

245.4 тыс/г), *Mucor* – в 18.2 раза (с 1.1 до 20 тыс/г). Численность грибов хранения при самосогревании зерна других культур (ячменя, ржи, подсолнечника) увеличилась в 6.4-43.6 раза.

Численность полевых грибов в процессе самосогревания (плесневения) практически осталась на том же уровне или несколько уменьшилась. Процессы самосогревания, плесневения и порчи сопровождаются проникновением грибов хранения внутрь зерновки и вытеснением полевых грибов. Это ярко выражено в соотношении субэпидермальной микофлоры зерна пшеницы нормального и пониженного качества. Если в субэпидермальной микофлоре пшеницы нормального качества доминировали полевые грибы ($m_{отн}=74.2\%$), то в зерне пшеницы пониженного качества на их долю приходилось 32.0%. И наоборот, доля грибов хранения в пшенице пониженного качества составила 67.2%, а в нормальном 25.8%. При этом в 4.2 раза увеличилась суммарная доля грибов *A.flavus* и *A.candidus*, являющихся индикаторными в процессах самосогревания, и в 2.7 раза - доля грибов рода *Penicillium sp.*

Аналогичная закономерность установлена по зерну других культур. Доля полевых грибов в нормальном зерне составила 7.5-68.2%, пониженного качества – 4.2-35.7%, грибов хранения соответственно 31.8-91.6% и 73.2-95.3%, в т.ч. *A.flavus* – 3.7-20.3% и 9.2-33.9%, *A.candidus* – 0.4-1.9% и 2.9-9.2%, *Penicillium* – 3.9-16.0% и 14.0-27.7%.

Обобщенные статистические характеристики по общей численности грибов хранения, а также по отдельным видам показали, что зерно пониженного качества достоверно отличается от нормального за счет развития и преобладания видов потенциально токсигенных грибов.

Разработаны средние численные значения микроскопических грибов в зерне нормального качества, которые могут быть положены в основу нормирования этого показателя.

1. Мишустин Е.Н., Трисвятский Л.А. Микробы и зерно. - М.: Агропромиздат. - 1963. - 292 с.

2. Трисвятский Л.А. Хранение зерна. - 5-е изд. перераб. и доп.- М.: Агропромиздат.- 1986.- 351 с.

3. Тутельян В.А. Микотоксины. Исторические аспекты и современные представления // Оценка загрязнения пищевых продуктов микотоксинами: Сб. учеб.-метод. материалов / Под ред. Тутельяна В.А. - М.: Центр международных проектов ГКНТ. - 1985. - Т. I. - С. 83-103.

4. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 608 с.

Қазақстанның нормалы және сапасы төмендетілген негізгі астық тұқымдас дәнді-дақылдар: бидай, жүгері, арпа, күріш, күнбағыс, қарабидай, сұлы және тарыға жүргізілген көп жылдық микологиялық барлауының нәтижелері келтірілген.

Results are presented of long-term mycologic monitoring of normal and lowered quality of grain the basic cultures of Kazakhstan: wheat, corn, barley, rice, sunflower, a rye, oats and millet.

Е.Г. Пономарева, А.В. Шелудько, В.Е. Никитина
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕКТИНОВ БАКТЕРИЙ РОДА
AZOSPIRILLUM

(Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов)

В представляемой работе дана характеристика лектинов, выделенных с поверхности азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*, принимающих участие в растительно-бактериальном симбиозе. Лектины штаммов *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245 являются гликопротеинами, обладают разной углеводной специфичностью, отличаются не только физико-химическими свойствами, но и функциональной активностью.

В настоящее время изучение растительно-бактериальных симбиозов, как ассоциативных, так и эндофитных, привлекает все большее внимание исследователей. Показано, что бактерии рода *Azospirillum* являясь участниками симбиоза оказывают позитивное воздействие на рост и развитие растения-хозяина. Азоспириллы не только играют важную роль в азотфиксации, но способны продуцировать биологически активные вещества, такие как цитокинины, гиббереллины, ауксины и лектины [1,2]. Бактерии штамма *A. brasilense* Sp7 принадлежат к группе ассоциативных бактерий, способных образовывать ассоциации с корнями злаковых растений, колонизируя их поверхность.

