



DOI: 10.26898/0370-8799-2017-5-8

УДК 579.6

**ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОТЫ ЗЕРНА,
УСТОЙЧИВЫХ К СОЛЯМ МЕДИ, ЦИНКА, МАРГАНЦА И ЙОДА***

Н.А. ДОНЧЕНКО¹, доктор ветеринарных наук, руководитель,
В.Н. АФОНЮШКИН^{1,2}, кандидат биологических наук, заведующий сектором,
И.В. НИКОЛАЕВА³, кандидат химических наук, старший научный сотрудник,
Е.А. ХРАПОВ², младший научный сотрудник,
О.В. МИШУКОВА², младший научный сотрудник,
И.Н. ТРОМЕНШЛЕГЕР², инженер,
М.Л. ФИЛИПЕНКО², кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,
Н.В. ДАВЫДОВА¹, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
¹Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦ РАН
630501, Россия, Новосибирская область, пос. Краснообск
e-mail: lisocim@mail.ru
²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Россия, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8,
e-mail: mfilipenko@gmail.com
³Институт геологии и минералогии им В.С. Соболева СО РАН
630090, Россия, Новосибирск, пр. Ак. Коптюга 3
e-mail: inikol@igm.nsc.ru

Изучен видовой состав представителей микробиоты зерна в качестве потенциальных продуцентов органических соединений микроэлементов для современных биотехнологий. Из микробиоценозов зерна 20 проб пшеницы (*Triticum vulgare*) выделены и описаны штаммы гетеротрофных микроорганизмов, устойчивых к токсическим концентрациям солей меди, цинка, марганца и йода. Содержание солей цинка, марганца и меди в суспензии отмытых бактериальных клеток определено высокочувствительным методом многоэлементного анализа масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. С использованием сред, содержащих марганец, выделены и идентифицированы *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens*. В питательной среде, содержащей 1 % К₂Ж, выделены *Vagococcus* sp., *Paenibacillus dendritiformis* и три неидентифицированных штамма. На питательной среде, содержащей сернокислую медь, выращен один штамм неизвестного вида. В присутствии сульфата цинка (1 %) выращены *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, что позволяет использовать их для разработки селективных сред. Обнаружены бактерии рода *Bacillus*, характеризующиеся способностью аккумулировать соединения меди до концентрации 22,3 мг/г сухой биомассы. Фрагмент гена 16 S рибосомальной РНК данной культуры характеризуется наибольшей, но неполной (98 %) гомологией с *Bacillus* sp. LY (Genbank AY787805). В настоящее время в изученной литературе отсутствуют данные о видовой принадлежности этого штамма *Bacillus*, что позволяет отнести его и выделенный штамм Cu 2 к новому виду, ранее не описанному в научной литературе.

Ключевые слова: органические соединения, медь, цинк, марганец, йод, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*.

*Работа поддержана базовым проектом Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017–2020 гг. (VI.55.1.1, 0309–2016– 0002) «Биология бактериально-вирусных сообществ».

Органические соединения микроэлементов (биоплексы) – это органические молекулы (белки, полисахариды, аминокислоты), содержащие в своем составе микроэлементы. Биоплексирование микроэлементов преследует следующие цели: снижение токсичности микроэлементов для животных и человека; защиту витаминов, входящих в состав продуктов питания, кормов, витаминно-минеральных добавок от реакционно-активных микроэлементов; повышение степени усвоения их организмом; создание депо микроэлементов в организме; производство функционального питания, обогащенного тем или иным микроэлементом. Современное производство цыплят-бройлеров требует увеличения содержания микроэлементов марганца и цинка в их рационе в несколько раз [1]. Поиск микроорганизмов, которые возможно использовать в биотехнологии для микробиального синтеза биоплексов, имеет практическую ценность.

