

УДК 577.151

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ *Bacillus pumilus*,
СЕКРЕТИРУЕМОЙ РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ
Bacillus subtilis НА РАЗНЫХ ФАЗАХ РОСТА**

Ю.В. Данилова, Н.П. Балабан, Т.Р. Шамсутдинов, М.Р. Шарипова

Аннотация

Подобран состав компонентов питательной среды для увеличения продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis*. С помощью двухфакторных экспериментов установлены концентрации пептона и неорганического фосфата, позволяющие увеличить выход фермента на 20%. Получен гомогенный препарат белка, соответствующий вегетативной фазе роста бацилл и стадии споруляции. Изучено влияние реагентов на сульфгидрильные группы и дисульфидные связи фермента, соответствующего разным стадиям роста бацилл. Установлено, что уровень функциональной активности глутамилэндопептидазы определяется статусом дисульфидной связи в конформации белка.

Ключевые слова: бациллы, глутамилэндопептидаза, дисульфидная связь, конформация, фазы роста.

Введение

За последние годы значительно возрос объем информации о строении, свойствах и функциях протеолитических ферментов в клетках микроорганизмов. Протеолиз играет ключевую роль в обмене веществ организмов, формировании и распаде биологически активных веществ. В клетке протеолитические ферменты выполняют жизненно важные функции. Они являются активаторами ферментативных процессов, участвуют в посттрансляционном процессинге белков, взаимосвязаны с физиологическими процессами на этапах клеточной дифференцировки. В экстремальных условиях при их участии происходит быстрая перестройка метаболизма клетки.

Поиск и изучение новых протеолитических ферментов различного происхождения представляют существенный интерес с точки зрения взаимодействия с важнейшими физиологическими процессами, а также важны для развития эволюционных представлений об этой группе белков и использования их в практических целях. В настоящее время интенсивно исследуются ферменты класса сериновых протеиназ. Особый интерес вызывают глутамилэндопептидазы клана химотрипсиноподобных протеиназ с узкой субстратной специфичностью, гидролизующие пептидные связи строго по остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислот. Такие ферменты успешно применяются в молекулярной биологии как высокоточные инструменты для изучения структуры белков и пептидов, а также в качестве катализаторов синтеза пептидных связей. Поэтому получение

гомогенных препаратов таких ферментов с последующим изучением их структуры, свойств и субстратной специфичности представляет практический интерес. Для решения этих задач необходимо разработать эффективный способ выделения и очистки белка до гомогенного состояния.

При разработке метода выделения и очистки фермента перспективным является использование генно-инженерных штаммов, содержащих на плазмиде ген индивидуального фермента, что позволяет избежать контаминации белковых примесей при получении гомогенного препарата фермента.

Целью настоящей работы явилась оптимизация состава среды для биосинтеза глутамилэндопептидазы *Bacillus pumilus* 3-19 рекомбинантным штаммом *B. subtilis* JB 2036 и сравнительная характеристика свойств белка, соответствующего разным фазам роста бактерий.

1. Материалы и методы

В работе использовали мультикопийную плазмиду p58.21, сконструированную на основе вектора pCB22 [1]. Плазмида p58.21 содержала вставку размером 2.6 т.п.о. с геном глутамилэндопептидазы *B. pumilus* 3-19 под контролем собственных регуляторных элементов. В качестве штамма-реципиента использовали штамм *B. subtilis* JB 2036 (Δarg, Δprg), из хромосомной ДНК которого делетированы гены внеклеточных протеиназ.

Рекомбинантный штамм *B. subtilis* получен путем трансформации плазмиды p58.21, несущей ген секретируемой глутамилэндопептидазы *B. pumilus*, в лабораторный протеазадефицитный штамм *B. subtilis* JB 2036. Использование модельного штамма позволило избежать наложения пула контаминирующих белков при получении гомогенного препарата фермента.