Представителем азоспирил и единственным штаммом, принадлежность которого к эндофитам доказана, является *A. brasilense* Sp245, который был выделен из поверхностно стерилизованных корней пшеницы бразильских культиваров. Как показали исследования, проведенные с использованием олигонуклеотидных зондов и сканирующей конфокальной лазерной микроскопии, бактерии этого штамма способны к исключительно тесному взаимодействию с растением-хозяином: они заполняют корневые волоски пшеницы и колонизирует проводящую систему корня.

В более ранних исследованиях, проводимых в нашей лаборатории, с поверхности азоспирилл, принадлежащих к видам *brasilense* и *lipoferum*, были выделены лектины, представляющие собой

гликопротеины, имеющие штаммовые различия по специфичности к углеводам. С поверхности бактерий штамма *A. brasilense* Sp7 был выделен лектин имеющий специфичность к L-фукозе и обладающий рядом биологически активных свойств. Цель работы дать сравнительную характеристику гемагглютининов штамма *A. brasilense* Sp245 и лектина *A. brasilense* Sp7 выделенных с поверхности изучаемых бактерий

Объектом исследования явились штаммы рода *Azospirillum*: *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sp245. полученные из института микробиологии РАН (Москва), а также мутанты Sp245 с изменениями в структуре липополисахарида (ЛПС, Lps) и продукции полисахаридов связывающих калькофлуор (Cal): LpsI⁻ Cal⁻ KM252, LpsI⁻ KM348, LpsII⁻ KM139 и Lps⁻ LpsII⁻ Cal⁻ Sp245.5. Клетки азоспирилл выращивали на малатно-солевой среде (MSD) при 37°C и на синтетической среде с добавлением источника органического азота [3.]. Выделение лектинов с поверхности клеток проводили по методу Эшдата с сотр. [4.]. Далее белки очищали методом гель-фильтрации на колонке с использованием носителя Sephadex G-75. Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord S11 (LKB) при 278 нм [5.]. Агглютинирующую активность клеток и агглютининов определяли реакцией гемагглютинации, используя 2%-ную суспензию трипсинизированных или нативных эритроцитов кролика.

Определяющим свойством лектинов является проявление гемагглютинирующей активности по отношению к эритроцитам крови, в данном случае к эритроцитам кролика. Во многом активность зависит от состава среды выращивания, в частности от источника азота. Бактериальные культуры *A. brasilense* Sp245 ($A_{590}=0.5$), выросшие в стационарных условиях на среде с 1 г/л хлорида аммония, суспензии клеток этих культур в PBS ($A_{590}=0.5$) и культуральная жидкость вызывали агглютинацию трипсинизированных эритроцитов. Во всех случаях титр реакции агглютинации составил 1:4. Одинаковый титр гемагглютинации может быть обусловлен различной степенью связывания гемагглютининов с поверхностью бактериальной клетки и особенностями комплексов, образуемых гемагглютинином с другими молекулами, напрямую не участвующими в реакции, но влияющими на активность агглютининов.

