отраслях производства (в растениеводстве, в производстве и переработке пищевой продукции, в животноводстве в качестве кормовых добавок, в медицине, ветеринарии и защите окружающей среды). Это консорциумы микроорганизмов, используемых в качестве заквасок, пробиотиков, биоудобрений, биоинсектицидов и др. Это микроорганизмы - сверхпродуценты антибиотиков, ферментов, витаминов, аминокислот и других биологически активных соединений. Данная группа микроорганизмов получена именно методами селекции и мутагенеза, особенно интенсивно использовавшихся во второй половине прошедшего столетия. Это генно-модифицированные микроорганизмы, продуцирующие рекомбинантные белки.

Микробиологические ресурсы общепринято связывать с коллекционными культурами промышленных микроорганизмов, находящимися на хранении в чистом виде и жизнеспособном состоянии, с сохранением целевой биологической активности. Культуры хранятся современными технологиями лиофилизации и криоконсервации, а также классическими методами субкультивирования. В коллекциях в плановом порядке проверяется жизнеспособность и аутентичность культур, используя с этой целью микробиологический, достаточно трудоемкий метод посевов и пересевов. Проводится подсчет количества жизнеспособных клеток трудоемким методом серийных разведений, наряду со спектрофотометрическим измерением оптической плотности суточных культур при определенной длине волны и многие другие виды коллекционных работ.

На предмет сохранности культур в коллекциях научных организаций были проанализированы в сравнительном аспекте два Каталога микроорганизмов. Первый был издан в 2003 году и включает перечень микроорганизмов, хранившихся в то время в 7 организациях (ИМиВ, Институт фармбиотехнологии, КазНИИ пищевой промышленности, НИИ плодоводства и виноградарства, КазНИВИ, Алматинский биокомбинат и НИСХИ). Второй Каталог издан в 2010 году и составлен только по коллекции ИМиВ.

Каталог 2003 года состоит из 665 культур, в том числе бактерий – 285, включая 74 культуры актиномицет, мицелиальных грибов – 280 и дрожжей – 76. Среди бактерий, хранящихся в коллекциях доминируют бациллы (*Bacillus thuringiensis* и *B.subtilis*)- 47 культур и лактобациллы (*Lactobacillus* spp.) - 55 культур. Из 665 культур 230 относятся к патогенам растений и животных (коллекции НИСХИ и КазНИВИ), 110 культур насчитывала в то время коллекция ИМиВ.

Каталог коллекции ИМиВ, составленный в 2010 году включает 357 культур, в том числе актиномицет 212 штаммов, бактерий 79, дрожжей 39 и мицелиальных грибов 28.

Сопоставлении коллекционных культур, хранящихся в ИМиВ по Каталогам 2003 и 2010 гг. Показало следующее. Так, присутствующие в Каталоге 2003 года 17 культур актиномицет, выделенных профессором Чормоновой Н.Т. в Каталоге 2010 года отсутствуют. Культуры актиномицет, принадлежащие к родам *Actinomadura*, *Amuocolata* и *Nocardia*, присутствующие в Каталоге 2003 года также отсутствуют в Каталоге 2010 года. Из 8 культур, заложенных на хранение в свое время профессором Никитиной Е.Т. (Катлог 2003 г.) остались только 2 (Каталог 2010 г.). Отрадно, что штамм *Streptomyces griseoruber* (продуцент антрациклиновых антибиотиков, а также стимулятор роста растений), выделенный в свое время М.Х.Шигаевой и К.А.Тулемисовой сохранился по сей день, он есть в списках Каталогов 2003 и 2010 годов.

Но вместе с тем, Каталог изданный в 2010 году показывает, что коллекция ИМВ пополнилась большим количеством стрептомицет, продуцентов витаминов группы В и антибиотика цеколикомицина (авторы Балицкая А.К. и Сартбаева У.А.). Число дрожжевых культур увеличилось с 17 до 39 культур, они в основном представлены сакшаромицетами и кандидами. Мицелиальных грибов в 2003 году было 4 культуры, а в 2010 в ИМиВ их уже 28.

К сожалению, ни в Каталоге 2003 года, ни в Каталоге 2010 года нет сведений о числе коллекционных культур, защищенных патентами.

В музее коллекционных культур Республиканской коллекции микроорганизмов (далее РКМ) в настоящее время 414 культур (табл.2), хранящиеся теми или иными альтернативными способами, часть коллекционных микроорганизмов генотипирована (табл.3).

Таблица 2. Перечень коллекционных культур РКМ

<i>Микроорганизмы</i>	<i>Количество культур</i>
Молочнокислые бактерии	107
Бациллы	81
Актиномицеты	17
Иные таксономические группы бактерий	57
Мицелиальные грибы	79
Дрожжи	40
Микроводоросли	33
Всего	414

Таблица 3. Количество культур, находящихся на хранении в РКМ, в том числе генотипированных

<i>Микроорганизмы</i>	<i>Субкульту- вирование</i>	<i>Лиофили- зация</i>	<i>Криоконсер- вация</i>	<i>Генотипи- рование</i>
Молочнокислые бактерии	63	35	79	41
Бациллы	11	14	66	21
Актиномицеты	7	-	10	-
Иные группы бактерий	30	32	25	15
Мицелиальные грибы	79	11	79	11
Дрожжи	40	-	-	19
Микроводоросли	33	-	33	-
Всего	263	92	332	107

Наряду с количественными характеристиками более важны качественные показатели. В РКМ очень малое число защищенных патентами коллекционных культур, малый процент генотипирования штаммов, недостаточен охват коллекционных культур технологией лиофилизации.