Исходными питательными средами для культивирования рекомбинантных бактерий являлись среда LB (среда, содержащая триптон в концентрации 10 г/л) и среда, содержащая бактериологический пептон в концентрации 20 г/л (далее пептон-содержащая среда) (Sigma, США) [2]. В качестве добавки к этим средам использовали гидролизат коллагена (коллагин) («Биопрогресс», Россия) в концентрации 1% и 2%, а также проводили замену пептона и триптона на коллагин в указанных концентрациях. Кроме того, в пептон-содержащей среде производили замену бактериологического пептона на ферментативный пептон («Диа-М», Россия) в концентрациях 20–40 г/л. В среду культивирования непосредственно перед посевом добавляли хлорамфеникол в концентрации 20 мкг/мл, так как на плазмиде p58.21 находится ген устойчивости к данному антибиотику. В качестве инокулята использовали суточную культуру, которую вносили в среду культивирования в количестве 1%.

В двухфакторных экспериментах исследовали влияние соотношения концентраций двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата. Для эффективной продукции фермента на разных фазах роста культуры подбирали оптимальные концентрации этих компонентов с последующей обработкой результатов с помощью программы STATGRAFICS. При проведении двухфакторных экспериментов среда культивирования содержала бактериологический пептон в концентрации 20, 30 и 40 г/л и неорганический

фосфат в концентрации 0,2, 0,3 и 0,4 г/л, раствор которого стерилизовали отдельно при 1 атм и вносили перед посевом.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на ФЭК-56М при 590 нм. Белок определяли спектрофотометрически [3], считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует A_{280} 1 опт. ед. в кювете толщиной 1 см.

Протеолитическую активность определяли по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA [4] и казеина [5]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Выделение и очистку глутамилэндопептидаз из культуральной жидкости на 24-й ч (фаза замедления роста) и 48-й ч (стационарная фаза роста) проводили методом ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке Mono S в системе FPLC (Pharmacia, Швеция), как описано в работе [6].

Степень чистоты белка и молекулярную массу определяли электрофоретически. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях по методу Ла-эммли [7]. Проводили электрофорез гомогенных препаратов глутамилэндопептидазы *B. pumilus* рекомбинантного штамма в нативных условиях в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) [8].

Для сравнительной характеристики фермента активность определяли в присутствии ингибиторов дитиоэритритола (ДТЭ), пара-хлормеркурибензоата (п-ХМБ) и нитрата ртути. Указанные ингибиторы использовали в конечной концентрации: ДТЭ – 1, 5, 10, 50, 100 мМ; п-ХМБ – 2, 5, 10 мМ; нитрат ртути – 5, 10, 15, 20 мМ соответственно. Инкубирование фермента проводили в течение 1 ч при комнатной температуре, затем определяли остаточную активность глутамилэндопептидазы по гидролизу субстрата Z-Glu-pNa по стандартной методике. За 100% (контроль) принимали активность фермента без ингибитора.

Для анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Динамика роста и накопления глутамилэндопептидазы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*. После трансформации плазмиды p58.21, несущей ген глутамилэндопептидазы *B. pumilus* (*gse Bp*) под собственным промотором, в протеазодефицитный штамм JB 2036 изучали экспрессию гена в рекомбинантном штамме. У штамма-реципиента отсутствовала внеклеточная протеолитическая активность, что позволило получить рекомбинантный штамм *Bacillus subtilis* BG 2036 p58.21, секретирующий целевой белок для изучения экспрессии индивидуального гена, а также корректно провести процесс выделения и очистки фермента из культуральной жидкости.

При изучении динамики роста рекомбинантного штамма и накопления внеклеточной глутамилэндопептидазы *B. pumilus* нами обнаружены два максимума накопления протеолитической активности по расщеплению специфического хромогенного субстрата Z-Glu-pNA: в фазе замедления роста (24-й ч) (ранний фермент) и в поздней стационарной фазе роста (48-й ч) (поздний фермент) (рис. 1).

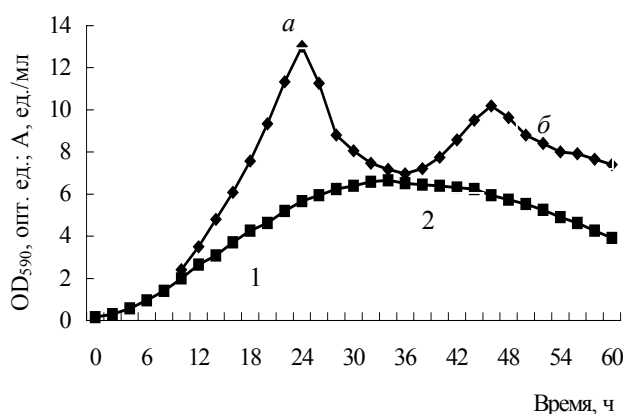


Рис. 1. Динамика роста и накопления глутамилэндопептидазы рекомбинантного штамма *B. subtilis*. *a* – ранняя глутамилэндопептидаза; *б* – поздняя глутамилэндопептидаза. 1 – рост культуры, OD₅₉₀; 2 – активность глутамилэндопептидазы (ед./мл)

При этом максимум накопления раннего фермента в 1.3 раза превышает таковой в поздней стационарной фазе роста культуры.