Цель исследования – выделить и описать устойчивые к токсическим концентрациям солей меди, цинка, марганца и йода штаммы гетеротрофных микроорганизмов из микробиоценозов зерна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культуры бактерий, устойчивые к солям меди, цинка, селена, йода, были выделены из эпифитной микрофлоры зерна 20 проб пшеницы (*Triticum vulgare*). Навески пшеницы массой 1 г ресуспендировали в 9 мл стерильного физиологического раствора, оставляли для седиментации на 20 мин, делали 10-кратные серийные разведения, которые высевали на чашку Петри в объеме 100 мкл. Первичную изоляцию культур проводили на чашках Петри с *Eugonic* агаром (Биомерье), содержащим соли меди, марганца, цинка и йода в концентрациях от 1 до 5 %.

Вид бактерий определяли на основе секвенирования фрагмента гена 16S рибосомальной РНК и межгенного спейсера 16-23S рибосомальной РНК, а также по совокупности биохимических, культуральных, морфологических признаков. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в ко-

нечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-НCl (pH 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01 % Твин 20; 0,2 мМ дН-ТФ; 0,3 мМ олигонуклеотидных праймеров: 27f AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG и HDA-2 GTATTACCGCGGCTGCTGGACA и 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию проводили на амплификаторе «Терцик» (НПФ ДНК-Технология, Россия) с начальной денатурацией при 95 °С 3 мин, далее в течение 36 циклов с денатурацией при 95 °С 10 с, отжигом при температуре 62–64 °С в течение 10 с и синтезом при 72 °С 15 с. Финальную элонгацию проводили при 72 °С 3 мин. Для определения нуклеотидной последовательности полученные фрагменты амплифицированной ДНК подвергали секвенированию методом Сенгера с использованием наборов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100» (Applied Biosystems, США) по протоколам производителя. Полученные нуклеотидные последовательности подвергали анализу с использованием программных продуктов и баз данных NCBI [2].

Изучены морфологические и культуральные свойства полученных культур. Ферментацию сахаров оценивали на средах Гиса, уреазную активность оценивали по гидролизу мочевины с выделением аммиака (и защелачиванием среды). Бета-галактозидазную, триптофандезаминазную и глюкуронидазную активности определяли на среде «Уриселект 4» (BioRad), так же оценивали каталазную и цитохромоксидазную активности.

Содержание солей цинка, марганца и меди в суспензии отмытых бактериальных клеток определяли с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Анализ выполнен на масс-спектрометре высокого разрешения ELEMENT2 (Finnigan MAT, Germany) при стандартных для прибора операционных условиях [3].

Исследования способности отдельных штаммов накапливать цинк, марганец, медь, селен проведены на триптиказо-соевом бульоне с различными концентрациями солей. Бактериальные клетки, выросшие в присутствии соответствующей соли до оптической плотности сопоставимой с «бессолевым»

контролем, отмывали трехкратно физиологическим раствором, водой, супернатант тщательно удаляли, а осадок бактериальных клеток высушивали при 60 °С в течение 3 сут. Биомассу взвешивали на аналитических весах и растворяли в концентрированной азотной кислоте в объеме 1 мл (аналогичным образом обрабатывали культуры клеток выращенные на обычной среде).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее широкий спектр видов микроорганизмов встречался в присутствии сернокислого марганца. С использованием сред, содержащих марганец, выделены 10 разных видов микроорганизмов (23 штамма), включая не идентифицированные, но морфологически различающиеся. Были выделены и идентифицированы *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* и 4 изолята на данный момент идентифицировать не удалось. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Brevibacillus* sp. выделены из тех же проб зерна при использовании сред, не содержащих солей марганца.

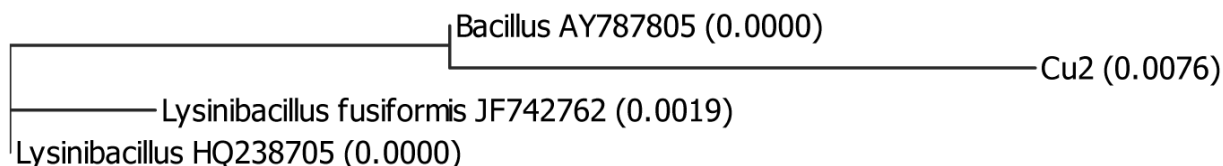
Использование соединений йода и меди существенно ограничило спектр выделяемых видов бактерий. С использованием питательной среды (*Eugonic* agar), содержащей 1 % KJ, изолировали *Vagococcus* sp., *Paenibacillus dendritiformis* и три неидентифицированных изолята. На питательной среде, содержащей медь сернокислую (в концентрации 1 %), выращен один изолят.