Обработанные в течение 8 ч трипсином клетки штамма *A. brasilense* Sp245 ($A_{590}=0.5$) утрачивали способность агглютинировать трипсинизированные эритроциты. При сравнении гемагглютинирующей активности с некоторыми мутантными штаммами *A. brasilense* Sp245 было показано, что на проявление агглютинирующей активности бактерий в отношении нативных эритроцитов, несущих белковые рецепторы, чувствительные к трипсину, влияют мутации в синтезе полисахаридов изучаемого штамма. Так, в суспензиях клеток (в PBS, $A_{590}=1.0$) Cal⁻ LpsI⁻ мутанта KM252 и LpsI⁻ мутанта KM348 титр реакции агглютинации составил, как и у родительского штамма *A. brasilense* Sp245, 1:16. У мутантов LpsII⁻ *A. brasilense* KM139 и Cal⁻ LpsI⁻ LpsII⁻ *A. brasilense* Sp245.5 титр реакции гемагглютинации, соответственно, составил 1:4 и 1:32. Таким образом, утрата только LpsI⁻ не влияет на гемагглютинирующую активность бактерий; у бактерий, утративших LpsII⁻, гемагглютинирующая активность ниже, чем у *A. brasilense* Sp245; а кардинальные перестройки в структуре ЛПС приводят к повышению гемагглютинирующей активности. Дефекты в синтезе полисахаридов, связывающих калькофлуор, не сказываются на агглютинирующей активности клеток при сохранении синтеза LpsII. Не исключено, что у мутантов различия в гемагглютинирующей активности обусловлены не только разной структурой полисахаридов, но и разным влиянием последних на активность гемагглютининов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у *A. brasilense* Sp245 гемагглютинины локализованы и на поверхности клетки, и выделяются в окружающую среду, а на гемагглютинирующую активность клеток влияют структуры белковой и полисахаридной природы.

Способность культур штамма *A. brasilense* Sp245 вызывать агглютинацию эритроцитов изменяется в зависимости от источника связанного азота в среде выращивания бактерий также как и у бактерий штамма *A. brasilense* Sp7. Титр агглютинации трипсинизированных эритроцитов жидкими культурами *A. brasilense* Sp245 ($A_{590}=0.5$), выросшими в стационарных условиях на среде с 1 г/л нитрита или нитрата калия, составил 1:16, а в случае 1 г/л хлорида аммония – 1:4. Изменение содержания хлорида аммония в среде выращивания (1, 3 или 0.05 г/л) не влияло на агглютинирующие свойства культур *A. brasilense* Sp245. Ранее сообщалось [6.], что исключение аммония из состава среды выращивания в случае штамма *A. brasilense* Sp245 приводит к снижению гемагглютинирующей активности бактерий.

Дальнейшие исследования показали, что лектиновая активность штамма *A. brasilense* Sp245 зависела и от других факторов. При выращивании бактерий на богатой жидкой среде, содержащей дрожжевой экстракт, без аэрации клетки теряли агглютинирующие свойства, но в условиях аэрации

агглютинирующая активность сохранялась. Кратковременное воздействие температур -12° , -18° и $+43^{\circ}$ не оказывало влияния на агглютинирующую активность бактерий. При выращивании бактерий в жидкой культуре наблюдалось образование клеточных агрегатов. Агрегация бактерий штамма *A. brasilense* Sp 245 составляла 14%.

Напротив, у штамма *A. brasilense* Sp7 способностью к гемагглютинации обладали только клетки, выросшие на средах с низким содержанием минерального азота (например, 0.05 г/л KNO_3). Агглютинин выделенный с поверхности бактерий этого штамма по своей природе является гликопротеином с молекулярной массой 36 кДа и обладает специфичностью к L-фукозе и D-галактозе. Отсутствие аэрация являлось лимитирующим фактором гемагглютинации и для бактерий штамма *A. brasilense* Sp7. Воздействие неблагоприятных условий, в том числе пониженных или повышенных температуры увеличивало гемагглютинирующую активность бактерий *A. brasilense* Sp7. Агрегация клеток на среде MSM составляла 38 %. Показано, что на обогащенных азотом средах бактерии *A. brasilense* Sp7 также синтезировали агглютинин, но с заблокированной гемагглютинирующей активностью [5]. Можно предположить, что у штаммов *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* Sp7 различаются механизмы регуляции синтеза или активности агглютининов

Дальнейшие исследования позволили выделить с поверхности клеток штамма *A. brasilense* Sp245 препарат гемагглютинаина, который после очистки гель-фильтрацией был гомогенным и представлял собой полимер с молекулярной массой около 67 кДа. При окраске электрофореграмм нитратом серебра методом, включающим стадию окисления моносахаридных остатков [7], отмечалось окрашивание в зоне локализации гемагглютинаина, что свидетельствует о его гликопротеиновой природе, свойственной лектинам азоспирилл [5].