Таким образом, экспрессия гетерологичной глутамилэндопептидазы рекомбинантным штаммом *B. subtilis* характеризуется двумя максимумами накопления фермента, что, по-видимому, связано с физиологией бацилл.

2.2. Подбор компонентов питательной среды для эффективной продукции глутамилэндопептидазы *B. pumilus*, секретируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Уровень накопления фермента в культуральной жидкости зависит от состава питательной среды [9]. С целью получения максимальной продукции фермента для выделения и очистки белка проводили подбор основных органических компонентов питательной среды. В исходные питательные среды (LB и пептон-содержащую среду) вносили 1%-ный и 2%-ный коллагин в качестве добавки, как источник азота. Это приводило к значительному снижению активности раннего фермента на обеих средах: в 3.5–4.5 раза на среде LB и в 2.5–4.0 раза на пептон-содержащей среде (табл. 1). Похожее снижение активности наблюдалось для позднего фермента: на среде LB активность снижалась в 2.5–3.5 раза, на пептон-содержащей среде – в 2.8–3.2 раза.

Замена триптона в среде LB и бактериологического пептона в пептон-содержащей среде на коллагин также приводила к снижению активности раннего и позднего ферментов на обеих средах в 1.5–2.0 раза.

Замена бактериологического пептона на ферментативный снижала активность раннего фермента в 2 раза, позднего – в 1.4 раза.

Таким образом, внесение коллагина в исходные питательные среды как добавки в качестве источника азота, а также использование его в качестве единственного источника азота как более дешевого органического компонента нецелесообразно. Замена бактериологического пептона на ферментативный также нежелательна из-за снижения активности фермента.

Табл. 1

Подбор питательной среды для максимальной продукции глутамилэндопептидазы *B. pumilus*

Состав среды	Максимальная активность фермента на разных фазах роста культуры, ед./мг	
	Фаза замедления роста (24-й ч)	Стационарная фаза (48-й ч)
LB (триптон-содержащая среда)	1.12	0.5
LB + 1% коллагин	0.33	0.2
LB + 2% коллагин	0.25	0.15
LB (триптон → 1%-ный коллагин)	0.6	0.22
LB (триптон → 2%-ный коллагин)	0.7	0.38
Пептон-содержащая среда (бактериологический пептон, 20 г/л)	1.33	0.58
Пептон-содержащая среда + 1%-ный коллагин	0.55	0.21
Пептон-содержащая среда + 2%-ный коллагин	0.33	0.18
Пептон-содержащая среда (пептон → 1%-ный коллагин)	0.63	0.29
Пептон-содержащая среда (пептон → 2%-ный коллагин)	0.6	0.31
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 20 г/л)	0.65	0.4
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 30 г/л)	0.75	0.43
Пептон-содержащая среда (ферментативный пептон, 40 г/л)	0.71	0.41

Стрелками указано замещение пептона (или триптона) на коллагин в питательной среде.

Для дальнейшей работы из двух основных исходных питательных сред мы выбрали пептон-содержащую среду (20 г/л), так как на этой среде активность раннего и позднего ферментов в 1.2 раза выше, чем на среде LB.

В двухфакторных экспериментах исследовали влияние двух основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата – на биосинтез ранней и поздней глутамилэндопептидаз. Максимальные значения активности ранней глутамилэндопептидазы наблюдаются при концентрации в среде пептона 30.5 г/л и неорганического фосфата 0.34 г/л, поздней – при концентрации в среде пептона 30 г/л и неорганического фосфата 0.25 г/л.

Таким образом, подобрано оптимальное соотношение в среде концентраций пептона и неорганического фосфата для эффективной продукции протеиназы на разных фазах роста.