В присутствии сульфата цинка (1 %) выращены *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

В процессе опыта выделены в большинстве штаммы и виды рода *Bacillus*, некоторые из них не идентифицированы до вида с помощью анализа гена 16 S рибосомальной РНК. *Bacillus licheniformis* и *B. safensis* практически не различались по этому гену и дополнительное определение ряда биохимических характеристик штамма gallus 4.2, позволили усомниться в его принадлежности к виду *Bacillus. licheniformis* (табл. 1).

Наибольший интерес представляет штамм *Bacillus* sp. Cu 2, устойчивый к солям меди. Данный микроорганизм является грамположительной спорообразующей бактерией. Фрагмент гена 16S рибосомальной РНК характеризуется наибольшей, но неполной (98 %) гомологией с *Bacillus* sp. LY (Genbank AY787805). В настоящее время в изученной литературе отсутствуют данные о видовой принадлежности штамма *Bacillus* (AY787805) [4]. Наиболее близкий вид *Lysinibacillus fusiformis* характеризуется устойчивостью к солям цинка, молибдена, ртути [5] и растет в присутствии 5 % NaCl [6]. Штаммы *Bacillus* (AY787805) и Cu 2 обладают определенным генетическим родством (см. рисунок). Биохимические характеристики штамма Cu 2 (отсутствие ферментации глюкозы с образованием кислоты, сахарозы, маннита, образования уреазы, наличие каталазной и цитохромоксидазной активности) совпадают с аналогичными характеристиками *Lysinibacillus fusiformis* [7].

Тестирование минимальных ингибирующих концентраций в жидкой питательной среде (триптиказосоевый бульон) показало рост чувствительности ряда штаммов к солям марганца и йода. *Ralstonia* sp. Zn19, растущая на твердой питательной среде в присутствии цинка сернокислого в концентрации 1 %, в жидкой питательной



Филогенетические различия между штаммами Cu 2, *Bacillus* Genbank AY787805 и другими близкородственными микроорганизмами

Таблица 1

Сравнительные биохимические характеристики штаммов рода *Bacillus*
(депонированных в коллекции ИХБФМ СО РАН) и неидентифицированного штамма Cu2

Биохимический тест	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. licheniformis</i>			<i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>
	Cu2	Ural-galophyl	mrs	kerica	Orel TE	gallus 4.2
Утилизация фенилаланина	–	–	–	–	–	–
Реакция Фогеса Проскауэра	–	+	+	+	+	+
Уреазная активность	–	–	–	–	–	–
Продукция сероводорода	–	–	–	–	–	–
Ферментация глюкозы с образованием кислоты	–	+	+	+	+	+
Бета- галактозидазная активность	–	+	+	+	+	–
Ферментация:						
лактозы	+	–	–	–	–	–
маннита	–	+–	–	–	+	–
сахарозы	–	+	+–	+	+	+
инозита	–	+	+–	+	–	–
сорбита	–	+	+–	+	–	+
арабинозы	+–	+	+	+	+	+
мальтозы	+	+–	+	+	+–	+

Примечание. «+» положительная реакция, «–» отрицательная, «+–» сомнительная.

среде сохраняла способность к росту при концентрации сернокислого цинка 0,1 % (табл. 2). Штамм *Bacillus* sp. Cu 2 в жидкой питательной среде был в 40 раз более чувствительнее к сернокислой меди. Штаммы *Bacillus pumilus* характеризовались в целом самой низкой устойчивостью как к солям цинка, так и меди, марганца, йода (табл. 2). Штамм *Bacillus* sp. Cu 2, помимо устойчивости к солям меди, также отличался высокой резистентностью к солям цинка, марганца и йода, поэтому можно сделать предположение о наличии универсального механизма, обеспечивающего резистентность к анализируемым соединениям.

Наибольшая способность к аккумуляции марганца обнаружена у штаммов *Bacillus coagulans* № 4 и *B. licheniformis* MRS, эти же штаммы характеризовались значительной устойчивостью к солям марганца по сравнению с другими штаммами бактерий (табл. 3). *Bacillus coagulans* № 4 также отличался способностью к накоплению цинка и меди (№ 3–4), то есть, меха-

низм снижения токсических эффектов от избыточного содержания цинка, марганца и меди у этого вида бактерий универсален. Наибольшей способностью к аккумуляции меди обладал штамм *Bacillus* sp. Belgorod TE (микроорганизм был изолирован на среде в присутствии 50мМ ЭДТА, что обеспечивало селективную изоляцию бактерий, имеющих лиганды, связывающие двухвалентные катионы с большей эффективностью, чем ЭДТА). Выход биомассы и, соответственно, органически связанной меди был выше у *Bacillus* sp. Cu 2 на 48,6 %, что делает этот штамм более перспективным для нужд биотехнологии.

Технология поиска бактерий, потенциально пригодных для микробиального синтеза органических соединений микроэлементов, одновременно позволила расширить область знаний об эпифитной микрофлоре зерна. Состав микроорганизмов на поверхности зерна хлебных злаков изучен недостаточно, особенно в связи с региональной спецификой. Среди обнаруженной эпифитной микрофлоры зерна

Таблица 2

Наивысшая концентрация солей, при которой наблюдался рост культур, %

№ п/п	Штамм	ZnSO ₄	MnSO ₄	KJ	CuSO ₄
1	<i>Bacillus. licheniformis</i> kurica	0.025	0.1	0.1	0.025
2	<i>B. licheniformis</i> MRS	0.025	0.05	0.1	0.025
3	<i>B. subtilis</i> M ВКПМ 3 9865	0.01	0.05	0.1	0.025
4	<i>B. coagulans</i> U602	<0.012	0.012	0.05	0.012
5	<i>B. coagulans</i> 4	0.01	0.1	0.05	0.012
6	<i>Bacillus</i> sp. Belgorod TE	0.025	0.1	0.1	0.012
7	<i>Bacillus</i> sp. Cu2	0.1	0.1	0.1	0.025
8	<i>Ralstonia</i> sp. Zn19	0.012	0.1	0.1	0.025
9	<i>Bacillus. subtilis</i> Mn5	0.012	0.1	0.1	0.012
10	<i>B. safensis</i> OreITE	0.012	0.1	0.1	0.012
11	<i>B. pumilus</i> gallus 4.2	<0.012	0.025	0.025	0.012
12	<i>B. pumilus</i> bovis 2	<0.012	0.025	0.025	<0.012

Таблица 3

Содержание марганца и меди в бактериальных клетках по данным масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

№ п/п	Штамм	Марганец			Медь		
		Mn в бактериях, мкг/мл	MnSO ₄ в питательной среде, мкг/мл	Mn в сухой биомассе, мг/г	Cu в бактериях, мкг/мл	CuSO ₄ в питательной среде, мкг/мл	Cu в сухой биомассе, мг/г
1	<i>B. safensis</i> OreITE*	149	1000	5,58	0,98	0	Недетектируемые значения
2	<i>B. pumilus</i> gallus 4.2*	17	250	7,39	0,27	0	»
3	<i>Bacillus</i> sp. Cu 2	0,01	0	0,0076	29	250	22,3
4	<i>B. safensis</i> OreITE*	0,004	0	0,00014	9,8	120	3,63
5	<i>B. licheniformis</i> MRS*	65	500	149,5	4	250	9.2
6	<i>B. subtilis</i> ВКПМ 3 9865*	0,01	0	0,023	1,17	250	2,69
7	<i>B. coagulans</i> № 4	113	1000	259,9	9,0	120	20,7
8	<i>Bacillus</i> sp. Belgorod TE*	0,07	0	0,161	14,1	120	32,43

* Культуры, депонированные в коллекции ИХБФМ СО РАН.