Специфичность агглютинаина *A. brasilense* Sp245 определяли по ингибированию углеводами реакции гемагглютинации. Ни один из 35 использованных моно- и дисахаридов и аминокислот не ингибировал гемагглютинирующую активность данного белка. Однако выделенные с поверхности штамма *A. brasilense* Sp245 ЛПБК (липополисахарид белковый комплекс) и ЛПС (липополисахарид) в концентрации 50.5 мкг/мл подавляли активность гемагглютинаина (в концентрации 1.0 мкг/мл) в отношении трипсинизированных эритроцитов. Из обнаруженных у *A. brasilense* Sp245 двух О-ПС (О-специфический полисахарид) [8, 9] только кислый О-ПС1 в концентрации 25 мкг/мл способен ингибировать активность (1.0 мкг/мл). Следует отметить, что ЛПБК, ЛПС, О-ПС1 и О-ПС2 в диапазоне концентраций 500–25 мкг/мл не вызывают агглютинацию трипсинизированных эритроцитов. Только ПСЛК (полисахаридлиипдный комплекс) в концентрации 500 мкг/мл агглютинирует трипсинизированные эритроциты. При снижении его концентрации до 250–25 мкг/мл агглютинации эритроцитов не происходит. Однако в концентрациях 250–25 мкг/мл ПСЛК не блокирует активность гемагглютинаина (1.0 мкг/мл).

Таким образом, выделенный с поверхности клеток штамма *A. brasilense* Sp245 гемагглютинин представляет собой лектин со родством к О-ПС1 (кислому D-рамнану) и к содержащим О-ПС1 ЛПБК и ЛПС.

Способность к движению является одной из важных функций выживания бактерий в стрессорных условиях. Показано, что лектин штамма *A. brasilense* Sp7 не оказывает влияния на подвижность клеток штамма. Действие же агглютинаина *A. brasilense* Sp245 вызывает заметное уменьшение скорости плавания клеток, с поверхности которых он выделен, а предварительная инкубация агглютинаина с ЛПС и последующее воздействие его на клетки не вызывают снижения их скорости движения. Инкубация агглютинаина с ПСЛК *A. brasilense* Sp245 не приводит к снижению ингибирующего действия лектина на подвижность клеток.

Таким образом, лектины изучаемых штаммов, несмотря на принадлежность к одному роду и виду отличаются не только физико-химическими свойствами, но и влиянием на функциональную активность бактерий, что в свою очередь определяет их участие в растительно-бактериальных симбиозах.

1. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev.- 2000.- V. 24.- P. 487-506.

2. Barbieri P., Galli E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production // Res. Microbiol.-1993.- V. 144.- P. 69-75.

3. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press.- 1976.- P. 518–538.

4. Eshdat Y., Ofek I., Yashouw-Gan Y., Sharon N., Mirelman D. Isolation of a mannose-specific lectin from *E. coli* and its role in adherence of the bacteria to epithelial cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.- 1978.- V. 85.- P.1551-1559.

5. Никитина В.Е., Аленькина С.А., Итальянская Ю.В., Пономарева Е.Г. Очистка и сравнение лектинов с клеточной поверхности активных и неактивных по гемагглютинации клеток азоспирилл // Биохимия.- 1994.- Т. 59.-Вып. 5.- С.656-662.
6. Антонюк Л.П. Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями /Ред. В.В.Игнатов М.:-Наука.- 2005.- С.118-159.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second edn. NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.-1989.- V. 1-3.
8. Katzy E.I., Matora L.Yu., Serebrennikova O.B., Scheludko A.V. Involvement of a 120-MDa plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp245 in the production of lipopolysaccharides // Plasmid.-1998.-V. 40.-№ 1.-P. 73-83.
- 9 Федоненко Ю. П., Здоровенко Э.Л., Коннова С.А., Игнатов В.В., Шляхтин Г.В. Сравнительная характеристика липополисахаридов и О-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp 245 и его омегон –Км мутантов КМ018 и КМ252 // Микробиология.- 2004. –Т.73.-№ 2.-С.180-187.

