

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ПОГРЕБЕННЫЕ ПОЧВЫ КАК НЕТРАДИЦИОННЫЙ ИСТОЧНИК
ВЫДЕЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ
ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

© 2019 г. Е. В. Дёмкина^а, *, Е. В. Дорошенко^б, Т. Л. Бабич^а, В. В. Миронов^а,
А. В. Борисов^с, Т. С. Дёмкина^с, Г. И. Эль-Регистан^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^сИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения
Российской академии наук, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: elenademkina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2019 г.

После доработки 25.02.2019 г.

Принята к публикации 29.03.2019 г.

Исследования молекулярно-генетического биоразнообразия микробных сообществ палеопочв показали, что около 50% древних риботипов не обнаруживаются среди риботипов современных микробных сообществ. Это определяет целесообразность реактивации и изучения физиологических свойств древних микроорганизмов как потенциально ценных биотехнологических продуцентов. Объектом исследования была бактериальная протеолитическая компонента подкурганных палеопочв, отобранных из сосудов с погребальной пищей курганных могильников “Песчаный-4” и “Неткачево” (XV–XIV вв. до н.э.) (Волгоградская и Ростовская области, Россия). Численность жизнеспособных клеток гетеротрофных бактерий в реактивированных образцах составляла $(1.5–16.0) \times 10^7$ КОЕ/г почвы (рост на LB-агаре). С использованием приема чередующейся инокуляции образцов в жидкие среды и высева на плотные среды выделены в чистые культуры ряд штаммов, идентифицированных на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Были выделены следующие штаммы: *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus coagulans*) – потенциально ценный пробиотик; *Aquamicrobium terrae* – протеолитик, продуцент поверхностно-активных веществ и биодеградант органического вещества; *Bacillus cereus* – токсигенный штамм для аутобредных белых мышей при внутрибрюшной инокуляции; *Staphylococcus hominis* и *St. epidermidis* – оппортунистические условные патогены нормофлоры человека (кожных покровов). Все штаммы (кроме *Bacillus cereus*) характеризовались высокой продуктивностью нейроактивных аминов (ДОФА, ДОРАС, ДА, 5НТР, НВА, 3МТ) и аминокислот (ASP, GLU, GLY, TAU, GABA). Отмечено, что из сосудов с погребальной пищей были выделены, в основном, штаммы, характерные не для почвенных микробных сообществ, а связанные с человеком.

Ключевые слова: погребенные почвы, погребальная пища, протеолитические и молочнокислые бактерии, оппортунистические патогены нормофлоры человека, нейроактивные амины

DOI: 10.1134/S0026365619050057

Около 6000 лет назад у степных племен эпохи энеолита появился новый тип погребального обряда: над могильной ямой и окружающей ее поверхностью стали насыпать холм из почвенно-грунтового материала (Раевский, 1985). В отечественную научную литературу археологические памятники подобного рода вошли под названием “курганы”. Не вызывает сомнений, что грунтовые погребальные древне- и средневековые исторические памятники одновременно являются и памятниками природы. Их исследование дает возможность получать представления как об ис-

тории, культуре и быте древних племен, так и о состоянии природных систем того времени.

Характеристики микробных сообществ погребенных почв относятся к числу важнейших диагностических показателей, отражающих условия почвообразования, поскольку почвенные микроорганизмы участвуют, в той или иной степени, практически во всех процессах, протекающих в почвах. Проведенные микробиологические исследования подкурганных палеопочв сухих и пустынных степей Нижнего Поволжья показали, что в них до настоящего времени сохраняются

микробные сообщества, существовавшие во время сооружения археологических памятников (Демкина и соавт., 2000, 2004). Это подтверждено данными определения возраста микробной фракции с использованием метода ^{14}C атомной масс-спектрометрии (Demkina et al., 2008) и выявленными закономерностями распределения численности микроорганизмов различных трофических групп в курганных насыпях, погребенных и современных почвах (Дёмкина и соавт., 2007).

Известно, что практически в каждом втором курганном погребении эпох бронзы и раннего железа (XXV в. до н.э.—IV в. н.э.) степных племен Евразии в качестве погребальных атрибутов встречаются глиняные сосуды различных типов (горшки, кувшины, банки и др.), в которых находилась погребальная пища. При комплексных почвенно-археологических исследованиях курганов Нижнего Поволжья для реконструкции исходного содержимого погребальных сосудов был применен фосфатный метод, основанный на количественном определении соединений фосфора в придонной части грунта в погребальных сосудах, позволяющий по содержанию подвижных соединений фосфора составить количественные градации и определить качественный состав пищи (Дёмкин и соавт., 1988). Среди погребальной посуды главное внимание уделяется изучению глиняных сосудов, так как в бронзовых сосудах придонный грунт обогащается соединениями меди, которые делают невозможным применение фосфатного метода, а также способствуют активизации металлоксилирующих микроорганизмов, не имеющих отношения к исходному пищевому содержимому (Дёмкин и соавт., 2014).

В последние годы методическая база реконструкции погребальной пищи расширилась за счет использования методов почвенной микробиологии (Дёмкин и соавт., 2014). Исследователи исходили из вполне обоснованного предположения, что в придонном грунте того или иного сосуда должны сохраняться жизнеспособными как микроорганизмы, характерные для микробного сообщества почвы, заполнившей сосуд, так и формы, использующие в качестве основного питательного субстрата специфические погребальные продукты.

Исследования биоразнообразия микробных сообществ палеопочв на основе молекулярно-генетических методов определения и оценки генетического разнообразия микроорганизмов (Tiedje et al., 1999) показали, что до 50% риботипов палеопочв не сохраняется в микробных сообществах современных почв (Дёмкин и соавт., 2010).

Помимо вопросов палеоэкологической реконструкции прошлых эпох и моделирования возможных изменений климата, можно предположить, что древние микробные сообщества могут

послужить источником для поиска перспективных продуцентов целевых веществ, так как являются хранилищем “законсервированных” временем микроорганизмов.

Сохранению микроорганизмов прошлых эпох способствуют адаптационные механизмы, обеспечивающие их выживание в неблагоприятных экологических условиях (переход бактерий в анабиотические покоящиеся и некультивируемые формы, наноформы) (Вайнштейн, Кудряшова, 2000; Бухарин и соавт., 2005). С применением методов электронной микроскопии установлено, что выжившие сообщества палеопочв представлены анабиотическими цистоподобными покоящимися клетками, а в горизонте (гор.) A1 подкурганных каштановых палеопочв 80% клеток представлены наноформами (их объемы не превышают 0.09 мкм^3) (Каширская и соавт., 2010; Кряжевских и соавт., 2012). Цитологические исследования полученных в лабораторных условиях наноклеток позволили предположить, что их формирование представляет универсальную ответную реакцию организма на неблагоприятные условия и действие стрессорных факторов (Вайнштейн, Кудряшова, 2000; Кряжевских и соавт., 2013).

Надо отметить, что популяции покоящихся клеток, в том числе древних микробных сообществ, гетерогенны по сохранению ростового потенциала (Эль-Регистан и соавт., 2006). Ранее нами были подобраны условия для реактивации покоящихся клеток бактерий древних сообществ другого типа — законсервированных в вечномёрзлых почвах и подпочвенных отложениях Арктики и Антарктиды (Кряжевских и соавт., 2012; Манучарова и соавт., 2016). Следует отметить особенность микроорганизмов-объектов исследования, а именно селективность условий их развития в захороненных сосудах предположительно с мясной или молочной пищей, где преимущества получали микроорганизмы с протеолитической активностью.