2.3. Очистка глутамилэндопептидазы *B. pumilus*, секретируемой на разных фазах роста. Раннюю и позднюю глутамилэндопептидазы *B. pumilus* выделяли из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* с помощью ионообменной хроматографии на КМ-целлюлозе и колонке Mono S в системе FPLC, как описано в работе [6].

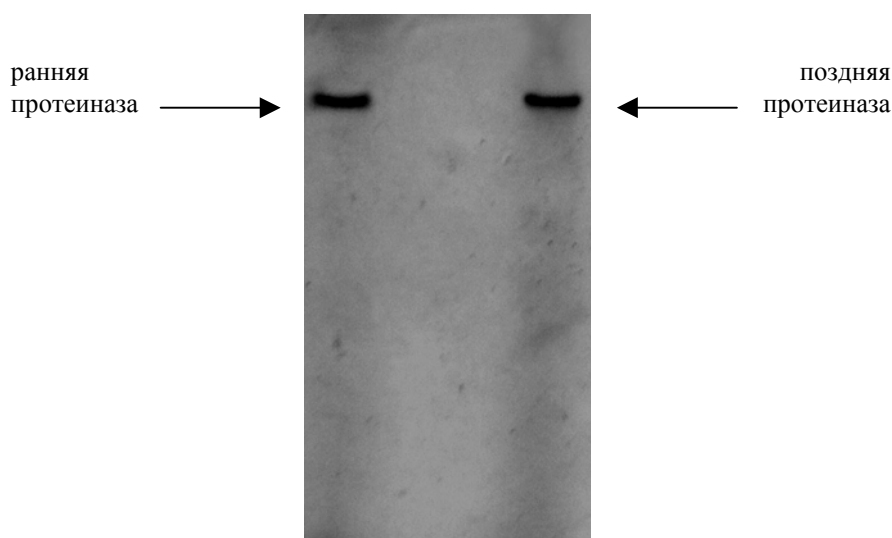


Рис. 2. Электрофорез препаратов глутамилэндопептидазы *B. intermedius* в неденатурирующих условиях

Двухстадийная очистка глутамилэндопептидазы позволила получить хроматографически гомогенные препараты фермента, соответствующие разным фазам роста культуры. Препарат ранней глутамилэндопептидазы получен со степенью очистки 1400 и выходом 14%. Степень очистки поздней глутамилэндопептидазы составила 1500 с выходом фермента 10%.

Гомогенность очищенных препаратов белка, соответствующих разным фазам роста культуры, подтверждена электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Электрофорез в нативных условиях показал наличие единственной полосы, находящейся на одном уровне для обоих препаратов белков. Таким образом, фермент, соответствующий разным стадиям роста, представляет собой мономерный белок с одинаковой молекулярной массой (рис. 2). Молекулярная масса обоих препаратов составляла 23 кДа.

2.4. Влияние реагентов на дисульфидные связи и сульфгидрильные группы в структуре ранней и поздней глутамилэндопептидаз. По результатам MALDI-TOF-анализа в первичной структуре глутамилэндопептидазы содержится 3 цистеиновых остатка [6]. Рентгеноструктурный анализ молекулы белка показал образование дисульфидной связи в третичной структуре молекулы [10]. Мы предположили, что образование двух конформационных состояний молекулы GseVp (соответствующих разным фазам роста) может быть связано со статусом дисульфидной связи: в вегетативной фазе роста образуется более стабильная конформация молекулы, содержащей дисульфидную связь, тогда как для менее стабильной конформации, формирующейся при сборке молекулы в период споруляции, характерно восстановленное состояние дисульфидной связи. Для подтверждения нашей гипотезы исследовали влияние реагентов на сульфгидрильные группы и дисульфидную связь на активность гомогенных препаратов глутамилэндопептидазы *B. pumilus*, соответствующей вегетативной фазе роста и стадии споруляции.