Очень важно наличие сведения о культурах, используемых в биопроизводстве. Эти сведения позволили бы говорить о конечных результатах работы по селекции промышленных микроорганизмов, в том числе по коллекционной работе.

В 1970 - 80-е годы в г.Степногорске была развитая биотехнологическая промышленность союзного значения. В промышленной зоне города было налажено крупнотоннажное микробиологическое производство кормовой аминокислоты – лизина, антибиотиков для животноводства – менонзина и тилозина, средств защиты растений – бактоларвицида, лепидоцида и

других биопрепаратов. С распадом Союза крупнотоннажное микробиологическое производство в г.Степногорске прекратило свое существование. Примерно такая же участь постигла и второе по масштабам микробиологическое производство Казахстана того времени - Алматинский биокомбинат.

В настоящее время имеет место малое биопроизводство, на уровне опытно-промышленных объемов. Это выпуск биоудобрений, заквасок, пробиотиков и других биопрепаратов, выпускаемых малыми партиями. Промышленная микробиология, биотех-нология микроорганизмов пока остается на обочине индустриально-инновационного развития государства.

Охраноспособность коллекционных культур и их реальное использование в биопроизводстве актуальны с позиции их нематериальной, интеллектуальной ценности.

Коллекционные штаммы микроорганизмов, продуцирующие те или иные биологические активные вещества являются результатом многолетней работы как отдельных ученых, так и целых коллективов. Многие годы с затратой бюджетных средств чистые культуры этих микроорганизмов хранятся в жизнеспособном состоянии, проводятся работы по поддержанию их изначальной биологической активности. Само собой разумеется, можно оценить материальные затраты на поддержание коллекционных культур, но более важно учесть нематериальные активы, вложенный в них интеллектуальный труд ученых.

Есть Постановление Правительства Республики Казахстан от 2002 года по оценке интеллектуальной собственности. В отношении микроорганизмов – это патентование штамма и оценка стоимости патента через лицензированных оценщиков интеллектуальной собственности, т.е. оценка через охранный документ – патент. Путем оценки патентов можно пополнить уставной капитал предприятия, амортизировать их в качестве нематериальных активов.

Но подавляющее большинство коллекционных культур не имеет патентной поддержки, можно ли на этой основе говорить об отсутствии интеллектуальной компоненты, об отсутствии нематериальных активов в коллекциях промышленных микроорганизмов. Наверное нельзя.

Сейчас функционируют инновационные патенты, требующие от патентуемого штамма только локальную новизну и полезные свойства. Можно ли путем получения инновационных патентов увеличить число защищенных охранными документами коллекционных культур. Насколько прочную правовую основу дадут инновационные патенты при оценке нематериальных активов, интеллектуальной ценности коллекций культур промышленных микроорганизмов.

О тест-культурах и референс-штаммах. Это достаточно специфическое направление работы коллекций микроорганизмов. Тест-микрорганизмы, необходимы для микробиологического контроля лекарственных средств, для оценки чувствительности к антибиотикам, определения антагонизма, мутагенности, других контрольно- аналитических работ, а также для научных исследований и для образовательного процесса. К примеру, для микробиологического контроля лекарственных средств можно использовать только культуры из коллекции АТСС, а при оценке антагонизма, антибиотикочувствительности достаточны референс-штаммы. Вместе с тем, недостаточно целенаправлены работы по формированию коллекций тест-культур, необходимых для обеспечения ими потребностей научных организаций и производств, нет развития их сервисной востребованности.

Өндірістік микроорганизмдер коллекцияларының таксономиялары, саны, сақтау технологиялары мен генотиптелуі туралы мәліметтер келтірілген. Өндірістік штамдардың интеллектуалды потенциалын бағалау, тест-дақылдар коллекциясын дамытудың ақ маңызы қарастырылған.

The article provides information about the collections of industrial microorganisms on the taxonomy, population, technology of storage and genotyping of cultures. Evaluation questions of the intellectual potential of industrial strains and collections of test cultures are equally relevant.

МИКРОБИОЛОГИЯ

Г.Ж. Абдиева, А.М. Имадиева, Г.Қ. Қайырманова, А.А. Жұбанова, Н.Ш. Акимбеков
АҒЫН СУДАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН ДЕСТРУКТИВТІ БЕЛСЕНДІ ГЕТЕРОТРОФТЫ
МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ ЖӘНЕ ИММОБИЛИЗДЕУ
(Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, e-mail: aia_beautiful_soul@mail.ru)

Экологиялық биотехнологияның маңызды мәселелерінің бірі судың қорын сақтау, су қоймаларының әртүрлі ластағыштармен ластануының алдын алу және ағынды суларды тазарту болып табылады. Қазақстанның барлық территориясында қазіргі таңда көптеген тұрғылықты жерлермен