яровой пшеницы доминирующими являлись бактерии, которые были представлены следующими родами: *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Xanthomonas*, *Erwinia* [8]. Из эпидемически значимых видов отмечены *Pseudomonas aeruginosa* [9], *Staphylococcus aureus* [10], некоторые клостридии. Представители перечисленных

выше родов, как правило, мажорные (доминантные) виды. Выделение всего спектра микроорганизмов, встречающихся в зерне, поэтому представляет определенные трудности [11]. Использование питательных сред, содержащих цинк, медь, йод, позволило также снизить высеваемость доминирующих видов эпифитной микрофлоры зерна и повысить высеваемость минорных видов

бактерий. Доминирующие виды микробиоценозов, особенно те, рост которых не лимитирован по пищевым ресурсам (источником которых и является зерно), преимущественно используют *r*-стратегию роста [12], что предполагает быстрое размножение и активное потребление пищевых ресурсов. Если стремиться к поиску штаммов суперпродуцентов, то маловероятно, что быстро растущий и практически ни с кем не конкурирующий микроорганизм будет обладать высокой удельной активностью по синтезу каких-либо ферментов, субстанций. Минорные компоненты микробиоценозов, реализующие *K*-стратегию (виды, выживающие за счет устойчивости к неблагоприятным факторам среды), должны обладать высокими адаптационными возможностями и уникальными механизмами конкуренции, чтобы не быть вытесненными *r*-стратегами (видами, конкурирующими за счет быстрого роста). Практически все используемые нами среды лишь незначительно изменяли количество высеваемых бактерий, но значительно влияли на спектр выделяемых видов. Исключение составили питательные среды с солями меди, которые позволили выделить только один вид бактерий в одной из проб. Вероятно, поиск новых ингибиторов роста бактерий позволит искать и находить еще более экзотические микроорганизмы. Пример использования меди показывает возможность селективного обнаружения единичных бактериальных клеток, находящихся в пробе зерна, а также позволяет установить, какие минорные (низко представленные) виды бактерий могут попадать в организм птиц и сельскохозяйственных животных [13, 14]. Использование способности бактерий к аккумуляции меди может представлять ценность как для обеспечения организма медью, так и для снижения ее токсических эффектов [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе зерна пшеницы выделены и идентифицированы *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* с использованием сред, содержащих марганец. В питательной

среде, содержащей 1 % KJ, изолированы *Vagococcus* sp., *Paenibacillus dendritiformis*. В присутствии сульфата цинка (1 %) выращены *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*. На питательной среде, содержащей медь серноокислую, выделен один штамм нового вида, предварительно отнесенный к роду *Bacillus*, характеризующийся способностью аккумулировать соединения меди до концентрации 22,3 мг/г сухой биомассы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Рогозинникова И., Шацких Е.** Кормовая добавка Биоплекс Медь в рационе цыплят-бройлеров // Птицеводство. – 2010. – № 9. – С. 26–27.
2. **Базы данных NCBI** – [Электронный ресурс]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. **Nikolaeva I.V., Paleskii S.V., Kozmenko O.A., Anoshin G.N.** Analysis of Geologic Reference Materials for REE and HFSE by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) // Geochemistry International. – 2008. – Vol. 46, N 10. – P. 1016–1022.
4. **Xia H., Bin Z., Jian L., Yi-Liang H., Qiang J., Wen-Ying Z.** Nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY with heterotrophic nitrification ability // Huan Jing Ke Xue. – 2007. – Vol. 28, N 6. – P. 1404–1408.
5. **Iftikhar A., Akira Y., Atsushi Y., Toru F.** Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – P. 1117–1125.
6. **Josic D., Porobic M., Milicevic M., Vukovic D., Pivic R., Zdravkovic M., Coric T.** RAPD Fingerprinting of Indigenous *Lysinibacillus fusiformis* Isolates from Stabilized Sludge and Oil-Polluted Soil // International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology. – Turkey. – 2008. – P. 927–933.
7. **Phyllis A.W. Martin, Elizabeth A., Mongeon Dawn E.** Gundersen-Rindal Microbial combinatorics: a simplified approach for isolating insecticidal bacteria // Biocontrol Science and Technology. – 2008. – Vol. 18, N 3. – P. 291–305.

8. Демченко Е.В., Вершинина Е.В., Петрова А.Е. Влияние сельскохозяйственной культуры и эколого-географической зоны произрастания на состав эпифитной микрофлоры зерна // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 7. – С. 65–69.
9. Афонюшкин В.Н., Юшков Ю.Г., Коптев В.Ю. и др. Использование ПЦР в системе контроля псевдомоноза и пастереллеза с.-х. птицы. – Новосибирск, 2007. – 22 с.
10. ГОСТ 10444.2–94 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества *Staphylococcus aureus*. – М.: Изд-во стандартов, 2002. – 10 с.
11. Афонюшкин В.Н., Храпов Е.А., Мишкова О.Н., Дударева Е.В., Филипенко М.Л., Юшков Ю.Г. Изучение видового разнообразия микрофлоры зерна // Птицеводство. – 2010. – № 10. – С. 47–49.
12. MacArthur R., Wilson E.O. The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press. – [Электронный ресурс]: <http://press.princeton.edu/titles/7051.html>
13. Гомбоев Д.Д., Носенко Н.А., Коптев В.Ю. Регуляция функциональной активности кишечной микрофлоры поросят: сб. науч. тр. Всерос. научн.-исслед. ин-та овцеводства и козоводства. – Ставрополь, 2014. – Т. 3, № 7. – С. 320–323.
14. Леонова М.А., Афонюшкин В.Н., Андронов Е.Е., Кимеклис А.К. Метагеномный анализ микробиоты кишечника сельскохозяйственной птицы в Новосибирской области: сб. науч. тр. Всерос. науч.-исслед. ин-та овцеводства и козоводства. – Ставрополь, 2015. – Т. 1, № 8. – С. 453–455.
15. Finney L.A., O'Halloran T.V. Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors Science // Science. – 2003. – Vol. 300(5621), N 9. – P. 931–936.
16. Demchenko E.V., Vershinina E.V., Petrova A.E. Vliyanie sel'skokhozyaistvennoi kul'tury i ekologo-geograficheskoi zony proizrastaniya na sostav epifitnoi mikroflory zerna // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya – 2004. – № 7. – S. 65–69.
17. Afonyushkin V.N., Yushkov Yu.G., Koptev V.Yu. i dr. Ispol'zovanie PTsR v sisteme kontrolya psevdomonozha i pasterelleza s.-kh. ptitsy. – Novosibirsk, 2007. – 22 s.
18. GOST 10444.2–94 Produkty pishchevye. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva *Staphylococcus aureus*. – M.: Izd-vo standartov, 2002. – 10 s.
19. Afonyushkin V.N., Khrapov E.A., Mishukova O.N., Dudareva E.V., Filipenko M.L., Yushkov Yu.G. Izuchenie vidovogo raznoobraziya mikroflory zerna // Ptitsevodstvo. – 2010. – № 10. – S. 47–49.
20. MacArthur R., Wilson E.O. The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press. – [Электронный ресурс]: <http://press.princeton.edu/titles/7051.html>
21. Xia H., Bin Z., Jian L., Yi-Liang H., Qiang J., Wen-Ying Z. Nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY with heterotrophic nitrification ability// Huan Jing Ke Xue. – 2007. – Vol. 28, N 6. – P. 1404–1408.
22. Iftikhar A., Akira Y., Atsushi Y., Toru F. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – P. 1117–1125.
23. Josic D., Porobic M., Milicevic M., Vukovic D., Pivic R., Zdravkovic M., Coric T. RAPD Fingerprinting of Indigenous *Lysinibacillus fusiformis* Isolates from Stabilized Sludge and Oil-Polluted Soil // International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology. – Turkey. – 2008. – P. 927–933.
24. Phyllis A.W. Martin, Elizabeth A., Mongeon Dawn E. Gundersen-Rindal Microbial combinatorics: a simplified approach for isolating insecticidal bacteria // Biocontrol Science and Technology, – 2008. – Vol. 18, N 3. – P. 291–305.

REFERENCES

1. Rogozinnikova I., Shatskikh E. Kormovaya dobavka Biopleks Med' v ratsione tsyplyat-broilerov // Ptitsevodstvo. – 2010. – № 9. – S. 26–27.
2. Bazy dannykh NCBI – [Elektronnyi resurs]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. Nikolaeva I.V., Palesskii S.V., Kozmenko O. A., Anoshin G.N. Analysis of Geologic Reference Materials for REE and HFSE by Induc-

13. **Gomboev D.D., Nosenko N.A., Koptev V.Yu.** Regulyatsiya funktsional'noi aktivnosti kishhechnoi mikroflory porosyat: sb. nauch. tr. Vseros. nauchn.-issled. in-ta ovtsevodstva i kozovodstva. – Stavropol', 2014. – T. 3, № 7. – S. 320–323.
14. **Leonova M.A., Afonyushkin V.N., Andronov E.E., Kimeklis A.K.** Metagenomnyi analiz mikrobioty kishhechnika sel'skokhozyaistvennoi ptitsy v Novosibirskoi oblasti.: sb. nauch. tr. Vseros. nauch.-issled. in-ta ovtsevodstva i kozovodstva. – Stavropol', 2015. – T. 1, № 8. – S. 453–455.
15. **Finney L.A., O'Halloran T.V.** Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors Science // Science. – 2003. – Vol. 300 (5621), N 9. – P. 931–936.

STUDYING REPRESENTATIVES OF WHEAT GRAIN MICROBIOTA RESISTANT TO COPPER, ZINC, MANGANESE AND IODINE SALTS

**N.A. DONCHENKO¹, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Head,
V.N. AFONYUSHKIN^{1,2}, Candidate of Science in Biology, Sector Head,
I.V. NIKOLAYEVA³, Candidate of Science in Chemistry, Senior Researcher,
E.A. KHRAPOV², Junior Researcher,
O.V. MISHUKOVA², Junior Researcher,
I.N. TROMENSHLEGER², Engineer,
M.L. FILIPENKO², Candidate of Science in Biology, Laboratory Head,
N.V. DAVYDOVA¹, Candidate of Science in Veterinary Medicine, Senior Researcher**

¹ Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, SFSCA RAS
Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia,
e-mail: lisocim@mail.ru

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS
8, Lavrentyeva Ave, Novosibirsk, 630090, Russia,
e-mail: mfilipenko@gmail.com

³ V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy, SB RAS
3, Akademika Koptyuga Ave, Novosibirsk, 630090, Russia,
e-mail: inikol@igm.nsc.ru

There was studied the species composition of the wheat grain microbiota, representatives of which could be potential producers of organic compounds for modern biotechnology. Twenty wheat (*Triticum vulgaris*) samples were tested, from microbiocenoses of which the strains of heterotrophic microorganisms resistant to toxic concentrations of copper, zinc, manganese and iodine salts were isolated and described. The contents of zinc, manganese and copper salts in a suspension of washed bacterial cells were determined using a highly sensitive multielement analysis method of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Using media containing manganese, we isolated and identified *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens*. Using a medium containing 1% KJ, we isolated *Vagococcus* sp., *Paenibacillus dendritiformis* and three unidentified isolates. On a nutrient medium containing copper sulfate, one isolate of an unknown species was grown. In the presence of 1% zinc sulfate, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* have grown that allows using them for the development of selective media. Bacteria of the genus *Bacillus* have been detected, which are characterized by the ability to accumulate copper compounds to a concentration of 22.3 mg/g dry biomass. The 16S rRNA gene fragment from this culture has the greatest, but incomplete (98%), homology with *Bacillus* sp. LY (Genbank AY787805). No data on species identity of this *Bacillus* strain are available in the literature studied that allows us to refer it and isolated strain Cu2 to a new species, which has not previously been described.

Keywords: organic compounds, copper, zinc, manganese, iodine, *Ralstonia insidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*.

Поступила в редакцию 21.06.2017