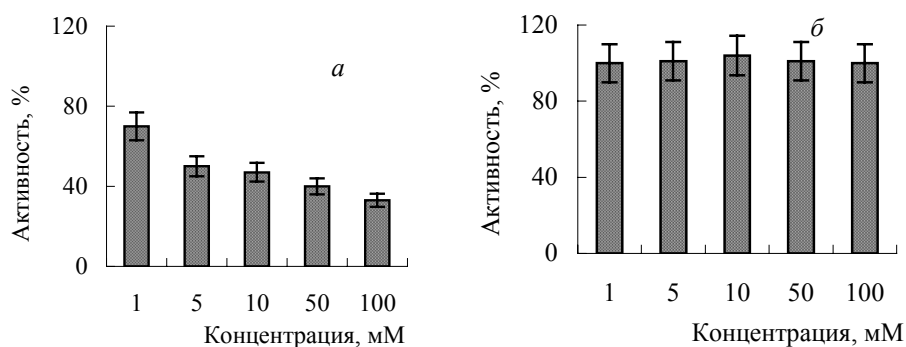


Рис. 3. Влияние дитиоэритритола на активность глутамилэндопептидазы *B. pumilus*: а – ранний фермент, б – поздний фермент

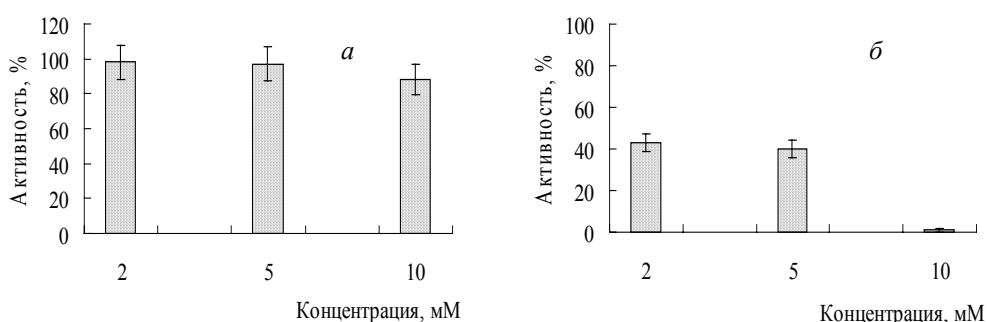


Рис. 4. Влияние п-ХМБ на активность глутамилэндопептидазы *B. pumilus*: а – ранний фермент, б – поздний фермент

Исследовали влияние дитиоэритритола, реагента на дисульфидные связи, на активность препаратов ранней и поздней глутамилэндопептидаз *B. pumilus* (рис. 3). В присутствии ДТЭ в концентрациях от 1 до 10 мМ активность раннего фермента снижалась, причем с увеличением концентрации ингибитора активность фермента уменьшалась в среднем на 50%. Согласно данным литературы, восстановление дисульфидной связи в третичной структуре белка приводит к нарушению активной конформации, что снижает активность фермента [10]. Полученные результаты свидетельствуют о присутствии дисульфидной связи в белковой конформации ранней глутамилэндопептидазы.

Активность позднего фермента в присутствии тех же концентраций дитиоэритритола оставалась без изменения. Эти результаты позволяют предположить отсутствие дисульфидной связи в белковой конформации поздней глутамилэндопептидазы, что согласуется с полученными ранее данными о понижении стабильности поздней глутамилэндопептидазы.

Исследовали активность ранней и поздней глутамилэндопептидаз в присутствии пара-хлормеркурибензоата, используемого для обнаружения SH-групп в структуре белков. Результаты представлены на рис. 4.

В присутствии п-ХМБ в реакционной смеси в концентрациях 2–10 мМ активность препарата раннего фермента оставалась практически на одном уровне, что свидетельствует об отсутствии свободных SH-групп в конформационной структуре белковой молекулы, соответствующей фазе вегетативного роста.

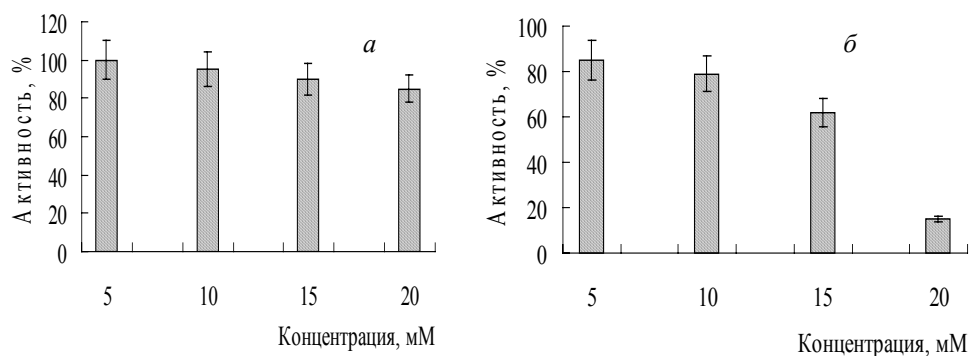


Рис. 5. Влияние HgNO_3 на активность глутамилэндопептидазы *B. pumilus*: а – ранний фермент, б – поздний фермент

