

УДК 577.151

**ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ  
ПРОТЕИНАЗ *BACILLUS INTERMEDIUS* 3-19,  
СЕКРЕТИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ В ПОЗДНЕЙ  
СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА**

*Е.А. Соколова, Т.Р. Шамсутдинов, Н.П. Балабан*

**Аннотация**

Из культуральной жидкости *Bacillus intermedius* 3-19 ионообменной хроматографией на КМ-целлюлозе и колонке Mono S в системе FPLC выделены сериновые протеиназы, секретируемые в поздней стационарной фазе роста культуры. По действию на специфические хромогенные субстраты эти ферменты классифицированы как глутамилэндопептидаза и две субтилизиноподобные протеиназы. В результате подбора условий выделения и очистки протеиназ получены препараты глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы со степенью очистки 1400 и 234 и выходом 22.5 и 16.9% соответственно. Степень очистки и выход второй субтилизиноподобной протеиназы существенно не изменились.

Грамположительные бактерии в стационарной фазе роста секретируют сериновые протеиназы, играющие определенную роль в адаптационных процессах. В поздней стационарной фазе роста бациллы секретируют сериновые протеиназы, относящиеся к семейству субтилизинов (субтилизиноподобные протеиназы) и к семейству химотрипсинов (глутамилэндопептидазы). Внеклеточные глутамилэндопептидазы в настоящее время выделены из стафилококков, актиномицетов, стрептомицетов и бацилл [1, 2] и образуют особое подсемейство ферментов, гидролизующих пептидные связи по строго определенным аминокислотным остаткам – глутаминовой и аспарагиновой кислотам. Такая строгая субстратная специфичность представляет особый интерес для молекулярной биологии, так как делает эти ферменты удобным инструментом при изучении аминокислотной последовательности белков и локализации активных центров ферментов [3]. Способность микробных субтилизиноподобных протеиназ осуществлять селективный протеолиз таких белков крови человека, как фибрин, плазминоген, протеин С, определяет перспективность использования этих ферментов в медицинской практике, а именно, для коррекции гемостаза человека, при профилактике, диагностике и лечении атеросклероза и его последствий.

Ранее нами были обнаружены сериновые протеиназы, секретируемые в фазе замедления роста и начале стационарной фазы роста *Bacillus intermedius* 3-19 и относящиеся к семействам химотрипсина и субтилизина – глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа. Они были выделены из культураль-

ной жидкости и получены в гомогенном состоянии, а также изучены их физико-химические, каталитические и энзиматические свойства [4, 5]. Мы обнаружили, что эти бактериальные ферменты синтезируются и секретируются в поздней стационарной фазе роста *B. intermedius* 3-19. Они были отнесены к «поздним» сериновым протеиназам, а именно, глутамилэндопептидазе 2 с максимальным накоплением активности на 40-й час роста и субтилизиноподобным протеиназам 2 с максимальным накоплением активности на 44–46-й час роста культуры. Индекс 2 введен нами для отличия «поздних» ферментов от хорошо изученных «ранних» белков.

Выделение и очистку «поздних» протеиназ из культуральной жидкости *B. intermedius* 3-19 проводили по ранее разработанному методу для получения «ранних» ферментов [4, 5]. Сравнительный анализ результатов очистки «ранних» и «поздних» ферментов по разработанному методу выявил большие потери белка на каждой стадии очистки для «поздних» протеиназ по сравнению с «ранними» ферментами. Встал вопрос об оптимизации условий очистки поздних белков.

Целью настоящей работы явилась оптимизация метода получения внеклеточных сериновых протеиназ *B. intermedius* 3-19 поздней стационарной фазы роста для получения гомогенных препаратов ферментов.

### Материалы и методы

**Бактериальный штамм.** В работе использовали стрептомицин-устойчивый штамм *B. intermedius* 3-19 из коллекции кафедры микробиологии Казанского государственного университета. Бактерии выращивали на среде, описанной ранее [6]. Культивирование проводили при температуре 30°C на вибростенде при 200 об/мин в течение 46 ч. Соотношение объема среды к объему колбы составляло 1 : 5. Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 1 ч при 4500 g.

**Реагенты.** Для выделения ферментов использовали карбоксиметил (KM) – целлюлозу («Sigma», США), колонку Mono S HR – 5/5 в системе FPLC («Pharmacia», Швеция).

**Протеолитическую активность** определяли, используя в качестве субстратов синтетические хромогенные пептиды Z-Glu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-pNA, которые были синтезированы в лаборатории химического факультета Московского государственного университета по методу Хоумарда [7]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

При определении протеолитической активности глутамилэндопептидазы реакционная смесь состояла из 1 мл раствора субстрата (0.5 мг/мл) Z-Glu-pNa в 0.1 М трис-HCl буфере pH 8.5 и 50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали при температуре 37°C от 2 до 60 мин до появления соломенно-желтого окрашивания, затем реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 1 М Na-ацетатного буфера, pH 4.7. Контрольную пробу, содержащую 1 мл субстрата и 0.5 мл 1 М Na-ацетатного буфера, pH 4.7, инкубировали при температуре 37°C одновременно с опытной пробой. По окончании инкубации в контрольную пробу добавляли 50 мкл фермента и измеряли на спектрофотометре СФ-26 оптическую плотность опытной пробы против контрольной при 410 нм в кювете толщиной 0.5 см.

Активность субтилизиноподобных протеиназ определяли с помощью синтетического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Реакционная смесь состояла из 500 мкл субстрата (0.5 мг/мл) Z-Ala-Ala-Leu-pNa, растворенного в диметилформамиде, 2 мл 0.05 М трис-НСІ буфера, рН 8.5, и 50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали при температуре 37°C от 2 до 60 мин до появления соломенно-желтого окрашивания. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 20%-ной уксусной кислоты. В контрольную пробу, содержащую 500 мкл субстрата и 200 мкл уксусной кислоты, после инкубации при температуре 37°C одновременно с опытной пробой добавляли 50 мкл фермента, и измеряли на спектрофотометре СФ-26 оптическую плотность опытной пробы против контрольной при 410 нм в кювете толщиной 1 см.

За единицу активности в обоих случаях принимали количество фермента ( $E$ ), которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Активность рассчитывали по формуле:

$$ПА = (D \cdot P \cdot K) / (B \cdot T),$$

где ПА – активность, мкМ/мин, на 1 мл ферментного раствора;  $D$  – поглощение раствора при 410 нм;  $P$  – расчет на 1 мл раствора фермента;  $K = 0.37$  – коэффициент, учитывающий молярную экстинкцию субстрата;  $B$  – объем пробы фермента в реакционной смеси;  $T$  – время инкубации, мин.

**Белок** определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует поглощению  $A_{280}$ , равному единице, в кювете толщиной 1 см.

**Удельную активность** ферментов определяли как отношение величины протеолитической активности к единице белка и выражали в ед/мг белка.

**Выделение ферментов** проводили из 2 л культуральной жидкости с использованием ионообменной хроматографии в объеме на КМ-целлюлозе, уравновешенной 15 мМ Na-ацетатным буфером рН 6.3 + 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub> с последующим переносом ионообменника с сорбированным белком в колонку (2.2 × 30 см). Десорбцию ферментов проводили элюирующим буфером 200 мМ Na-ацетата рН 6.3 + 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Затем элюат разводили водой в 12 раз и проводили хроматографию в системе FPLC на колонке Mono S, уравновешенной 15 мМ Na-ацетатным буфером рН 6.3 + 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Элюировали ферменты тем же буфером, создавая линейный градиент NaCl (0.0–0.5 М).

Полученные фракции глутамилэндопептидазы 2 и субтилизинов 2 разводили в 10–12 раз водой и проводили рехроматографию на колонке Mono S, уравновешенной 15 мМ Na-ацетатным буфером рН 6.3. Использовали два варианта элюирующего буфера:

**Вариант I:** 15 мМ Na-ацетатный буфер рН 6.3 содержал 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub> с линейным градиентом NaCl (0.0–0.5 М);

**Вариант II:** 15 мМ Na-ацетатный буфер рН 6.3 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, линейный градиент был тот же самый.

Фракции ферментов, активные по гидролизу субстратов Z-Glu-pNA и Z-Ala-Ala-Leu-pNA, обессоливали на сефадексе G-25 в 15 мМ Na-ацетатном буфере рН 6.3 + 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub> и изучали свойства полученных белков.

**Степень чистоты** препаратов определяли электрофоретически в 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% DS-Na по методу Лаэммли [8].

**Влияние ионов кальция на активность ферментов.** При исследовании влияния ионов кальция на активность гомогенных препаратов белка в опытные пробирки добавляли раствор  $\text{CaCl}_2$  до конечной концентрации от 1 до 20 мМ и проводили определение активности фермента по вышеописанным методикам.

### Результаты и их обсуждение

При изучении свойств и характеристик протеолитических ферментов необходимо разработать эффективный метод для получения гомогенных белковых препаратов.