Целью настоящей работы было исследовать в образцах подкурганных погребенных почв из сосудов с погребальной пищей гетеротрофную протеолитическую бактериальную компоненту и оценить возможность получения биотехнологически значимых штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были образцы подкурганных палеопочв, отобранные из сосудов с погребальной пищей курганных могильников “Песчаный-4” и “Неткачево”. Курганный могильник “Песчаный-4” расположен в 2000 м восточнее села Ремонтное Ростовской области (Сальско-Манычская гряда, западная часть Ергенинской возвышенности, юго-восток Русской равнины; географические координаты: 46.560470,

Таблица 1. Реконструкция погребальной пищи в глиняном горшке курганного могильника “Неткачево” (Дёмкин и соавт., 2014)

Объект		Содержание P ₂ O ₅ , мг/100 г	Содержимое сосуда по P ₂ O ₅
Погребение 1	Фон	5.2	Мясной или молочный продукт
	Сосуд	1.6	

43.657674). Высота над уровнем моря 150–180 м. Курган № 13 расположен в привершинной зоне водораздельного участка на восточном высоком правом берегу р. Джурак-Сал на пахотном поле. В момент проведения раскопок курган был под паром. Погребенная почва XXVIII–XXVII вв. до н.э. (ямная культура) светло-каштановая. Почвообразующие породы представлены лессовидными суглинками, перекрывающими песчаные отложения палеогенового времени. Раскопки проводились археологической экспедицией Государственного исторического музея (рук. Н.И. Шишлина).

Курганный могильник “Неткачево” расположен в Котовском районе Волгоградской области в 2.5 км к северо-западу от села Неткачево (географические координаты: 50.540484, 44.924029). В природном отношении район исследования приурочен к зоне сухих степей, расположен в южной части Приволжской возвышенности (северная окраина Доно-Медведицкой гряды), на вершине плоского межбалочного водораздела. Абсолютные высоты местности составляют 220–225 м. Образцы были отобраны из кургана № 15, расположенного на склоне водораздела. Погребенная почва XVI–XV вв. до н.э. (срубная культура) каштановая эродированная незасоленная. Раскопки проводились археологической экспедицией Волгоградского государственного университета (рук. А.Н. Дьяченко).

Были проанализированы 4 образца погребенных почв: три из курганного могильника “Песчаный-4” (образцы № 1–3) и один из “Неткачево” (образец № 4).

Все образцы отобраны из глиняных сосудов курганных захоронений, возможно, содержащих молоко или мясные продукты. Исходя из этого, можно предположить присутствие в образцах протеолитических и молочнокислых микроорганизмов. Один из образцов (№ 4) был проанализирован фосфатным методом (Дёмкин и соавт., 2014), что позволило идентифицировать содержимое сосуда как молочный или мясной продукт (табл. 1).

Среды для реактивации и выделения изолятов из палеопочв. Для выделения микроорганизмов из горшков с погребальной пищей применяли среды, в равной степени подходящие для развития молочнокислых и протеолитических бактерий: (1) гидролизованное молоко (обезжиренное мо-

локо с добавлением панкреатина); (2) среда MRS (*Lactobacillus* MRS Agar/Broth Base), (3) мясо-пептонный агар, содержащий ростовые факторы, селективные для лактобацилл; (4) *Lactobacillus* Selection Agar/Broth Base (LB), богатая среда для селективного выделения гетеротрофных бактерий; (5) Rogosa SL Agar/Broth Base, богатая среда для культивирования лактобактерий орального и фекального происхождения; (6) лактобакагар (LA); (7) питательная среда для выделения и культивирования лактобацилл; (8) обезжиренное (0.1%) ультрапастеризованное молоко (“Parmalat”).

Количество жизнеспособных бактерий в образцах погребенных почв определяли по численности колониеобразующих единиц (КОЕ) при рассеивании десятичных разведений образцов и клеточных суспензий на агаризованные среды. Почвенные образцы (1 г) предварительно инкубировали в растворе пиррофосфата (0.5%) в течение 24 ч, затем добавляли стрессопротектор (метилрезорцин) и стимулятор роста (индолилуксусную кислоту) как описано в работе (Кряжевских и соавт., 2012).

Родовую и видовую принадлежность микроорганизмов, выделенных в чистых культурах, определяли методом секвенирования амплифицированных последовательностей гена 16S рНК. Тотальную ДНК выделяли из биомассы с использованием набора для выделения ДНК “DiatomtmDNAprep” (ИБХ РАН, Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Амплификация генов 16S рНК. Выделенную ДНК использовали для полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными бактериальными праймерами. ПЦР проводили на амплификаторе iCycler фирмы “BioRad” (США) в 10 мкл смеси, содержащей: 1× *Taq*-буфер (10 мМ Tris-HCl рН 8.3, 50 мМ KCl), 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, по 5 пикомолей 5'- и 3'-концевых праймеров, 1 ед. активности *Taq* ДНК-полимеразы (“Perkin-Elmer”, США) и 1 мкг ДНК. Амплификацию генов 16S рНК проводили в следующем режиме: 1 цикл – 3 мин при 94°C, 30 циклов по 0.5 мин при 94°C, 0.5 мин при 50°C, 0.5 мин при 72°C и 7 мин при 72°C. Длину полученных фрагментов проверяли в 1.0% агарозном геле с бромистым этидием.

Секвенирование ПЦР-продуктов фрагментов генов 16S рНК проводили на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer с использованием

набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (“Applied Biosystems”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Филогенетический анализ последовательностей гена 16S рРНК. Первичный сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) в базе данных NCBI GenBank с последовательностями референтных организмов. Последовательности редактировали с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Филогенетический анализ проводили путем построения эволюционных деревьев с помощью программных пакетов MAFFT 6.0. (Katoh, 2009), MEGA version 4.0. (Tamura, 2007). Дендрограммы были построены с использованием алгоритма “метод объединения соседей” (Neighbor joining method).

Органические кислоты в накопительных культурах (НК) образцов почв и чистых культурах бактерий определяли хроматографически (Захарова и соавт., 2013) на ВЭЖХ хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия). Образец микробной или почвенной суспензии центрифугировали для удаления клеток и нерастворимого осадка. Супернатант подкисляли 5 М H_2SO_4 до pH 2 и вводили в хроматограф. Разделение проводили в изократическом режиме с элюентом 5 мМ H_2SO_4 и расходом 0.6 мл/мин на колонке Aminex HPL-87H (“BioRad”, США), присоединенной к рефрактометрическому детектору Smartline 2300 (“Knauer”, Германия).

Накопительные культуры (НК) из образцов № 1–4 готовили путем многократного (до 5 раз) пассирования на обезжиренном молоке и дальнейшего культивирования в течение 2 нед. в стандартных и микроаэрофильных (м) условиях.

Протеолитическую активность выделенных бактерий определяли в культуральной жидкости методом Ансона (Нетрусов и соавт., 2005), основанном на определении количества тирозина, образующегося при гидролизе казеина внеклеточными ферментами. За 1 ед. протеолитической активности (ПЕ) принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкг тирозина за 10 мин в 1 мл культуральной жидкости.

