

УДК 579.24, 579.222

UDC 579.24, 579.222

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА И ДИНАМИКИ АМИНОКИСЛОТ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ В СРЕДУ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ВЫРАЩИВАНИЯ *ESCHERICHIA COLI* И *SALMONELLA ENTERITIDIS*

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE COMPOSITION AND DYNAMICS OF THE AMINO ACIDS EXTRACTING BY BACTERIA INTO THE CULTURE MEDIUM BY EXAMPLE OF THE CULTIVATION *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA ENTERITIDIS*

Полевая Елена Валерьевна
аспирант

Polevaya Elena Valerevna
postgraduate student

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия

Saint-Petersburg state chemical pharmaceutical academy, Saint-Petersburg, Russia

Вахитов Тимур Яшеревич
д.б.н

Vakhitov Timur Yasherovich
Dr.Sci.Biol.

Шалаева Ольга Николаевна
н.с.

Shalaeva Olga Nicolaevna
scientist

Берсон Юлия Михайловна
студент

Berson Yuliya Mikhaylovna
student

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Россия, 197110, Санкт-Петербург, ул.Пудожская, д.7 len-na_22@mail.ru

State research institute of highly pure biopreparations, Saint-Petersburg, Russia

В процессе выращивания на глюкозо-минеральной среде *Escherichia coli* M-17, O75, №14 и VL 613 и *Salmonella enteritidis* выделяют аминокислоты, состав и динамика которых зависит от видовой и штаммовой принадлежности. Общая концентрация аминокислот для пробиотических штаммов оказалась выше, чем для условно-патогенных. Сравнительный анализ динамики аминокислот с их способностью влиять на рост бактерий, позволяет полагать, что аминокислоты выполняют определенные регуляторные функции

During cultivation in the glucose-mineral medium, *Escherichia coli* M-17, O75, № 14 and VL 613 and *Salmonella enteritidis* excrete amino acids, their composition and dynamics depend on the species and the strain identity. The total concentration of the amino acids for probiotic strains was higher than opportunistic. Comparative analysis of the amino acids to their ability to influence the growth of bacteria, suggests that amino acids are carry out certain regulatory functions

Ключевые слова: АМИНОКИСЛОТЫ, ПРОБИОТИЧЕСКИЕ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ ШТАММЫ, РОСТ, ДИНАМИКА МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ

Keywords: AMINOACIDS, PROBIOTIC AND OPPORTUNISTIC STRAINS, GROWTH, DYNAMICS OF BACTERIAL METABOLITES

Ранее нами был исследован качественный и количественный состав низкомолекулярных карбоновых кислот, выделяемых в процессе роста четырьмя штаммами *E.coli* и одним штаммом *S. enteritidis* var. *Issatchenko*. Показано, что состав кислот, их динамика в процессе роста бактерий, а также общая концентрация в культуральной жидкости являлись штаммоспецифической характеристикой [1].

Известно, что аминокислоты также выделяются в процессе роста многими бактериями и обладают регуляторными функциями [2, 3, 4], однако сведения об их динамике в литературе практически отсутствуют. Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение состава и динамики аминокислот, выделяемых близкородственными бактериями в среду культивирования, и сопоставление полученных данных со способностью этих аминокислот стимулировать или ингибировать рост *E.coli* и *S. enteritidis*.

Материалы и методы

Культуры бактерий. Объектами исследования служили пробиотические штаммы: *Escherichia coli* M-17 (производственный штамм пробиотика «Колибактерин»), *E. coli* K-12 VL 613 (штамм, улучшающий усвояемость кормов сельскохозяйственных животных) и условно-патогенные бактерии (УПБ): *E. coli* O75 №5557, *E. coli* №14, *Salmonella enteritidis* var.*Issatchenko* (патогенный для грызунов). Все штаммы поддерживали в коллекции ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России.