Присутствие этого ингибитора в концентрациях 2–5 мМ снижало активность позднего белка на 60%, а в концентрации 10 мМ полностью ингибировало фермент, конформация которого формируется в период спорообразования.

Аналогичные результаты получены при использовании соли ртути – реагента на SH-группы. В присутствии этой соли в концентрациях 10–20 мМ активность ранней глутамилэндопептидазы снижалась на 5–15%, в то время как концентрации соли 15–20 мМ ингибировали активность позднего белка на 40–80% соответственно (рис. 5).

Полученные данные позволяют предположить наличие свободных SH-групп в третичной структуре поздней глутамилэндопептидазы.

Таким образом, мы предполагаем наличие дисульфидной связи в молекуле раннего белка и сульфгидрильных групп в молекуле поздней глутамилэндопептидазы.

Известно, что наличие дисульфидной связи в молекуле белка стабилизирует его структуру, что ведет к сохранению высокой активности фермента и является важным фактором, определяющим уровень молекулярной активности белка. Более высокая активность фермента, образующегося у бактерий в период вегетативного роста, соответствует формированию в молекуле дисульфидной связи между Cys32 и Cys48. Аминокислотные остатки каталитической триады глутамилэндопептидазы *B. pumilus* располагаются таким образом, что Ser171 относится к С-домену, а Asp102 и His47 локализованы в N-домене. В молекуле имеется одна дисульфидная связь между Cys32 и Cys48, которая находится вблизи каталитически активного His47 и поддерживает конформацию полипептидной цепи рядом с активным центром [11] (рис. 6). Восстановление этой связи соответствует ферменту с более низким уровнем каталитической активности. Отсутствие дисульфидной связи в позднем ферменте ведет к частичной дестабилизации белковой глобулы и небольшой потере молекулярной активности фермента. Полученные нами данные позволили заключить, что статус дисульфидной связи может определять степень молекулярной активности белка на разных фазах роста.

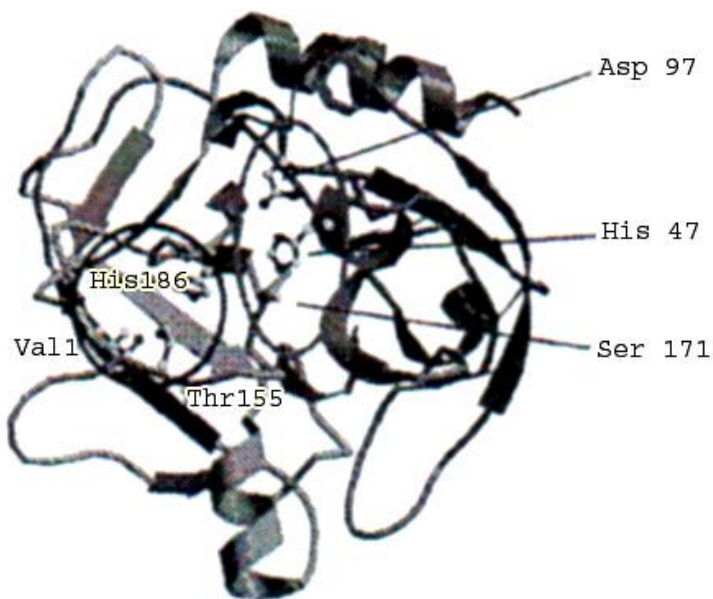


Рис. 6. Строение молекулы глутамилэндопептидазы *B. pumilus*

При переходе к спорообразованию бактериальная клетка претерпевает несколько стадий морфогенеза, которые сопровождаются сменой белковых компонентов клеточной оболочки, среди которых фолдинговые эффекторы и шапероны, участвующие в активации секретируемых белков. Мы предполагаем, что конформационная подвижность глутамилэндопептидазы, выявленная в наших исследованиях, определяется набором факторов, участвующих в формировании третичной структуры в соответствии со стадией роста.