Биодеградативную активность органического вещества бактерии *Aquamicrobium terrae* определяли по интенсивности разложения осадка сточных вод муниципальных очистных сооружений. Твердофазной аэробной биодеградации (компостированию) подвергали смесь анаэробно сброженного осадка сточных вод (АНОСВ) Люберецких очистных сооружений АО “Мосводоканал” и древесных опилок листовенных пород деревьев (береза, осина) (Zorpas, 2008). Компостируемая смесь содержала 2 кг АНОСВ и 1.35 кг опилок. В опытный образец вносили 25 г *A. terrae* (по весу сухих кле-

ток), предварительно разбавив его 500 мл водопроводной воды. Образец инкубировали при температуре 43°C в течение 3 ч. В контроле в компостируемую смесь с добавлением 500 мл водопроводной воды бактерии не вносили. Компостирование проводили в двухкамерной экспериментальной установке объемом 50 л, созданной в соответствии с рекомендациями (Petiot, 2004) с равными условиями в каждой камере. Компостируемую смесь помещали в цилиндрические емкости объемом 9 л каждая. Опыты проводили в трехкратной повторности, как описано ранее (Mironov, 2018). Эффективность компостирования оценивали по изменению температуры компостируемого материала, а также изменению концентрации диоксида углерода и кислорода в газовой фазе (Petric, 2012; Mironov, 2018); автоматический режим поддержания температуры саморазогрева осуществляли с помощью измеритель-регулятора температуры ИРТ-4/16-Т-8Р-8А (“ЭКСИС”, Россия) с точностью 0.1°C. Концентрацию углекислого газа (0–5.0 ± 0.5 об. %) и кислорода (0–30 об. % с погрешностью ± 1.0 об. %) определяли в установке с помощью газоанализатора ОКА-92МТ (“Информаналитика”, Россия) непрерывно. Время компостирования составило 10 сут.

Угледородокисляющую активность бактерии *A. terrae*, выделенной в чистую культуру, определяли при росте в жидкой минеральной среде Адкинса (Adkins et al., 1992) следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 0.75; NH_4Cl – 0.3; $NaCl$ – 5.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.1; KCl – 0.1; $CaCl_2$ – 0.02; pH 7.0; микроэлементы (1 мл/л) по рецепту (Pfennig, Lippert, 1966). В качестве единственного источника углерода и энергии вносили (0.2–0.5 об. %): (1) стерильную сырую высокопарафинистую (среднее содержание парафинов 5.1%) нефть девонских отложений Узеньского нефтяного месторождения (Казахстан), плотность 0.862 г/см³; (2) смесь жидких *n*-алканов C_{14} – C_{17} . Культуры инкубировали в статических условиях в герметично закрытых флаконах при температуре 25–28°C в течение 7 сут. Контролем служила стерильная среда с нефтью. Рост бактерий на углеводородах нефти анализировали методом газовой-жидкостной хроматографии (Назина и соавт., 2018). Рост на смеси углеводородов C_{14} – C_{17} определяли по изменению оптической плотности (OD_{660}) культуры (Ultrospec 2100 pro, “Amersham Biosciences”, Великобритания; $l = 1$ см; $\lambda = 660$ нм) и образованию устойчивой эмульсии. Развитие бактерий на углеводородах детектировали через 7 сут роста.

Определение индекса эмульгирования (Е24) при росте бактерии *A. terrae* на среде Адкинса (Adkins et al., 1992) со смесью парафинов C_{14} – C_{17} и среде LB определяли модифицированным методом (Zajic et al., 1977). К 1.0 мл гексадекана добавляли 1.0 мл исследуемой культуры. Смесь встряхивали

Таблица 2. Органические кислоты, образовавшиеся в накопительных культурах (НК), полученных из образцов погребенных почв, и в чистых культурах изолятов в стандартных (с доступом воздуха) и микроаэрофильных условиях (м)

Объект	Органическая кислота, ммоль/л					
	лактат	ацетат	изобутират/этанол	n-бутират	формиат	изовалерат
НК 2	24.9	19.3	1.6	0.4	0.6	0.0
НК 3	18.6	16.5	3.3	1.0	15.3	0.6
НК 4	11.9	15.0	2.6	0.2	5.3	0.0
<i>B. coagulans</i>	26.3	31.8	1.3	0.0	0.0	0.0
<i>St. hominis</i>	1.9	4.0	2.0	1.0	0.5	1.4
<i>B. coagulans</i> (м)*	37.52	3.71	4.14	0.43	0.00	0.19
НК 2 (м)	26.26	5.38	1.69	1.59	2.52	0.05
НК 3 (м)	49.75	1.58	4.19	0.20	4.55	0.09
НК 4 (м)	11.57	8.39	0.71	1.39	1.53	0.06

* Микроаэрофильные условия культивирования.

в течение 3 мин, отстаивали в течение 24 ч, после чего фиксировали объем и устойчивость образовавшейся эмульсии. Индекс эмульгирования выражали в % объема эмульсии от объема смеси (100%).

Содержание количества биогенных аминов и аминокислот, синтезируемых выделенными штаммами, определяли в культуральной жидкости культур бактерий стационарной фазы при их росте в средах МПБ и обезжиренном (0.1%) ультрапастеризованном молоке ("Parmalat") методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Биогенные амины и их предшественники разделяли на обращенно-фазовой колонке ReproSil-Pur ("Dr. Majsch GmbH", "Элсико", Москва) с последующей амперометрической детекцией на стеклоугольном электроде. Содержание нейроактивных аминокислот определяли на хроматографической установке LC-304T ("BAS, Inc.", West Lafayette, США) с последующей флуориметрической детекцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение гетеротрофных бактерий из сосудов с погребальной пищей. При микробиологическом анализе учет численности специфических групп микроорганизмов проводили чашечным методом посева водной суспензии почвенного образца из придонного грунта, отобранного из погребально-сосуда, на агаризованные питательные среды. Численность гетеротрофных бактерий была определена в образцах 1–4 высевом почвенных суспензий на агаризованную (1.5%) среду LB. Численность микроорганизмов (КОЕ) в образцах после их 1-сут инкубации в растворе пирофосфата и реактивации клеток методами, разработанными для реактивации покоящихся почвенных

арктических микробных сообществ (Кряжевских и соавт., 2012), составила (КОЕ $\times 10^7$ /г почвы): 1 образец – 2.5; 2 – 16.0; 3 – 1.5; 4 – 8.0.

Достаточно высокий титр клеток, способных к размножению, свидетельствовал о хорошем сохранении жизнеспособности бактериями, длительное время (несколько тысяч лет) находящимися в состоянии покоя в горшках с погребальной пищей (молочной или мясной) подкурганых захоронений.

Определение органических кислот в накопительных культурах, полученных инкубацией образцов погребенных почв в обезжиренном молоке при естественной аэрации, показало наличие в них лактата (табл. 2). При этом в микроаэрофильных условиях (полное заполнение сосуда средой) количество образующегося лактата возрастало (табл. 2). Лактат образовывался во всех условиях, что свидетельствовало о наличии в исследуемых образцах молочнокислых бактерий.

Для выделения чистых культур протеолитических и молочнокислых бактерий (МКБ) использовали прием чередующихся инокуляции образца в обезжиренное молоко и высева на различные среды при соблюдении микроаэрофильных условий (полное заполнение сосудов для культивирования и посев в агаризованные среды уколом). При этом предполагалось, что на всех средах в равной степени будут развиваться как МКБ, так и протеолитические бактерии. Приведем примеры такого выделения чистых культур (все посевы культивировали при 30°C). Схема 1: в 10 мл физраствора с 0.5% пирувата натрия вносят 1 г почвенного образца, инкубация 1 сут → инокуляция жидкой среды SL или 3.2% молока, инкубация 7 сут → рассев на среды MRS и LA, инкубация 7 сут → инокуляция отдельными колониями 0.5% молока, инкубация 7 сут → рассев на среду LA, инкубация 7 сут → пересев отдельных колоний на

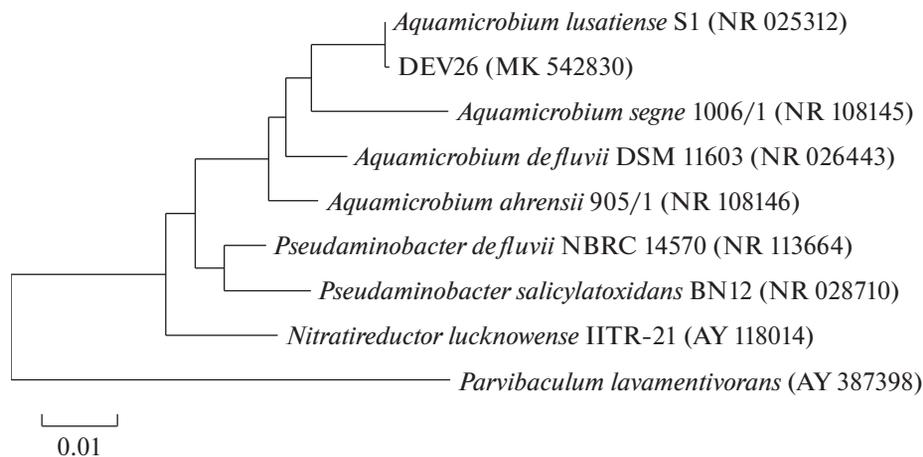


Рис. 1. Филогенетическое положение выделенного штамма *Aquamicrobium terrae* (МК_542830), определенное с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев.

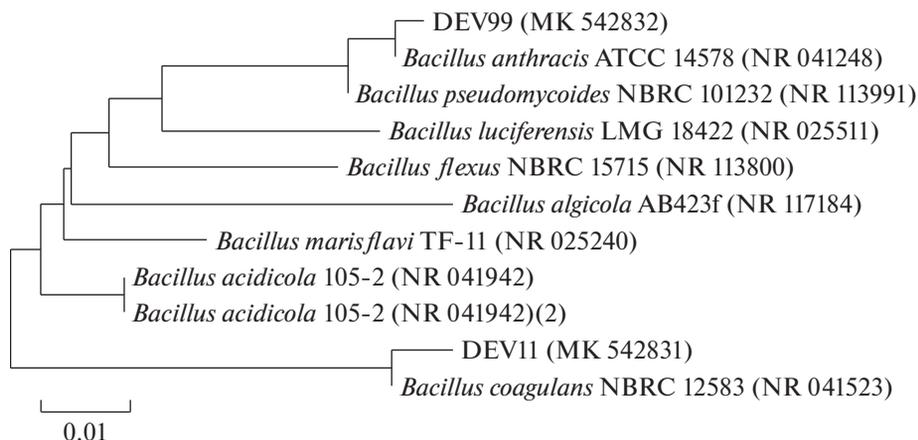


Рис. 2. Филогенетическое положение выделенных штаммов *Bacillus coagulans* (МК_542831) и *Bacillus cereus* (МК_542832), определенное с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев.

среду MRS. Схема 2: в 10 мл физраствора с 0.5% пирувата натрия вносят 1 г почвенного образца, инкубация 14 сут → инокуляция среды ГМ, инкубация 7 сут → рассев на среду MRS, инкубация 7 сут → инокуляция обезжиренного молока отдельными колониями, инкубация 7 сут → рассев на среды MRS и ГМ+, инкубация 7 сут → пересевы отдельных колоний на среду MRS.

Всего из исследованных образцов были выделены изоляты, большинство из которых по культурально-морфологическим признакам относились к родам *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Aquamicrobium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*. Из выделенных в чистые культуры изолятов остановимся на следующих, представляющих интерес для биотехнологических целей и биомедицины. Из образца № 1 выделены бактерии *Aquamicrobium terrae* и *Bacillus*

cereus; из образца № 2 – *Staphylococcus hominis*; из образца № 3 – *St. epidermidis* и *St. hominis*; из образца № 4 – *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus coagulans*). Идентификация изолятов была проведена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности изолятов внесены в базу данных GenBank NCBI как: *Aquamicrobium terrae* DEV26 (МК_542830), *Bacillus coagulans* DEV11 (МК_542831), *Bacillus cereus* DEV99 (МК_542832), *Staphylococcus epidermidis* DEV205 (МК_542833), *Staphylococcus hominis* DEV49 (МК_542834) (рис. 1–3).

Учитывая специфику источника выделения исследуемых бактерий (сосуды с погребальной пищей), были определены их протеолитическая активность и продукция нейроактивных соединений.

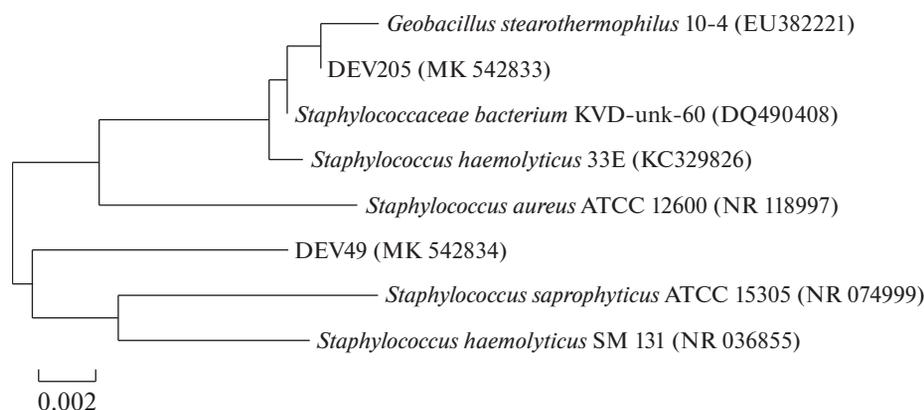


Рис. 3. Филогенетическое положение выделенных штаммов *Staphylococcus epidermidis* (МК_542833), и *Staphylococcus hominis* (МК_542834), определенное с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Продукция нейроактивных соединений бактериальными штаммами, выделенными из палеопочв. В последние годы большое внимание уделяется способности микроорганизмов – симбионтов человека и животных, продуцировать нейроактивные соединения, участвующие в передаче импульсов через синаптическую цепь между нервными клетками (Олескин и соавт., 2016). Ранее проведенными исследованиями показано, что молочнокислые бактерии, как основные компоненты микробных сообществ желудочно-кишечного тракта человека и животных, являются эффективными продуцентами нейромедиаторов (Олескин и соавт., 2014, 2016).

В табл. 3 и 4 приведены результаты определения содержания внеклеточных биогенных аминов и нейроактивных аминокислот в культуральной жидкости выделенных изолятов, развивающихся в молоке до стационарной фазы роста. Наиболее продуктивными по синтезу дофамина (ДА), дигидроксифенилаланина (ДОФА) – предкурора дофамина, и 5-гидрокситриптофана (5 НТР) – предкурора серотонина, оказались штаммы *A. terrae* и *B. coagulans* (*Lactobacillus sporogenes*). По содержанию дофамина *B. coagulans* превосходил исследованные штаммы МКБ в 10 раз (0.7 мкМ) (Олескин и соавт., 2014). Высокой продуктивностью биогенных аминов характеризовались также штаммы *Bacillus* sp. I (из образца № 4) и *Bacillus* sp. II (из образца № 3). Штаммы *B. coagulans* и *A. terrae* обладали также высокой биосинтетической активностью в отношении нейроактивных аминокислот: аспарагина (~0.3 мкМ), глицина (~1.0–0.7 мкМ), глутатиона (~0.5 мкМ), таурина (~1.0 мкМ), существенно более высокой, чем у современных штаммов МКБ (Олескин и соавт., 2014).

Протеолитическая активность штаммов, выделенных из палеопочв. Все выделенные в чистую

культуру бактерии характеризовались умеренной протеолитической активностью (табл. 5), наиболее высокой обладали штаммы *A. terrae* и *Bacillus* sp. II (из образца № 3) – около 0.2 ед./мл (по Ансону).