Условия культивирования. Криоконсервированную культуру пересевали на чашки Петри с агаризованной средой (LB-агар) и выращивали в течение 18 – 20 часов при 37°C. Клетки смывали 0,85 % раствором хлорида натрия и засевали в глюкозо-минеральную среду М-9 (0,4 % глюкозы, 0,005 % никотиновой кислоты) в концентрации, соответствующей 0,2 – 0,3 единицам оптической плотности по 100 мл в 0,75 л колбы. Культивирование проводили на качалке («Gerhardt», Германия) с постепенным увеличением оборотов от 150 до 200 при 37°C до стационарной фазы роста. Конечная плотность культуры обычно составляла 3 – 6 ед. D₄₆₀. Выращенную культуру засевали в свежую среду М-9. Культивирование проводили аналогично тому, когда посевным материалом служил смыв с агаризованной среды.

Эксперименты проводили в 3 –кратных повторностях.

Контроль роста культур бактерий. Контроль роста осуществляли по оптической плотности, которую измеряли на спектрофотометре UV-mini ("Shimadzu", Япония) на длине волны 460 нм (D_{460}) в односантиметровой кювете. Каждый час, начиная с момента засева, отбирали пробы, центрифугировали при 3000 г в течение 10 минут при 4 °С. Супернатант фильтровали через фильтр Millipore 0,45μ и хранили при -7°С.

Хроматографический анализ аминокислот. Анализ аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) дабсильных производных аминокислот на специализированной колонке Luna 5u C18(2) 100A 250×4,6 мм («Phenomenex», США) в ступенчатом градиенте ацетонитрила и буферного раствора солей KH_2PO_4 и $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$ (рН 7,0 в концентрации 0,02М) со скоростью потока 1,8 мл/мин при температуре 45°С. Соотношение элюентов (100% ацетонитрил:буферный раствор солей) в зависимости от времени элюирования (минуты): 0мин.-77:23; 6-77:23; 7-73:27; 18-71:29; 23,5-62:38; 33,5-27,5:72,5; 34-77:23. Установка ВЭЖХ состояла из насоса LAB-20 («Shimadzu», Япония), термостата и блока измерения Uvicord SD («LKB», Швеция). Результаты регистрировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения «МультиХром». Все использованные реактивы имели соответствующую квалификацию (осч).

Получение дабсильных производных аминокислот. К 100 мкл фильтрата культуральной жидкости добавляли 40 мкл триэтиламина (99%, «Sigma», США). Образец досуха высушивали при 65 °С под вакуумом. Нагрев осуществлялся на платформе термостата (Ultrolab System incubator 2073, «LKB», Швеция) под колпаком, вакуум в котором создавался с помощью водоструйного насоса. Высушенный образец растворяли в равном объеме 0,2 М бикарбоната натрия (99,5 %, «Sigma», США) и центрифугировали (8000 об/мин, 3 мин.). Для получения дабсильных производных аликвоту полученного раствора смешивали с раствором DABS-Cl

в ацетонитриле (1,3 мг/мл, 4-Dimethyl- aminoazobenzen-4-sulfonyl chloride, «Sigma», США) в соотношении 1:1. Полученную смесь термостатировали при 65 °С в течение часа, затем центрифугировали (8000 об/мин, 1 мин), разбавляли 1:1 деионизованной водой, интенсивно перемешивали и вновь центрифугировали (8000 об/мин, 1 мин). Оптическую плотность производных регистрировали на длине волны 436 нм.

Идентификация и определение концентрации аминокислот. Идентификацию аминокислот осуществляли на основе сравнения их времен удерживания с временами удерживания аминокислот, входящих в стандарт «Amino Acid Standard» (A2161, «Sigma», США). Концентрация аминокислот в исследуемой пробе определялась по формуле:

$$c(\text{проба}) = \frac{h(\text{проба}) \times c(\text{стандарт})}{h(\text{стандарт})} ;$$

где $c(\text{проба})$ – концентрация аминокислоты в пробе, мМ, $h(\text{проба})$ и $h(\text{стандарт})$ – высота пиков аминокислоты в пробе и в стандарте, mV , $c(\text{стандарт})$ – концентрация пробы в стандарте, мМ [5].

В таблицах и на рисунках приведены средние величины. Значения в таблице 1 являются максимальными концентрациями аминокислот, выделяемых культурами при засеве смывом с плотной среды и пересеве с жидкой среды.

Для всех вычислений использовали программное обеспечение MS Excel.