Таким образом, результаты сравнительного исследования структуры и свойств глутамилэндопептидазы, секретируемой бациллами на разных фазах роста, свидетельствуют о незначительных изменениях в конформации фермента. При этом первичная структура фермента остается без изменений. По-видимому, изменения в конформационном состоянии зрелого белка связаны с особенностями сборки фермента на разных стадиях роста и соответствуют различному уровню функциональной активности. В целом полученные нами данные позволяют расширить представления о способах регуляции функциональной активности глутамилэндопептидаз, малоизученной подгруппы секретируемых сериновых протеиназ, при переходе бацилл в анабиотическое состояние.

Авторы выражают признательность С.В. Кострову и И.В. Демидюку (Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва) за предоставленную для работы плазмиду p58.21, профессору Е. Феррарри (E. Ferrarri) (Genencor Int. Inc., США) за протеазодефицитный штамм *Bacillus subtilis* BG 2036.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. П-406.

Summary

Yu.V. Danilova, N.P. Balaban, T.R. Shamsutdinov, M.R. Sharipova. A Comparative Analysis of *Bacillus pumilus* Glutamyl Endopeptidase Produced by *Bacillus subtilis* Recombinant Strain at Different Growth Phases.

A combination of culture medium components has been selected to increase the production of *Bacillus pumilus* glutamyl endopeptidase (GseBp) secreted by *Bacillus subtilis* recombinant strain. Concentrations of peptone and inorganic phosphate resulting in an increase in the enzyme yield by 20% have been established by two-factor experiments. A homogeneous protein preparation corresponding to vegetative and sporulation phases of bacilli has been obtained. The influence of the reagents on the sulfhydryl groups and disulfide bonds of the enzyme produced at different growth stages of bacilli has been studied. It has been determined that the level of functional activity of glutamyl endopeptidase depends on the status of the disulfide bond in a protein conformation.

Key words: bacilli, glutamyl endopeptidase, disulfide bond, conformation, growth phases.

Литература

1. *Rebrikov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.V., Demiduyk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M.* *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase. Molecular cloning and nucleotide sequence of the structural gene // *J. Protein Chem.* – 1999. – V. 18, No 1. – P. 21–27.
2. *Ицкович Е.Л., Знаменская Л.В., Балабан Н.П., Ершова Т.А., Лецинская И.Б.* Биосинтез щелочной внеклеточной протеиназы *Bacillus intermedius* // *Микробиология.* – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 623–629.
3. *Прокофьев М.А., Лавренова Г.И., Лысогорская Е.Н., Спиридонова В.А.* Экспериментальные методы исследования белка и нуклеиновых кислот. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. – 248 с.
4. *Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н.* П-нитроанилиды пироглутамилпептидов – хромогенные субстраты сериновых протеиназ // *Биоорг. химия.* – 1987. – Т. 13, № 6. – С. 748–753.
5. *Каверзнева Е.Д.* Стандартный метод определения протеолитической активности комплексных препаратов протеаз // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 1971. – Т. 7, № 2. – С. 225–228.
6. *Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Данилова Ю.В., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р.* Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста // *Биоорг. химия.* – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 322–326.
7. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
8. Протокол приготовления геля для белкового фореза в нативных условиях. – URL: http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Acidic.html, свободный.
9. *Данилова Ю.В., Балабан Н.П., Шамсутдинов Т.Р., Марданова А.М., Шарипова М.Р.* Среда для культивирования рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* с модифицированным геном глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2011. – Т. 153, кн. 2. – С. 51–62.
10. *Meijers R., Blagova E.V., Levdikov V.M., Rudenskaya G.N., Chestukhina G.G., Akimkina T.V., Kostrov S.V., Lamzin V.S., Kuranova I.P.* The crystal structure of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* reveals a structural link between zymogen activation and charge compensation // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43, No 10. – P. 2784–2791.

11. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* // Protein Eng. Des. Sel. – 2004. – V. 17, No 5. – P. 411–416.

Поступила в редакцию
24.05.11

Данилова Юлия Васильевна – магистр кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Danilova146@mail.ru

Балабан Нэлли Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: NellyBalaban@yandex.ru

Шамсутдинов Талгат Рахимзянович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Talgat_saby@mail.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru