

3. Калашникова Е.А., Миронова О.Ю., Лаврова Н.В., Кочиева Е.З., Чередниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Калашников Д.В., Пронина Н.Б. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 2004. (Издание 2-е)

4. Киракосян Р.Н., Калашникова Е.А. Получение растений-регенерантов из репродуктивных органов растений капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2015. № 1. С. 18-25.

5. Коваленко, Н. А. Исследование компонентного состава эфирного масла *Ocimum basilicum* L. из растительного сырья Республики Беларусь. – Минск: Учреждение образования "Белорусский государственный технологический университет". 2011. С.194-196.

6. Козьмин Г. В., Зейналов А. А., Коржавый А. П., Тихонов В. Н., Цыгвинцев П. Н.. Применение ионизирующих и неионизирующих излучений в агробиотехнологиях. Обнинск: ВНИИСХРАЭ, 2013. 191 с.

7. Рябцев, А. Н. Ультрафиолетовое излучение. М.: Большая Российская энциклопедия, 1998. С. 221. 760 с.

УДК 606

ИЗУЧЕНИЕ СТЕПЕНИ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНА ЭТИЛМЕТАНСУЛЬФОНАТА ДЛЯ *BACILLUS SUBTILIS*

Кочнева Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник, лаборатория геномных исследований в растениеводстве, Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, dar.kochneva@gmail.com

Дорогов Глеб Олегович, аспирант кафедры экологии и генетики ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», dorogov.gleb@yandex.ru

Научный руководитель: Пак Ирина Владимировна, профессор кафедры экологии и генетики ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», pakiv57@mail.ru

Аннотация: *Этилметансульфонат (ЭМС) является перспективным мутагеном для работы с *Bacillus subtilis*. Были выявлены его минимальные показатели при концентрации 0,1%: количество выживших бактерий - 73%, а количество колоний – 61%. А максимальные показатели при концентрации 0,01%: количество выживших бактерий – 86% и количество колоний – 83%.*

Ключевые слова: **Bacillus subtilis*, этилметансульфонат, химическая мутация, биотехнология, экзоферменты*

**Bacillus subtilis* - это грамположительная бактерия рода *Bacillus*. *B. subtilis* активно используют для создания биопрепаратов так как он безвреден и*

экологически безопасен, способен повышать неспецифическую резистентность организма-хозяина, обладает высокой ферментативной активностью [1].

Бактерии рода *Bacillus* часто используют в различных сферах деятельности начиная от пищевой промышленности и вплоть до биотехнологий [2]. Особый интерес у исследователей вызывает их способность к спорообразованию. Эндоспоры способны сохранить жизнедеятельность бактерий при различных температурах, радиации, повышенном или пониженном давлении, при изменении оптимального рН, а также при воздействии некоторых химических веществ [3].

На основе штаммов *Bacillus subtilis* создаются различные препараты, которые можно использовать в различных отраслях: биопрепараты против фитопатогенных грибов и бактерий для лечения злаковых культур, кормовая добавка для восполнения ферментов в организме животных на фермах и т.д. [4], [5].

Для микроорганизмов наиболее распространенным методом создания новых штаммов является химический мутагенез.

Цель исследований: Оценка токсического воздействия мутагена ЭМС на *Bacillus subtilis*.

В качестве объекта исследования был взят промышленный штамм *Bacillus subtilis* САВ1, предоставленный ОАО «НИИ ПРОБИОТИКОВ» (г. Москва). Мутаген – этилметансульфонат (ЭМС). ЭМС химический супермутаген, который способен вызывать мутации при низких концентрациях. В большинстве случаев при воздействии данного мутагена происходит алкилирование пуриновых оснований (гуанина), который обретает способность спариваться с тиминам, что приводит к транзиции [6].

Культивирование *B. subtilis* с мутагеном ЭМС в жидкой питательной среде LB без агарозы (1% триптон, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, дистиллированная вода) происходило в течение 14-16 ч. при температуре 37°C в шейкере-инкубаторе «New Brunswick Innova 43 Incubator Shaker» на 110 оборотах. Мутаген вносили в жидкую питательную среду в концентрациях 0,1%, 0,01%, 0,001% и 0,0001%. После культивирования клеток бактерий измеряли на спектрофотометре «Eppendorf BioSpectrometer® basic» оптическую плотность жидких питательной сред с бактериями при 600 нм.

Подсчет количества клеток на основе оптической плотности проводился по следующей формуле (1):

$$\text{Количество клеток (кл/мл)} = OD\ 600 \times 5 \times 10^8, \quad (1)$$

где OD600 – показатель оптической плотности при длине волны 600 нм.

Количество колоний подсчитывалось после посева методом Дригальского разведенной в 0,1% жидкой питательной среды на твердую питательную среду LBc агарозой (1% триптон, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, 2,5% агарозы, дистиллированная вода). Культивирование происходило в термостате «Binder BD 115» на 24 часа при температуре 37°C. Подсчет колоний производился на счетчике колоний «Scan® 100 interscience»

Для оценки степени токсичности ЭМС в исследуемых образцах был подсчитан критерий «выживаемость», формула (2):

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{ЧислоКОЕ/чашка в опыте}}{\text{ЧислоКОЕ/чашка в контроле}} \times 100, \quad (2)$$

где ЧислоКОЕ – количество колониеобразующих единиц.

Достоверность полученных результатов проверялась с помощью метода определения t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными принято было считать варианты опыта, которые отличаются от контроля при $p \leq 0,05$. Подсчет статических данных производится с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты. В жидкой питательной среде были подсчитаны данные о количестве выживших клеток *B. subtilis* после обработки мутагеном ЭМС (таблица 1). По результатам исследований количество выживших клеток *B. subtilis* после обработки мутагеном составила от 11,700 до 13,803 на 10^8 кл/мл. Максимальное содержание клеток было отмечено при концентрации ЭМС 0,01%, а минимальное содержание при концентрации 0,1%. Были выявлены достоверные различия между контролем и вариантами с мутагеном. Коэффициент корреляции составил $R = -0,45$.

Такие различия между контролем и вариантами опыта с ЭМС можно объяснить тем, что мутаген подавляет рост культуры *B. subtilis*. С увеличением концентрации мутагена, количество выживших клеток снижается. В ходе исследований нами была установлена определенная аномалия, которая подтверждалась при повторении опыта. При концентрации ЭМС 0,01 % отмечалось увеличение выживших клеток *B. subtilis*. Данный факт, мы объясняем резким снижением проницаемости мутагена через клеточную мембрану.

Таблица 1

Количество выживших клеток *Bacillus subtilis* после обработки ЭМС

Вариант	Количество клеток на 10^8 кл/мл	CV, %	Отклонение относительно контроля, %
Контроль	16,097 ± 0,205	2,21	100
0,1%	11,700 ± 0,208*	3,08	73
0,01%	13,803 ± 0,307*	3,86	86
0,001%	12,027 ± 0,213*	3,07	75
0,0001%	12,287 ± 0,348*	4,90	76

Примечание: * - статистически достоверные различия с контролем ($p \leq 0,05$)

На твердой питательной среде было подсчитано количество полученных колоний *B. subtilis* (таблица 2). Количество колоний на твердых питательных средах в вариантах с мутагеном составило в среднем от 461,67 до 631,33 шт. Максимальное количество колоний прослеживалось в варианте с концентрацией ЭМС 0,01%, а минимальное количество при концентрации ЭМС 0,1%. Между контролем и вариантами с мутагеном были выявлены достоверные различия. Также был подсчитан коэффициент корреляции, который составил $R = -0,60$.

Различия между контролем и вариантами опыта обусловлены способностью мутагена подавлять рост *B. subtilis*. С увеличением концентрации ЭМС происходит снижение количества колоний *B. subtilis* в чашках Петри. Исключение составляет концентрация мутагена 0,01%.

Таблица 2

Количество колоний *Bacillus subtilis* после обработки ЭМС

Вариант	Среднее количество колоний, шт	CV, %	Отклонение относительно контроля, %
Контроль	760,67 ± 36,77	8,37	100
0,1%	461,67 ± 26,52*	9,95	61
0,01%	631,33 ± 28,01*	7,69	83
0,001%	519,00 ± 32,19*	10,74	68
0,0001%	552,67 ± 22,49*	8,93	73

Примечание: * - статистически достоверные различия с контролем ($p \leq 0,05$)

Была проведена оценка жизнеспособности клеток *B. subtilis* по числу колониобразующих единиц (КОЕ) (рисунок).

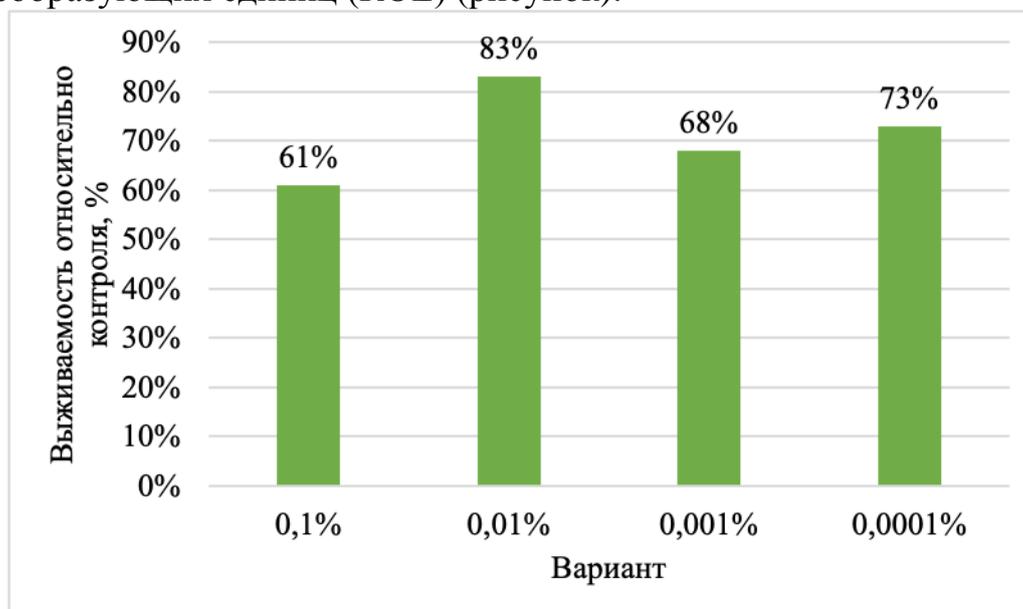


Рисунок. Критерий «выживаемости» *Bacillus subtilis* после обработки ЭМС

Процент выживаемости клеток бактерии составил от 61% до 83%. Больше всего выжило бактерий при концентрации ЭМС 0,01%, а меньше всего при концентрации ЭМС 0,1%.

По выживаемости *B. subtilis* наблюдается также снижение показателей с увеличением концентрации мутагена, кроме концентрации ЭМС 0,01%.

1. Повышение концентрации химического мутагена ЭМС приводит к постепенному уменьшению количества выживших бактериальных клеток. Максимальная степень воздействия проявляется при концентрации 0,1 %, где выживаемость бацилл составляет 61%. Коэффициент корреляции составляет - 0,45.

2. Химический мутаген ЭМС влияет на способность к образованию колоний *B. subtilis*. С увеличением концентрации мутагена количество колоний уменьшается, так при концентрации 0,1% наблюдается минимальный показатель. Коэффициент корреляции составляет -0,60.

3. Мутаген в изученных концентрациях способен снижать количество клеток на 14-27% относительно контроля.

Библиографический список

1. Филиппев М. М. Современные биологические активные добавки в животноводстве // Сельскохозяйственный журнал. 2016. Т.1. С. 334-337

2. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* /Федорова О.В., Назмиева А.И., Нуретдинова Э.И., Валеева Р.Т. //Вестник Казанского технологического университета. 2016. №19(15). С. 170-174

3. Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики / Хадиева Г. Ф., Лутфуллин М. Т., Мочалова Н. К. [и др.] // Микробиология. 2018. Т. 87, № 4. С. 356-365

4. Монастырский О. А., Кузнецова Е. В., Алябьева Н. Н. Штаммы *Bacillus subtilis*, ингибирующие развитие токсиногенных грибов на зерне пшеницы //Защита и карантин растений.2014. №9.С.14-16

5. Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве / Феоктистова Н. В., Марданова А. М., Лутфуллин М. Т., [и др.]//Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки. 2018. Т. 160, Кн. 3. С. 395-418

6. Повхан А. В., Сорока А. И. Изучение действия этилметансульфоната на кунжут в поколении М₁ // Научно-технический бюллетень Института масличных культур НААН. 2013. Т. 19, №19. С. 26-30.

УДК 577.346

РАДИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE

Кузьмин Денис Дмитриевич, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, kuzmin.rabochiy@yandex.ru

Научный руководитель: **Чередниченко Михаил Юрьевич**, к.б.н., доцент, и.о. зав. кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, cherednichenko@rgau-msha.ru

Аннотация: Проанализированы основные радиозащитные свойства представителей семейства *Lamiaceae*. Определено, что мята перечная *Mentha × piperita*, шпорццветник ароматный *Plectranthus amboinicus*, клеродендрон несчастливый *Clerodendrum infortunatum*, душица обыкновенная *Origanum vulgare* способны удалять свободные радикалы. Экстракт душицы снижает количество микроядер лимфоцитов человека.