Высокая протеолитическая активность штамма *A. terrae* предполагала его потенциальную перспективность в биотехнологиях, где используется гидролиз белковых соединений, в частности, при компостировании органических коммунальных отходов. В лабораторных экспериментах в течение исследуемого срока (10 сут) компостирования смеси осадка сточных вод муниципальных очистных сооружений и древесных опилок наблюдали значительное увеличение температуры опытного образца по сравнению с контрольным (рис. 4). В опытном образце термофильный режим компостирования 37–53°C установился уже в первые сутки и удерживался в течение 8 сут. При этом температура обеззараживания 50–53°C была достигнута на 5–6 сут и сохранялась на этом уровне более 48 ч, что считается достаточным для обеззараживания компостной смеси от условно-патогенной микрофлоры и личинок гельминтов. Отметим, что в эти сроки температура в контрольном образце не поднималась выше 39°C.

Углекислородоокисляющая активность бактерий *Aquamicrobium terrae*. Еще одним биотехнологически значимым свойством штамма *A. terrae* была его способность расти на средах с алифатической составляющей нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. По литературным данным штамм *A. terrae*, впервые изолированный из химически загрязненных почв, обладал высокой активностью разложения углеводородов (Zhi-Guo Wu et al., 2014). В наших экспериментах рост штамма *A. terrae* на сырой нефти Узеньского нефтяного месторождения сопровождался образованием водно-нефтяной эмульсии, что свидетельствовало о способности бактерии синтезиро-

Таблица 3. Концентрации нейроактивных аминов (нМ) в культурах изолятов, выделенных из палеопочв

Штаммы	Продуктивность, нМ/л											
	ДОФА	NA	ДОРАС	DA	5-НТ	5НТР	5-Н1АА	HVA	3МТ	ДОРАС/DA	HVA/DA	5-Н1АА/5-НТ
<i>Bacillus</i> sp. I	151.4	0.0	468.1	266.8	0.0	381.7	0.0	2758.3	1278.4	1.8	10.3	
<i>B. coagulans</i>	299.1	0.0	720.4	724.7	0.0	617.3	0.0	15.2	371.1	1.0	0.0	
<i>Bacillus</i> sp. II	0.0	1204.6	273.5	55.9	11.4	100.2	92.2	1629.8	189.5	4.9	29.1	8.1
<i>A. terrae</i>	4114.4	0.0	3398.4	441.7	0.0	438.5	482.9	600.8	1036.9	7.7	1.4	
<i>St. hominis</i>	143.0	120.6	267.1	342.4	0.0	428.6	0.0	60.5	197.6	0.8	0.2	
<i>St. epidermidis</i>	55.1	160.2	70.9	59.6	0.0	246.8	0.0	14.1	391.9	1.2	0.2	

Обозначения. ДОФА – дигидроксифенилаланин (прекурсор дофамина); NA – норадrenalин; ДОРАС – дигидроксифенилуксусная кислота (прекурсор дофамина); DA – дофамин; 5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин); 5НТР – 5-гидрокситриптофан (прекурсор серотонина); 5-Н1АА – 5-гидроксииндолуксусная кислота (продукт обмена серотонина); HVA – гомованилиновая кислота (основной продукт обмена катехоламинов, в том числе дофамина); 3МТ – 3-метокситирамин – продукт обмена дофамина.

вать поверхностно-активные вещества (ПАВ), способствующие эмульгированию водонерастворимых углеводов. При росте на нефти штамм преимущественно использовал *n*-алканы C₁₂–C₁₉, а также C₂₃–C₃₂ (рис. 5). Остаточное содержание *n*-алканов нефти при росте штамма *A. terrae* представлено на рис. 6.

Способность окислять низкомолекулярные *n*-алканы нефти была подтверждена при росте бактерий *A. terrae* на смеси жидких парафинов фракции C₁₄–C₁₇. В этих экспериментах была выявлена высокая эмульгирующая активность штамма, которая в принятых единицах измерения составляла 50%, что демонстрирует способность *A. terrae* продуцировать внеклеточные биосурфактанты. При смешивании культуральной жидкости с *n*-гексаном, последующем встряхивании и отстаивании в течении 24 ч, наблюдали сохранение стойкой эмульсии (E24 = 50%). Таким образом, изолированный из палеопочв штамм *A. terrae* обладает высокой протеолитической и эмульгирующей активностью, что обуславливает

Таблица 4. Концентрации нейроактивных аминокислот (мкМ) в культуральной жидкости изолятов, выделенных из палеопочв

Штаммы	Asp	Glu	Gly	Tau	GABA
<i>St. epidermidis</i>	0.214	1.116	0.794	0.007	0.050
<i>St. hominis</i>	0.333	0.316	0.009	0.122	0.070
<i>A. terrae</i>	0.303	0.529	1.025	0.048	0.063
<i>Bacillus</i> sp. II	0.049	0.902	0.477	0.960	0.135
<i>B. coagulans</i>	0.175	0.549	0.746	0.022	0.093
<i>Bacillus</i> sp. I	0.084	0.296	0.446	0.215	0.138

его перспективность для применения в биотехнологиях защиты окружающей среды.

Штамм *Bacillus cereus*, выделенный из образца № 1, привлек наше внимание высоким сходством культурально-морфологических признаков с *B. anthracis* (патоген 2 группы). Штамм был определен методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени “АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT” (\32617-Пр/08 от 09.04.08) в ФИЦ ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. По результатам бактериологического и молекулярно-генетического анализов изолят был идентифицирован как *Bacillus cereus* sub. *cereus*, патогенный для аутобредных белых мышей при внутрибрюшной инокуляции патогена (протокол лабораторных исследований № 16981–16983).

ОБСУЖДЕНИЕ

В общем объеме исследований погребенных почв, относящихся исключительно к компетенции российской науки, изучение микробных сообществ, в основном, велось в аспекте определения численности сохранивших жизнеспособность клеток, их общей биомассы, особенностей морфологии, объяснения возможных механизмов выживания в неростовых условиях в течение длительного времени (Дёмкина и соавт., 2000).

При этом основным направлением исследований была сравнительная характеристика микробной компоненты различных типов палеопочв.

В настоящей работе впервые из образцов палеопочв (возраст XXVIII–XIV вв. до н.э.), отобранных из сосудов с погребальной пищей подкурганых захоронений, выделены в чистую культуру ряд

бактерий, которые по своему таксономическому положению скорее характерны для микрофлоры, связанной с человеком, чем для сапротрофной компоненты почвенных микробных сообществ. Все выделенные изоляты можно отнести к трем физиологическим группам.

Штаммы *St. hominis* и *St. epidermidis* являются типичными контаминантами кожи человека, относящимися к оппортунистическим условным патогенам. Обращает на себя внимание достаточно выраженная способность обоих штаммов синтезировать внеклеточные биогенные амины и аминокислоты (табл. 4, 5). Эта физиологическая активность, хорошо изученная для молочнокислых бактерий и показанная для представителей нормофлоры человека, ставит вопрос о регуляторных функциях внеклеточных нейроактивных аминов и аминокислот в контроле развития условно-патогенных бактерий, в том числе кожных контаминантов человека.

Высокотоксикогенный штамм *Bacillus cereus* sub. *cereus* представляет бактериологический интерес, так как по фенотипическим признакам занимает промежуточное положение между *B. cereus* и *B. anthracis*.

Из выделенных молочнокислых изолятов наиболее интересен штамм *B. coagulans*, характеризующийся высокой синтетической активностью биогенных аминов (табл. 3). Отметим, что все выделенные в чистые культуры изоляты синтезировали дофамин (ДА), но особенно продуктивен был штамм *B. coagulans*. Единственный продуцент серотонина — *Bacillus* sp. II, у остальных штаммов метаболизм триптофана останавливался на стадии образования 5-гидрокситриптофана (5НТР) — предшественника серотонина.

По биологическим свойствам *B. coagulans* занимает промежуточное положение между двумя родами — *Bacillus* и *Lactobacillus* (De Vecchi, 2006; Бомко и соавт., 2016). Ряд свойств объединяют *B. coagulans* с представителями рода *Bacillus*. Для роста микроорганизм использует такие вещества, как углеводы, пептоны, мясо и дрожжевой экстракт. Продуцирует кислоты из моно-, ди- и трисахаридов. Однако ряд характеристик отличает *B. coagulans* от представителей рода *Bacillus*. Как и молочнокислые бактерии, клетки *B. coagulans* имеют изогнутую форму, слабо подвижны, споры расположены терминально. Бактерия продуцирует молочную кислоту, дает отрицательный оксидазный тест, не восстанавливает нитраты до нитритов.

B. coagulans является одним из наиболее полезных пробиотических микроорганизмов. Обладая спорами, она хорошо “переносит технологические процессы”, устойчива к действию желудочного сока и желчи и хорошо развивается в автохтонном сообществе кишечника (Юлиш, Кривушев, 2011),

Таблица 5. Протеолитическая активность выделенных микроорганизмов

Штамм	Тирозин в опыте, мкг/мл	Тирозин в поправке, мкг/мл	ПЕ
<i>A. terrae</i>	72.30	27.70	0.20
<i>Bacillus</i> sp. II	67.34	29.19	0.17
<i>Bacillus</i> sp. I	47.59	30.69	0.07
<i>St. epidermidis</i>	35.65	27.53	0.04
<i>St. hominis</i>	33.54	29.76	0.02

тогда как значительное количество неспорообразующих молочнокислых бактерий погибают по пути от ротовой полости до кишечника (Савустьяненко, 2011). Попадая в двенадцатиперстную кишку, споры *B. coagulans* прорастают в вегетирующие клетки в просвете кишечника человека и оказывают различные пробиотические эффекты (Claus, 2005). *B. coagulans* относится к полурезидентным бактериям: выполнив в организме человека функцию пробиотика, ее клетки переходят в фазу споруляции и покидают организм, выделяясь с фекалиями в виде спор. Как пробиотик *B. coagulans* увеличивает в микрофлоре желудочно-кишечного тракта численность МКБ и вытесняет патогенную флору. Механизмы пробиотического действия этой бактерии — продукция молочной кислоты и бактериоцинов, а также иммуномодулирующее действие за счет стимуляции клеточного и гуморального иммунитета. В последние десятилетия на основе этой бактерии на мировом фармацевтическом рынке появился ряд препара-

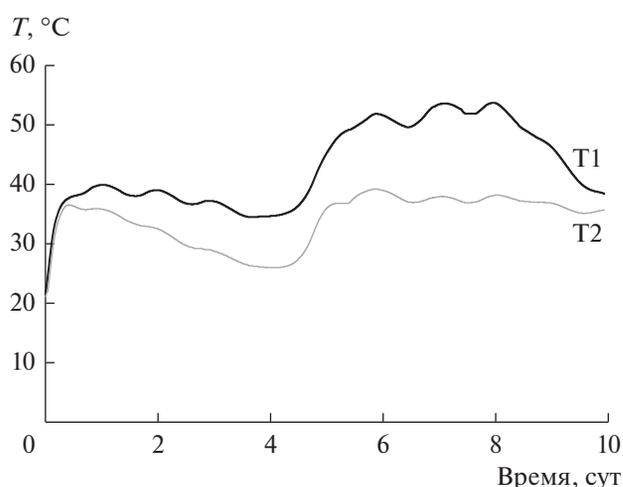


Рис. 4. Динамика температуры компостируемой смеси осадка сточных вод с древесными опилками в опытном варианте с внесением бактерий *A. terrae* (T1) и в контрольном варианте (без внесения бактерий) (T2).

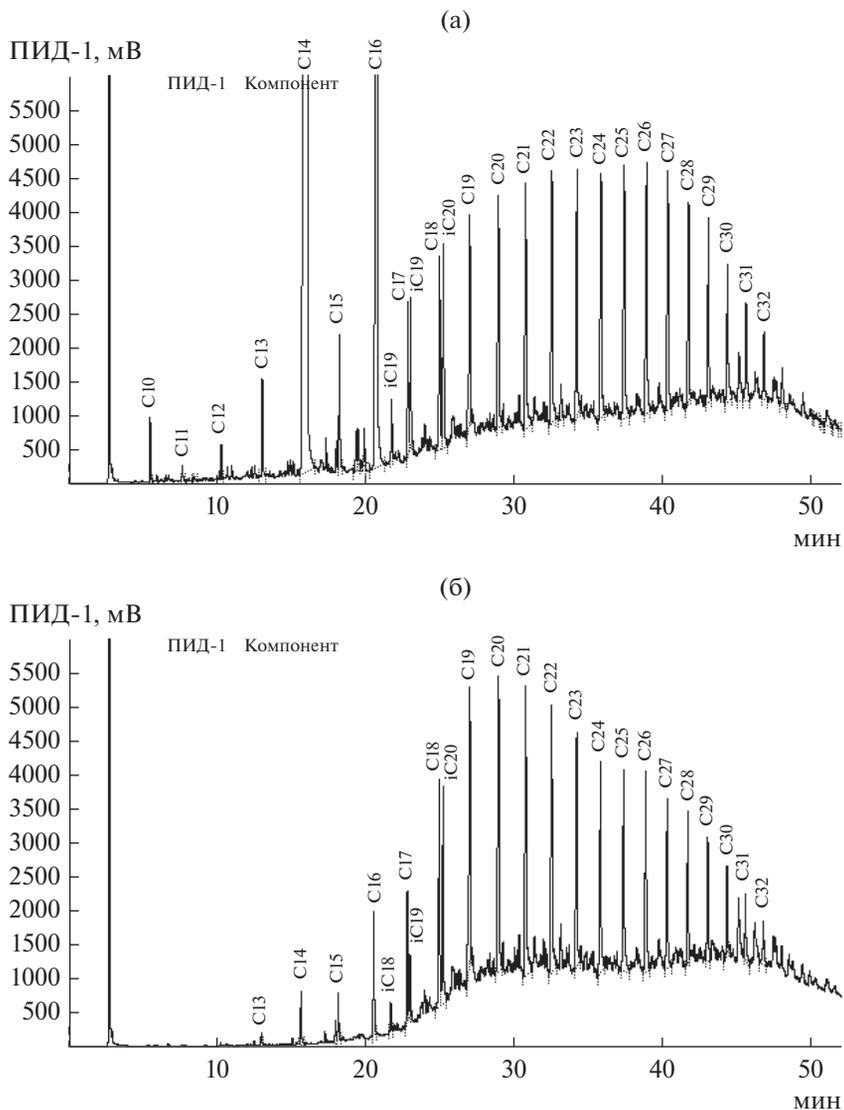


Рис. 5. Хроматограмма фракции насыщенных углеводородов нефти Узеньского месторождения: исходной (а) и деградированной штаммом *A. terraе* (б).

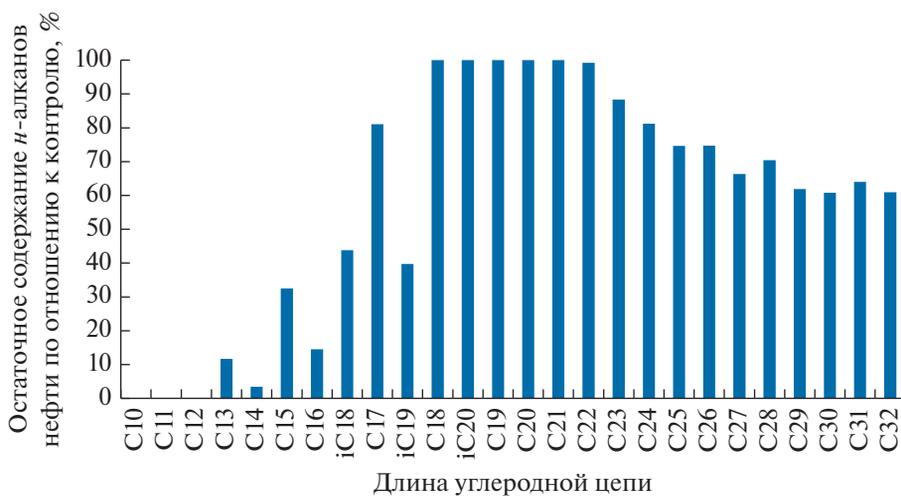


Рис. 6. Остаточное содержание n-алканов нефти Узеньского месторождения после инкубации (7 сут) со штаммом *A. terraе* (% по отношению к 100% контролю).

тов с доказанной клинической эффективностью (FAO/WHO, 2001). Получение новых изолятов этого вида представляет биотехнологический интерес.

Выделенный из палеопочв штамм *A. terrae* обладал интересным сочетанием физиологических свойств: выраженной протеолитической активностью и высокой эмульгирующей способностью. Последнее обуславливает свойство штамма расти на *n*-алканах нефти и других гидрофобных субстратах.

A. terrae – грамтрицательная, неподвижная, палочковидная бактерия, не образует спор, способна как к аэробному, так и анаэробному метаболизму, каталазо- и оксидазоположительная, превращает нитраты в нитриты. Согласно литературным данным, *A. terrae* способен к деградации хлорфенольных и фенольных соединений, что указывает на потенциальную перспективность микроорганизмов этого вида к деградации органических загрязнителей (Kampfger et al., 2009). Первоначально выделенный штамм был депонирован в Gen Bank/EMBL в 2014 году (Zhi-Guo Wu et al., 2014).

В нашем исследовании впервые показана эмульгирующая способность штамма *A. terrae* при росте на углеводородах. Аэробное окисление нефтяных углеводородов микроорганизмами является основным биологическим механизмом трансформации и разложения этих гидрофобных соединений. Ограниченная растворимость углеводородов в воде обуславливает их высокую устойчивость в окружающей среде и, как следствие, низкую биодоступность. Углерододокисляющие микроорганизмы в большей или меньшей степени способны синтезировать внеклеточные поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые взаимодействуют с углеводородами с образованием микроэмульсий. Бактерии используют эту стратегию для преодоления барьера растворимости и увеличения эффективности транспорта углеводородов в клетку для их ассимиляции (Bouchez-Naitali et al., 1999; Van Hamme et al., 2003).

Другое физиологически важное свойство *A. terrae* – его высокая протеолитическая активность, возможно, является штаммовым признаком, так как не отмечалась ранее для этого вида (Zhi-Guo Wu et al., 2014). Проведенные нами лабораторные испытания *A. terrae* в процессе компостирования осадка сточных вод муниципальных очистных сооружений показали эффективность его использования для интенсификации биодеградации органического вещества и обеспечения обеззараживания стоков, что может иметь практический интерес в промышленных технологиях утилизации осадков сточных вод.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют: 1) высокую выживаемость (сохра-

нение жизнеспособности) в палеопочвах подкурганых захоронений бактерий, в том числе контаминантов человека, а также форм, связанных с его культурой, в частности, культурой питания; 2) вероятность реактивации патогенных бактерий, что демонстрирует, например, изоляция високотоксичного штамма *B. cereus*; 3) целесообразность использования таких нетрадиционных источников как палеопочвы для выделения микроорганизмов, перспективных для биотехнологии, на примерах *B. coagulans* и *A. terrae*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания. Эксперименты по изучению углерододокисляющей активности штаммов выполнялись при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных задач по проекту № 18-29-05009 МК.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бомко Т.В., Мартынов А.В., Носальская Т.Н., Каблучко Т.В. “Король пробиотиков”. *Vacillus coagulans* в современном комбинированном пробиотическом препарате “Лактовит Форте” // Annals of Mechnikov Institute. 2016. № 1. С. 17–37.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Вайнштейн М.Б., Кудряшова Е.Б. О наннобактериях // Микробиология. 2000. Т. 69 № 2. С. 163–174.
- Vainshtein M.B., Kudryashova E.B. Nannobacteria // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 129–138.
- Дёмкин В.А., Борисов А.В., Дёмкина Т.С., Хомутова Т.Э., Золотарева Б.Н., Каширская Н.Н., Удальцов С.Н., Ельцов М.В. Волго-Донские степи в древности и средневековье (по материалам почвенно-археологических исследований) // Пушино: SYNCHROBOOK, 2010. 120 с.
- Дёмкин В.А., Дёмкина Т.С., Удальцов С.Н. Реконструкция погребальной пищи в глиняных сосудах из курганных захоронений с использованием фосфатного и микробиологических методов // Вестник археологии, антропологии и этнографии. 2014. № 2 (25). С. 148–159.
- Дёмкин В.А., Лукашов А.В., Ковалевская И.С., Скрипниченко И.И. О возможности историко-социологических

реконструкций при почвенно-археологических исследованиях // Препр. Пушино, 1988. С. 15–16.

Дёмкина Т.С., Борисов А.В., Дёмкин В.А. Микробные сообщества палеопочв археологических памятников пустынно-степной зоны // Почвоведение. 2000. Т. 33. № 9. С. 1117–1126.

Demkina T.S., Demkin V.A., Borisov A.V. Microbial communities in the paleosols of archaeological monuments in the desert-steppe zone // Euras. Soil Sci. 2000. V. 33. P. 978–986.

Дёмкина Т.С., Борисов А.В., Дёмкин В.А. Микробиологические исследования подкурганных палеопочв пустынно-степной зоны Волго-Донского междуречья // Почвоведение. 2004. Т. 37. № 7. С. 853–859.

Demkina T.S., Borisov A.V., Demkin V.A. Microbiological study of paleosols buried under kurgans in the desert-steppe zone of the Volga-Don interfluvium // Euras. Soil Sci. 2004. V. 37. P. 743–748.

Дёмкина Т.С., Борисов А.В., Ельцов М.В., Дёмкин В.А. Сравнительная характеристика микробных сообществ курганных насыпей, подкурганных и современных почв степной зоны Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2007. Т. 40. № 6. С. 738–748.

Demkina T.S., Borisov A.V., Eltsov M.V., Demkin V.A. Comparative characterization of microbial communities in kurgans, paleosols buried underneath, and background surface soil in the steppe zone of the lower Volga region // Euras. Soil Sci. 2007. V. 40. P. 665–674.

Захарова А.М., Карцова Л.А., Гринштейн И.Л. Определение органических кислот, углеводов, подсластителей в пищевых продуктах и биологически активных добавках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 2. С. 204–210.

Каширская Н.Н., Хомутова Т.Э., Дмитриев В.В., Дуда В.И., Сузина Н.Е., Дёмкин В.А. Морфология клеток и биомасса микроорганизмов подкурганных и современных степных почв Нижнего Поволжья // Почвоведение. 2010. Т. 43. № 10. С. 1229–1238.

Kashirskaya N.N., Khomutova T.E., Demkin V.A., Dmitriev V.V., Duda V.I., Suzina N.E. The morphology of the cells and the biomass of the microorganisms in the buried paleosols and modern steppe of the lower Volga Region // Euras. Soil Sci. 2010. V. 43. P. 1229–1238.

Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Манучарова Н.А., Соина В.С., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 474–485.

Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Galchenko V.F., El-Registan G.I., Manucharova N.A., Soina V.S. Reactivation of dormant and nonculturable bacterial forms from paleosols and subsoil permafrost // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 435–445.

Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Баслеров Р.В., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 27–41.

Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Baslerov R.V., Kolganova T.V., Soina V.S., Manucharova N.A., Galchenko V.F., El-Registan G.I. Comparison of the adaptive potential of the *Arthrobacter oxydans* and *Acinetobacter lwoffii* isolates from permafrost sedimentary rock and the analogous collection strains // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 29–42.

Манучарова Н.А., Трошева Е.В., Кольцова Е.М., Дёмкина Е.В., Караевская Е.В., Ривкина Е.М., Марданов А.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика структуры прокариотного комплекса многолетнемерзлых грунтов Антарктиды на основании данных молекулярно-биологических методов // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 83–91.

Manucharova N.A., Troshcheva E.V., Kol'tsova E.M., Demkina E.V., El-Registan G.I., Karaevskaya E.V., Rivkina E.M., Mardanov A.V. Characterization of the structure of the prokaryotic complex of the Antarctic permafrost by molecular genetic techniques // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 102–108.

Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Борзенков И.А., Биджиева С.Х., Меркель А.Ю., Хуса-метдинов М.Р., Турова Т.П. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов осадка биогазового реактора, перерабатывающего нефтесодержащие и муниципальные отходы // Микробиология. 2018. Т. 87. № 3. С. 314–324.

Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Semenova E.M., Borzenkov I.A., Bidzhiyeva S.Kh., Merkel A.Yu., Khisametdinov M.R., Tourova T.P. Phylogenetic diversity of microorganisms from the sludge of a biogas reactor processing oil-containing and municipal waste // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 416–424.

Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Уч. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Академия, 2005. 105 с.

Олескин А.В., Жиленкова О.Г., Шендеров Б.А., Амерханова А.М., Кудрин В.С., Клодт П.М. Заквасочные культуры лактобацилл – продуценты нейромедиаторов: биогенных аминов и аминокислот // Молочная промышленность. 2014. № 9. С. 42–43.

Олескин А.В., Эль-Регистан Г.И., Шендеров Б.А. Межмикробные химические взаимодействия микробиоты-хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 3–25.

Oleskin A.V., El-Registan G.I., Shenderov B.A. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: “Business talks” among microorganisms and the microbiota-host dialogue // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 1–22.

Раевский Д.С. Модель мира скифской культуры. М.: Наука, 1985. 255 с.

Савустьяненко А.В. Применение пробиотика *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*) в клинической практике врача // Новости медицины и фармации. 2011. № 8 (362). С. 1–3.

Фролов Ю.Г., Гродский А.С. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии. М.: Химия, 1986. С. 216.

Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорга-

- низмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Galchenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I.* Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Юлиш Е.И., Кривушев Б.И.* Проблемы дисбактериоза кишечника и методы его коррекции // Здоровье ребенка. 2011. № 7 (34). С. 1–4.
- Adkins J.P., Cornell L.A., Tanner R.S.* Microbial composition of carbonate petroleum reservoir fluids // Geomicrobiol. J. 1992. V. 10. P. 87–97.
- Atlas R.M., Cerniglia C.E.* Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation // BioScience. 1995. V. 45. P. 332–338.
- Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P.* Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // Appl. Microbiol. 1999. V. 86. P. 421–428.
- Claus D., Berkeley R.C.W.* Genus *Bacillus* Cohn 1872 // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. P. 1105–1139.
- Demkina T.S., Khomutova T.E., Kashirskaya N.N., Demkina E.V., Stretovich I.V., El-Registan G.I., Demkin V.A.* Age and activation of microbial communities in soils under burial mounds and in recent surface soils of steppe zone // Euras. Soil Sci. 2008. V. 41. P. 1439–1447.
- De Vecchi E.* *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? // Int. J. Probiot. Prebiot. 2006. V. 1. P. 3–10.
- FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria // FAO/WHO 2001.
- Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. № 41. P. 95–98.
- Petric I., Helic A., Avdic E.A.* Evolution of process parameters and determination of kinetics for co-composting of organic fraction of municipal solid waste with poultry manure // Bioresource Technol. 2012. V. 117. P. 107–116.
- Kampfer P., Martin E., Lodders N., Jakel U.* Transfer of *De-fluvibacter lusatiensis* to the genus *Aquamicrobium* as *Aquamicrobium lusatiense* comb. nov. and description of *Aquamicrobium aerolatum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 2468–2470.
- Katoh K., Asimeno G., Toh H.* Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT // Meth. Mol. Biol. 2009. V. 537. P. 39–64.
- Mironov V.V., Ivanov Y.A.* Test results In-vessel composting system at the cattle farm located in the central part of Russia // Agricultural Mechanization in Asia, Africa, and Latin America. 2018. V. 49. № 3. P. 86–90.
- Pfennig N., Lippert K.D.* Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Arch. Mikrobiol. 1966. V. 55. P. 245–256.
- Petiot C., De Guardia A.* Composting in a laboratory reactor: a review // Compost Sci. Utilizat. 2004. V. 12. P. 69–79.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nuesslein K., Marsh T.L., Flynn S.J.* Opening the black box of microbial diversity // Appl. Soil Ecol. 1999. V. 13. P. 109–122.
- Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P.* Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. 2003. V. 67. P. 503–549.
- Zajic J.E., Guignard H., Gerson D.F.* Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus* // Biotechnol. Bioeng. 1977. V. 19. P. 1303–1320.
- Zhi-Guo Wu, Fang Wang, Cheng-Gang Gu, Yin-Ping Zhang, Zong-Zheng Yang, Xiao-Wei Wu, Xin Jiang.* *Aquamicrobium terrae* sp. nov., isolated from the polluted soil near a chemical factory // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. V. 105. P. 1131–1137.
- Zorpas A.A., Loizidou M.* Sawdust and natural zeolite as a bulking agent for improving quality of a composting product from anaerobically stabilized sewage sludge // Bioresource Technol. 2008. V. 99. P. 7545–7552.

Buried Soils as a New Source for Isolation of Biotechnologically Significant Bacterial Strains

E. V. Demkina^{1, *}, E. V. Doroshenko², T. L. Babich¹, V. V. Mironov¹, A. V. Borisov³,
T. S. Demkina³, and G. I. El'-Registan¹

¹Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: elenademkina@mail.ru

Received February 16, 2019; revised February 25, 2019; accepted March 29, 2019

Abstract—Investigation of molecular genetic diversity in paleosol microbial communities revealed that ~50% of ancient ribotypes were not detected among the ribotypes of the modern microbial communities. Thus, re-activation of ancient microorganisms and investigation of their physiological properties as potentially valuable producers for biotechnology is advisable. The proteolytic bacterial component of paleosoils below burial mounds collected from the vials with votive food at the Peschanyi-4 and Netkachevo burial mounds (15–16 centuries BC) (Volgograd and Rostov oblasts, Russia) was investigated. Viable cell numbers of heterotro-

phic bacteria in reactivated samples were $(1.5–16.0) \times 10^7$ CFU/g soil (growth on LB agar). Using alternating inoculation into liquid media and plating on solid media resulted in isolation of pure cultures of several strains, which were then identified based on analysis of their 16S rRNA gene sequences. Strains of the following species were isolated: *Bacillus coagulans* (*Lactobacillus coagulans*), a potentially valuable probiotic; *Aquamicrobium terrae*, a proteolytic producing surfactants and degrading organic matter; *Bacillus cereus*, the strain toxicogenic for outbred white mice at intra-abdominal application; *Staphylococcus hominis* and *St. epidermidis*, opportunistic pathogens belonging to normal human skin microflora. Apart from *Bacillus cereus*, all strains exhibited high production of neuroactive amines (DOPA, DOPAC, DA, 5-HTP, HVA, and 3-MT) and amino acids (Asp, Glu, Gly, Tau, and GABA). The strains isolated from the vials with votive food were mostly those associated with humans, rather than typical members of soil microbial communities.

Keywords: buried soils, votive food, proteolytic bacteria, lactic acid bacteria, opportunistic pathogens belonging to the normal human microflora, neuroactive amines