Результаты и обсуждение

Состав и количество аминокислот. Показано, что исследуемые близкородственные штаммы даже при выращивании в идентичных условиях выделяют специфический для каждого из них набор аминокислот.

Максимальная концентрация пула выделяемых аминокислот для пробиотических штаммов M-17 и VL613 оказалась выше, чем для УПБ, причем наименьшее количество аминокислот выделяли штаммы *E.coli* №14 и

S. enteritidis. Возможно, что пониженный уровень выделения аминокислот вообще характерен для патогенных штаммов, метаболизм которых ориентирован на негативное воздействие на организм хозяина, в то время как метаболизм пробиотических бактерий во многом связан с обеспечением хозяина «полезными» метаболитами, в том числе и аминокислотами.

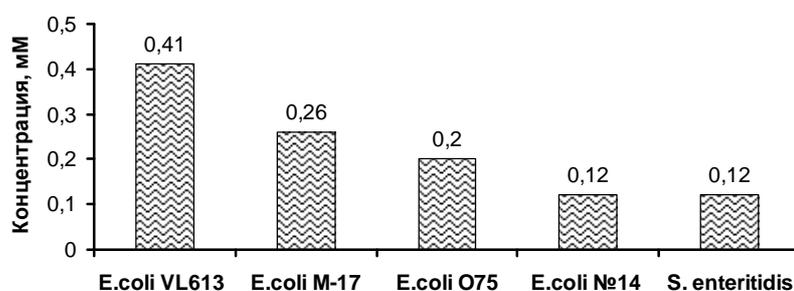


Рисунок 1. Общая максимальная концентрация аминокислот, выделяющихся бактериями *E.coli* и *S. enteritidis* в процессе культивирования, мМ.

Отличительной чертой пробиотических штаммов *E.coli* M-17 и VL613 являлось выделение в среду метионина. Ранее было показано, что внеклеточный метионин ингибирует рост условно-патогенных эшерихий и, напротив, стимулирует рост пробиотического штамма M-17 [6]. Это позволяет полагать, что метионин является неспецифическим фактором антагонизма пробиотических бактерий. Кроме того, оба пробиотических штамма отличались повышенным выделением глицина, аланина, валина и тирозина.

Другой особенностью *E.coli* M-17 являлось выделение значительного количества цистеина, а штамма VL613 – повышенное выделение серина, аргинина, изолейцина и лейцина (табл.1).

Условно-патогенный штамм *E.coli* O75 выделял больше других штаммов гистидина, лизина и треонина, в то время как концентрация серина в его среде была минимальной (табл.1). Для штамма №14 было характерно повышенное выделение глутаминовой кислоты, остальных аминокислот он выделял меньше других бактерий.

Таблица 1. Максимальное содержание аминокислот в культуральной жидкости *E.coli* и *S. enteritidis*, мМ.

Аминокислота	<i>E.coli</i> M-17	<i>E.coli</i> O75	<i>E.coli</i> VL613	<i>E.coli</i> №14	<i>S. enteritidis</i>
аспарагиновая	0,010	0,009	-	0,009	0,014
глутаминовая	0,026	-	-	0,045	-
серин	0,006	0,004	0,049	-	0,006
аргинин	-	-	0,068	0,014	-
треонин	0,012	0,042	0,039	0,002	-
глицин	0,034	0,013	0,022	0,013	0,005
аланин	0,082	0,024	0,043	0,014	0,018
пролин	0,005	0,006	-	0,002	0,001
валин	0,025	0,011	0,022	0,006	0,019
метионин	0,003	-	0,015	-	-
изолейцин	0,005	0,004	0,016	0,001	0,005
лейцин	0,005	0,008	0,017	0,002	0,011
фенилаланин	0,002	0,004	0,004	0,002	0,002
цистеин	0,123	0,023	0,017	-	-
лизин	0,003	0,063	0,029	-	0,005
гистидин	0,038	0,127	0,095	0,024	0,01
тирозин	0,099	0,076	0,194	0,072	0,087

Примечание. Прочерк – не обнаружено.

Анализ динамики аминокислот. Наиболее продуктивным подходом при обсуждении результатов является сопоставление динамики аминокислот с их способностью влиять на рост штамма-продуцента. В таблице 2 обобщены данные, полученные нами ранее [4, 7] при изучении влияния аминокислот на рост исследованных штаммов.

Таблица 2. Влияние аминокислот на рост *E.coli* и *S. enteritidis*.

Аминокислота	<i>E.coli</i> M-17	<i>E.coli</i> O75	<i>E.coli</i> VL613	<i>E.coli</i> №14	<i>S. enteritidis</i>
аспарагиновая	-	+	+	+	-
глутаминовая	+	+	+	+	+
серин	-	+	-	+	+
аргинин	-	+	-	0	+
треонин	+	+	0	0	0
глицин	-	+	-	+	+
аланин	0	0	-	0	+
пролин	+	+	0	0	+
валин	+	+	+	+	+
метионин	+	-	-	+	+
изолейцин	+	-	0	0	+
лейцин	+	+	0	+	+
фенилаланин	+	+	+	+	+

цистеин	0	-	-	-	-
лизин	+	0	-	+	+
гистидин	+	-	+	0	+
тирозин	+	+	0	+	+

Примечание. «+» – стимулятор роста, «-» – ингибитор роста, «0» – не оказывает влияние на рост.

Общая концентрация аминокислот в среде при выращивании энтеробактерий значительно ниже уровня карбоновых кислот, однако и те, и другие выделяются клетками сразу после их засева в свежую среду [1].

После внесения посевного материала *E.coli* М-17 в среде культивирования были обнаружены изолейцин, лейцин, гистидин и цистеин (рис. 1 б и в). Из таблицы 2 видно, что первые три аминокислоты являются стимуляторами роста штамма М-17. Это позволяет предположить, что их выделение способствовало адаптации культуры к новым условиям. Цистеин не оказывает влияния на рост *E.coli* М-17, однако способствует понижению окислительно-восстановительного потенциала среды, что также необходимо для инициации ростовых процессов [6].

С первых часов роста во внеклеточной среде начинал накапливаться лизин, максимальная концентрация которого наблюдалась ко 2-му часу культивирования, что соответствует началу роста (рис. 1 в). Согласно таблице 2 лизин является стимулятором роста штамма М-17, поэтому максимум его концентрации в этот момент вполне объясним. При переходе на экспоненциальную фазу роста, к 4-му часу культивирования, концентрации лизина и цистеина снижались практически до нуля, что, вероятно, способствовало адаптации *E.coli* М-17 к данным условиям культивирования (рис. 1 в, и).

Процесс поглощения лизина и цистеина завершался приблизительно в середине роста. Сразу после этого *E.coli* М-17 экскретировала в среду

треонин и глицин. Причем для треонина, являющегося стимулятором роста, отмечалось пиковое изменение концентрации: его выброс резко сменялся поглощением. Возможно, это служило сигналом для последующего выделения в среду одновременно шести других стимуляторов роста: глутаминовой кислоты, пролина, валина, лейцина, фенилаланина, тирозина и двух ингибиторов роста: аспарагиновой кислоты и серина (4-5 часы культивирования на рис. 1 г, д, е). Весьма показательно, что выделение всех этих аминокислот совпадало с максимальной скоростью роста культуры.

При замедлении роста *E.coli* M-17 концентрация большинства выделенных аминокислот падала до нуля, но, в то же время, в среде вновь появлялся цистеин, и резко увеличивалась концентрация глицина (6 час на рис.1 б, г). Возможно, глицин служил сигналом к остановке роста культуры, так как по имеющимся предварительным данным [6] он является фактором апоптоза *E.coli* M-17. Это подтверждается и тем, что концентрация глицина изменялась в противофазе с концентрациями стимуляторов роста: глутаминовой кислотой и метионина (рис.1 г).

При переходе *E.coli* M-17 с фазы замедленного роста на стационарную фазу для большинства аминокислот наблюдались резкие концентрационные изменения (рис.1). Эти аминокислоты сначала выделялись клетками в среду культивирования, а затем вновь поглощались. Весьма показательно, что подобный выброс и быстрый обратный захват обычно характерен для соединений, выполняющих регуляторные функции (например, участвующих в передаче синаптического сигнала между нейронами).