УДК 637.1/3

Л.Т. Райымбекова, Т.В. Кузнецова, Е.А. Олейникова
“ҚАЙСАР СҮТ” ЖӘНЕ “АҚБҰЛАҚ” МАЛ КЕШЕНДЕРІ СҮТІНІҢ
ҚАУІПСІЗДІГІ МЕН МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШІ ЖӘНЕ СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ
БАКТЕРИЯЛАРЫН БӨЛІП АЛУ”

(РМК «Микробиология және вирусология институты»)

Еліміздің нарықтық экономикаға өтуіне байланысты, ауылдық жерлерде көптеген фермерлік жеке қожалықтар, акционерлік қоғамдар және сүт өнімдерін өңдейтін құрылымдар пайда болып, дүниежүзі елдері мен мемлекеттері арасында, соның ішінде республикамызда да, шаруашылықтық, экономикалық және басқа да байланыстар кеңейіп өріс алууда.

Экологиялық таза өнімдерді өндіруге керекті шикізаттар, соның ішінде әсіресе ауылшаруашылық шикізаттардың сапасы барлық талаптарға сай болуы қажет. Республиканың әртүрлі аймақтарында өндірілетін сүт тағамдарының микробиологиялық құрамын зерттеу, сүттің кенеттен ашуына жауапты микроорганизмдердің басымдылық көрсететін топтарын анықтау, сияқты жұмыстарды ұтымды жүргізу керек [1].

Жұмыстың барысында Алматы облысы, Қарасай ауданындағы “Қайсар сүт” және “Ақбұлақ” мал шаруашылығы кешендерінің сүт өнімдерінің микробиологиялық көрсеткіштері және қауіпсіздігі зерттелді, сонымен қатар белсенді сүт қышқылды бактериялары мен дрожжылары іріктелініп алынды. Ал, сүт қышқылды бактерияларының және дрожжыларының жаңа штаммдары мынандай объектілерден бөлініп алынды:

- Сиыр сүтінен;
- Сүт өнімі- айраннан;

Микроорганизмдердің жалпы саны микробиологияда кеңінен қолданылып жүрген тәсілдермен есептелді [1, 2]. Сүтте мырыш, жез, мышьяк рұқсат етілген шектік мөлшеріне сай. Сүттің барлық үлгілерінде сынап кездеспейді. Кадмийдің сүттегі мөлшері жартусыз. Сонымен Алматы облысындағы «Қайсар сүт» және «Ақбұлақ» шаруашылығының сүттері экологиялық жағынан алғанда стандартқа сай болатыны анықталды.

Органолептикалық сипатына қарағанда сүттердің бөтен иісі және дәмі болмады, ал пестицидтер, микотоксиндер, афлатоксиндер және антибиотиктер сүтте табылмады, микробиологиялық көрсеткіштері рұқсат етілген шегінен артық емес (кесте 1).

«Қайсар сүт» және «Ақбұлақ» мал кешендерінің сүтін тексергенде патоген микроорганизмдер кездеспейтіні анықталды. Сүтте анаэробты және факультативті – анаэробты микроорганизмдердің жалпы саны рұқсат етіліп, шектелген концентрациядан артпады.

1-кесте. «Қайсар» және «Ақбұлақ» мал кешендерінің сиыр сүтінің қауіпсіздік көрсеткіштері.

№	Көрсеткіштер	СанПиН бойынша, рұқсат етілген мөлшері	Шаруашылықтың сүт үлгілері	
			«Қайсар»	«Ақбұлақ»
1	Органолептикалық:	Сүтке тән, бөгде иіссіз және дәмсіз	Сүтке тән, бөгде иіссіз және дәмсіз	Сүтке тән, бөгде иіссіз және дәмсіз
2	Токсинді элементтер, мг/кг:			
	-қорғасын	0,1	0,075	0,07
	-мышьяк	0,05	0,02	0,02
	-кадмий	0,03	0,01	0,01
	-сынап	0,005	0	0