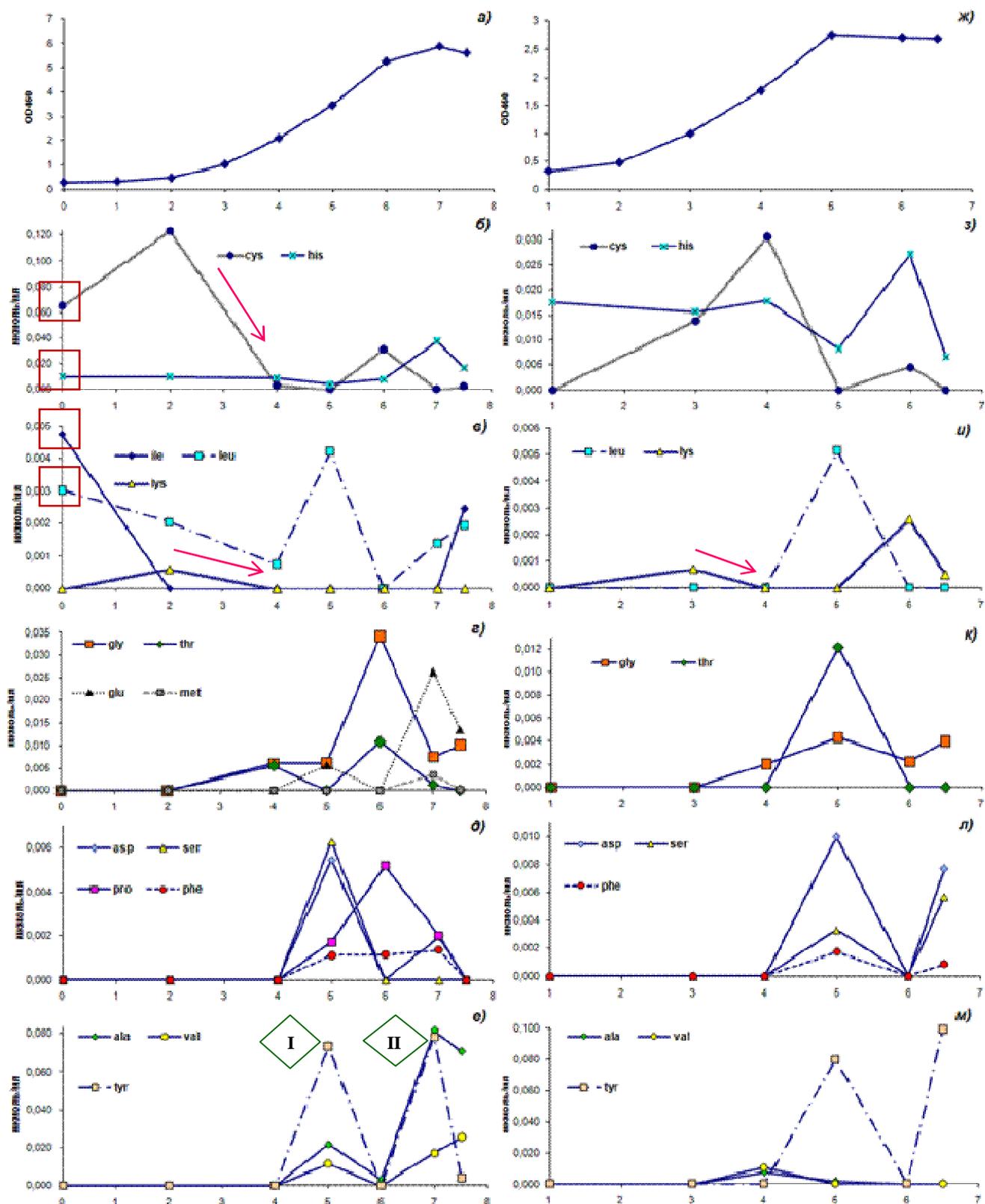


Рисунок 2. Динамика роста и выделения аминокислот штаммом *E. coli* M-17. а и ж – кривые роста. Левые графики соответствуют засеvu с плотной среды, правые – пересеву с жидкой среды.

Некоторые аминокислоты имели один концентрационный пик, другие «выбрасывались» в среду дважды: на стадии подготовки к стационарной фазе – I пик и непосредственно при переходе на нее – II пик (например, два пика стимулятора роста тирозина на рисунке 1 е). При этом подобные изменения концентрации наблюдались независимо от того, засеивалась культура с плотной или с жидкой среды (рис.1 левые и правые графики).

Некоторые аминокислоты могли монотонно выделяться или потребляться культурой на протяжении всего периода подготовки к стационарной стадии. На рисунке 1 б) и д) видно, что штамм М-17 постепенно накапливал стимуляторы гистидин и фенилаланин, а на рисунке 1 м) – потреблял нейтральный аланин.

Таким образом, в процессе роста *E.coli* М-17 выявлены следующие особенности динамики внеклеточных аминокислот:

- выделение аминокислот непосредственно после внесения посевного материала (см. рис.1 б и в);
- поглощение аминокислот в начале фазы экспоненциального роста (см. рис. 1 б, в, и);
- пиковое выделение аминокислот при переходе с фазы замедленного роста на стационарную фазу (пики I и II на рисунке 1 е).

Для других энтеробактерий была характерна схожая динамика аминокислот. Из таблицы 3 видно, что для всех штаммов общими аминокислотами при засеивании являлись лейцин и изолейцин. Эти аминокислоты обладали стимулирующим действием, либо не оказывали влияния на рост штаммов продуцентов.

Характерным признаком УПБ являлось выделение сразу после засеивания стимуляторов роста – валина и фенилаланина. Кроме того, в среде *S.enteritidis* была обнаружена аспарагиновая кислота. Штамм *E.coli* O75, в отличие от остальных штаммов, не выделял гистидин. Это хорошо согла-

суется с данными таблицы 2, где видно, что гистидин ингибировал рост исключительно *E.coli* O75.

Для пробиотических штаммов, М-17 и VL613, было характерно выделение серусодержащих аминокислот: метионина и цистеина. Особенностью штамма VL613 являлась экскреция тирозина, который, однако, сам по себе не стимулировал рост этой энтеробактерии, но, возможно, был необходим для проявления активности других соединений.

Таблица 3. Аминокислоты, выделяющиеся *E.coli* и *S. enteritidis* непосредственно при внесении посевного материала.

Штамм	Аминокислоты											
						иле	лей		цис		гис	
М-17												
VL613					мет	иле	лей			лиз	гис	тир
O75		ала	про	вал		иле	лей	фен				
№14				вал		иле	лей	фен			гис	
S.enter.	асп			вал		иле	лей	фен		лиз	гис	

Пробиотические и УПБ различались и по набору аминокислот, потребляемых в начале фазы экспоненциального роста (табл.4). Так условно-патогенные *E.coli* O75 и №14 поглощали все присутствующие в среде аминокислоты, являющиеся стимуляторами их роста либо нейтральными соединениями. Аналогично *S.enteritidis* потребляла практически все аминокислоты-стимуляторы, однако не поглощала аспарагиновую кислоту, которая является ингибитором ее роста.

Некоторые аминокислоты появлялись в среде через 1-2 часа после засева, затем их концентрация резко повышалась и практически сразу падала, причем такая динамика была характерна только для стимуляторов и нейтральных соединений, но не для ингибиторов роста. Пиковые выделения аминокислот в начале фазы экспоненциального роста были характерны только для пробиотических культур и условно-патогенного штамма №14. Как видно из таблицы 4, отличительной чертой штамма VL613 являлось пиковое изменение концентрации изолейцина, М-17 – цистеина и лизина, а *E.coli* №14 – аргинина и лейцина.

Таблица 4. Аминокислоты, потребляющиеся *E.coli* и *S. enteritidis* в начале фазы экспоненциального роста.

Штаммы	Аминокислоты										
М-17						иле	лей		<i>цис</i>	<i>лиз</i>	
VL613					мет	<i>иле</i>	лей			лиз	гис
O75		ала	про	вал		иле	лей	фен			
№14	<i>арг</i>			вал		иле	<i>лей</i>	фен			гис
<i>S.enter.</i>				вал		иле	лей	фен		лиз	

Примечание. Курсивом отмечены аминокислоты, для которых характерны пиковые изменения концентрации.

Существенные различия в динамике аминокислот отмечались и во второй половине роста, которая также характеризовалась концентрационными пиками аминокислот. Как видно из таблицы 5 для всех микроорганизмов на стационарной фазе роста отмечались пиковые концентрации пролина, являющегося стимулятором роста штаммов М-17 и O75 и не влияющим на рост остальных бактерий.

Отличительной чертой штамма VL613 являлось пиковое выделение преимущественно ингибиторов роста, для *E. coli* М-17, O75 и *S. enteritidis*, напротив, преобладали пики стимуляторов, а, в случае штамма №14 – нейтральных аминокислот.

Как уже отмечалось, для одних культур было характерно два пика аминокислот, для других только один. Так, из таблицы 5 видно, что для пробиотического штамма М-17 было характерно два пика аспарагиновой кислоты, а для УПБ *E. coli* O75 и №14 – один, только на стационарной фазе роста. Ранее считалось, что аспарагиновая кислота является основным регулятором роста *E. coli* на плотных средах. Она стимулировала рост бактерий и, как предполагалось, способствовала образованию упорядоченных клеточных структур в процессе развития колоний [8]. В наших экспериментах было показано, что аспарагиновая кислота не является «универсальным» стимулятором роста *E. coli* и может, как стимулировать (*E. coli* O75 и №14), так и подавлять (*E. coli* М-17) рост отдельных штаммов [6].

Особенностью пробиотического штамма VL613 являлось наличие двух пиков серина, тогда как для *E.coli* O75 и *S.enteritidis* его концентрация изменялась монотонно. Следует отметить, что серин ингибировал рост пробиотиков и, напротив, стимулировал УПБ (табл.2).

В свою очередь и между пробиотическими культурами выявлены определенные различия. Так, резкие изменения концентраций метионина и цистеина для штамма M-17 обычно наблюдались при подготовке и переходе на стационарную фазу роста, а для VL613 – только в первом случае. Ранее было показано, что эти серусодержащие аминокислоты ингибируют рост *E. coli* VL613 и, напротив, стимулируют (метионин) или не влияют (цистеин) на инициацию роста M-17.

Из таблицы 5 видно, что *E.coli* M-17 выделяла в среду стимулятор роста треонин два раза, а штаммы VL613 и O75 только один раз. Кроме того, в отличие от штамма M-17, для *E.coli* VL613 и *S.enteritidis* отмечалось более раннее пиковое выделение глицина.

Таблица 5. Пиковое выделение аминокислот во второй половине роста.

Штамм	Пик	засев с плотной среды										засев с жидкой среды									
		асп	глу	сер	тре	ала	вал	лей	тир	цис	гис	ала	вал	цис	тре	гис	лей	фен	лиз	гис	тир
M-17	I	асп	глу	сер	тре	ала	вал	лей	тир	цис	гис	ала	вал	цис	тре	гис	лей	фен	лиз	гис	тир
	II	асп	глу	гис	тре	ала	про	мет	тир	цис	гис	асп	сер	тре	гис	лей	фен	лиз	гис	тир	
VL613	I	сер	арг	тре	гис	ала	мет	иле	цис	гис	сер	мет	гис	лиз							
	II	лей									сер	вал	гис	лей	тир						
O75	I	тре	вал	цис																	
	II	асп	гис	ала	про	фен	фен	лиз			ала	вал									
№14	I										арг										
	II	асп	тре	про	гис	тир					асп	ала	вал	гис							
S.enter	I	ала	вал								гис	ала	вал								
	II	про	гис	тир																	

Таким образом, состав выделяемых аминокислот являлся индивидуальным для каждого из исследованных штаммов. Некоторые аминокислоты выделялись большинством бактерий, другие, напротив, выделялись только определенными штаммами. При этом были обнаружены различия, характерные только для пробиотических и только для условно-патогенных бактерий. Так, пробиотические штаммы выделяли в среднем в 3 раза

больше аминокислот, чем УПБ. Аналогичная закономерность была выявлена ранее и для карбоновых кислот.

Исследованные штаммы энтеробактерий различались не только по составу аминокислот, но и по их динамике. Прежде всего, следует отметить, что при анализе аминокислотного состава внеклеточной среды нельзя опираться на данные, полученные в какой-то определенный момент культивирования, поскольку аминокислоты выделяются и поглощаются культурой на разных стадиях роста в течение всего процесса выращивания.

Почасовой аминокислотный анализ показал, что непосредственно после засева УПБ выделяли валин и фенилаланин (стимуляторы их роста), а пробиотические бактерии *E.coli* M-17 и VL613 – серусодержащие аминокислоты: метионин и цистеин. Вторая половина роста характеризовалась концентрационными пиками аминокислот. Отличительной чертой штамма VL613 являлось пиковое выделение преимущественно ингибиторов роста, штаммов M-17, O75 и *S.enteritidis* – стимуляторов роста, штамма №14 – нейтральных аминокислот.

Обнаруженные изменения в составе внеклеточного аминокислотного пула отражают изменения «коллективного метаболизма» всей популяции бактерий и, по-видимому, способствуют координации метаболических процессов в пространственно удаленных клетках. К таким коллективным процессам можно отнести самосинхронизацию роста культуры, часто наблюдаемую на лаг-фазе и непосредственно перед стационарной фазой [6].

Общий метаболический пул и концентрация отдельных аминокислот может служить сигналом для инициации индукции факторов патогенности, синтеза вторичных метаболитов, специфических авторегуляторов чувства кворума, образования покоящихся форм микроорганизмов, их инвазии и многих других целей [9, 10]. У высших организмов некоторые аминокислоты (глутаминовая и аспарагиновая кислоты, глицин) участвуют в передаче нервного импульса, другие используются в качестве гормонов (так называ-

емые утилизоны) [11]. В ряде работ [12, 13, 14] было показано, что аминокислоты способны влиять на пролиферацию культур тканей селезенки, миокарда, печени.

Данные по динамике аминокислот являются убедительным подтверждением их регуляторных функций и могут быть в дальнейшем использованы для разработки препаратов на основе бактериальных метаболитов, способных избирательно стимулировать или подавлять рост пробиотических и патогенных бактерий [2, 3, 4, 6].

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Министерства образования и науки РФ (гос.контракт № 16.512.11.2225) и «У.М.Н.И.К.» (№ 14193).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полевая Е.В., Вахитов Т.Я., Яковлева Е.П. // Научный журнал КубГАУ. 2012. №77(03). С.1-15.
2. Вахитов Т.Я., Момот Е.Н., Шалаева О.Н. // Журн. микробиол. 2003. №6. С. 20-25.
3. Вахитов Т.Я., Момот Е.Н., Толпаров Ю.Н. // Журн. микробиол. 2005. № 1. С. 16-21.
4. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. // Микробиология. 2006. №Т.75.№4. С. 483-488.
5. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Техносфера, 2010. С.29-31
6. Вахитов Т.Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболитов на внутрипопуляционном и межвидовом уровнях. Автореф. дис. д-ра биол. наук. Санкт-Петербург, 2006.
7. Вахитов Т.Я, Чалисова Н.И., Полевая Е.В., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. // Успехи современной биологии. 2012. В печати.
8. Budrene E.O., Berg H.C. // Nature.– 1995.– V. 376.– P.49-53.
9. Makinoshima H., Nishimura A., Ishihama A. // Molecular Microbiology.– 2002 – V.43.– №2.– P.269-278.
10. Овсова Л.М., Мазрухо А.Б., Ломов Ю.М. и др. // Журн. микробиол.– 2003.– №3.– С.16-21
11. Розен В. Б. Основы эндокринологии: Учебник. М.: Изд-во МГУ, 1994. С.336
12. Чалисова Н.И., Пеннийнен В.А., Харитонов Н.В., Ноздрачев А.Д. // Доклады Академии наук. – 2001. — Т.380, № 3. – С.418— 421.
13. Чалисова Н.И., Пеннийнен В.А., Хаазе Г. // Российский Физиологический журнал им. Сеченова. – 2002. — Т. 88, № 5. — С. 627— 633.
14. Чалисова Н. И., Закуцкий А. Н., Анискина А. И., Ноздрачев А. Д. // Докл. РАН. 2007.Т. 415. № 2. С. 273–276.