Для увеличения выхода ферментов в процессе очистки из культуральной жидкости мы предварительно исследовали влияние соотношения белок/сорбент на полноту десорбции фермента с КМ-целлюлозы. Эти эксперименты проводили для глутамилэндопептидазы, определяя активность, степень очистки и выход фермента. Из табл. 1 видно, что соотношение белок/сорбент, равное 470 мг белка на 1 мл КМ-целлюлозы, является наилучшим (61% десорбции), увеличение нагрузки на 1 мл КМ-целлюлозы в 1.5 раза приводит к снижению выхода фермента почти в 2 раза, а увеличение нагрузки в 2 раза снижает выход фермента в 2.5 раза.

Степень очистки фермента изменялась незначительно. В дальнейшей работе на первой стадии очистки мы придерживались полученного соотношения белок/сорбент, равного 450–550 мг белка на 1 мл КМ-целлюлозы, для трех сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* 3-19. В табл. 2 и 3 показаны результаты двухстадийной, а в табл. 4 – результаты трехстадийной очистки сериновых протеиназ поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* 3-19. Благодаря подобранному соотношению белок/сорбент (КМ-целлюлоза) нам удалось на первой стадии очистки получить фермента приблизительно в два раза больше, чем это было показано ранее [9, 10]. Вторая стадия очистки на колонке Mono S также позволила получить на 7–10% белка больше, чем это показано в предыдущих разработках [9, 10].

На рис. 1 представлен хроматографический профиль белков после очистки на колонке Mono S. Получены три белковые фракции, которые по действию на специфические субстраты идентифицированы как глутамилэндопептидаза (фракция 2) и субтилизиноподобные протеиназы (фракции 1 и 3).

Как видно из рис. 1, полученные белковые фракции являются негомогенными, поэтому проводили рехроматографию белков с использованием двух вариантов элюирующего буфера с разным содержанием ионов кальция, как описано в п. «Материалы и методы». Для этого фракции глутамилэндопептидазы 2 и субтилизиноподобной протеиназы 2 после стадии очистки на колонке Mono S делили на две равные части (для глутамилэндопептидазы – по 11 мл, для субтилизиноподобной протеиназы – по 15 мл), проводили рехроматографию и рассчитывали удельную активность, степень очистки и выход ферментов.

В табл. 4–6 представлены результаты этих исследований.

Табл. 1

Влияние соотношения белок/сорбент на десорбцию глутамилэндопептидазы 2 с КМ-целлюлозы

№	Количество сорбента (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Соотношение белок/сорбент (мг/мл)	Концентрация белка после очистки (мг/мл)	Выход (%)
1	29	16.4	470	3.0	61
2	20	16.4	670	1.2	32
3	13	16.4	1013	0.75	23

Табл. 2

Хроматографическая очистка глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius* 3-19

Стадии очистки	$V$ , (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Общее количество белка (мг)	Активность		Степень очистки	Выход (%)
				Общая, (ед/мл·V)	Удельная (ед/мг)		
Культуральная жидкость	2000	15.4	30800	23.6	0.00077	1	100
КМ-целлюлоза	40	3.0	118.8	15.3	0.129	167.5	64.8
Моно S	22	0.3	6.7	6.7	0.93	1208	26.5

Табл. 3

Хроматографическая очистка субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* 3-19

Стадии очистки	$V$ , (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Общее количество белка (мг)	Активность		Степень очистки	Выход (%)
				Общая, (ед/мл·V)	Удельная (ед/мг)		
Культуральная жидкость	2000	15.4	30800	4720	0.153	1	100
КМ-целлюлоза	40	3.0	118.8	2280	19.2	125.5	48.3
Моно S	30	1.7	50.2	1185	23.6	154.2	25.1

Табл. 4

Хроматографическая очистка субтилизиноподобной протеиназы пика 1 *B. intermedius* 3-19

Стадии очистки	$V$ , (мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Общее количество белка (мг)	Активность		Степень очистки	Выход (%)
				Общая, (ед/мл·V)	Удельная (ед/мг)		
Культуральная жидкость	2000	15.2	30400	4720	0.153	1	100
КМ-целлюлоза	40	3.0	118.8	2280	19.2	125.5	48.3
Моно S	13	0.3	3.45	0.600	0.18	1.1	0.012
Рехроматография	1.8	0.3	0.58	0.234	0.4	2.5	0.005

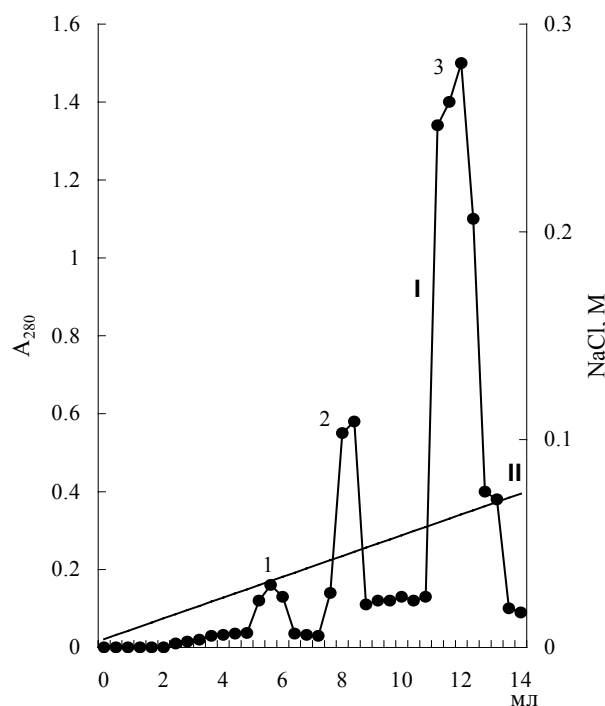


Рис. 1. Хроматография протеиназ *B. intermedius* поздней стадии роста культуры на колонке Mono S: I –  $A_{280}$ , II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1, 3 – фракции субтилизиноподобных сериновых протеиназ, 2 – фракция глутамилэндопептидазы

Табл. 5

Рехроматография глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius* 3-19

Элюирующий буфер	Удельная активность (ед/мг)	Степень очистки	Выход (%)
Вариант I	1.026	1315	18
Вариант II	1.094	1400	22.5

Табл. 6

Рехроматография субтилизиноподобной протеиназы 2 *B. intermedius* 3-19

Элюирующий буфер	Удельная активность (ед/мг)	Степень очистки	Выход (%)
Вариант I	34.7	214	9.1
Вариант II	38	234	16.9

Рехроматографию субтилизина первого пика, полученного после хроматографии на FPLC, проводили также с использованием двух вариантов элюирующего буфера. Однако ни степень очистки этого фермента, ни его выход существенно не изменились. Поэтому в табл. 4. представлены результаты очистки этой фракции с использованием элюирующего буфера варианта I. При использовании элюирующего буфера с 5 mM  $\text{CaCl}_2$  выход глутамилэндопептидазы увеличивается в 1.3 раза, субтилизиноподобной протеиназы – в 1.8 раза. По-

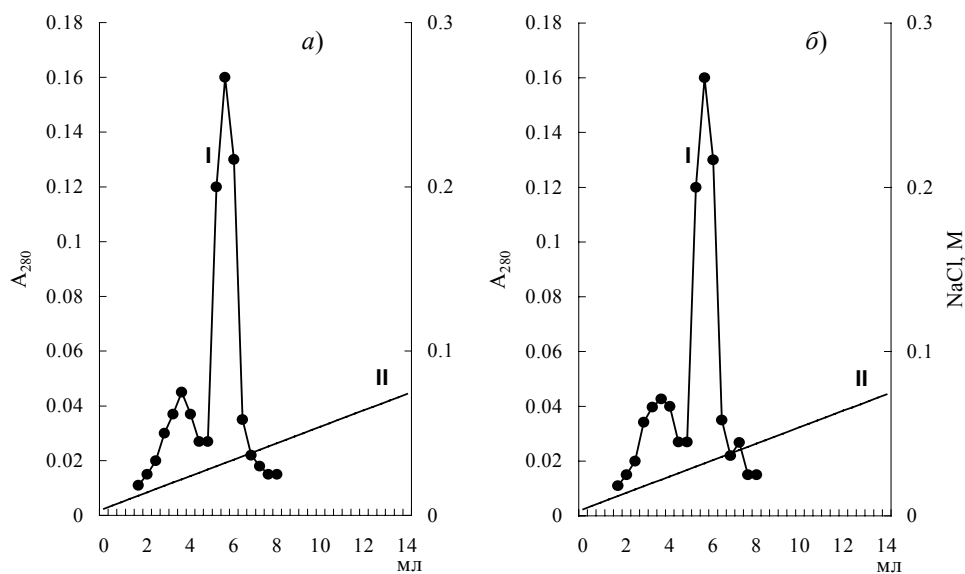


Рис. 2. Рехроматография субтилизиноподобной протеиназы (фракция 1, рис. 1) *B. intermedius* на колонке Моно S: I –  $A_{280}$ , (а) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , (б) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 5 mM  $\text{CaCl}_2$

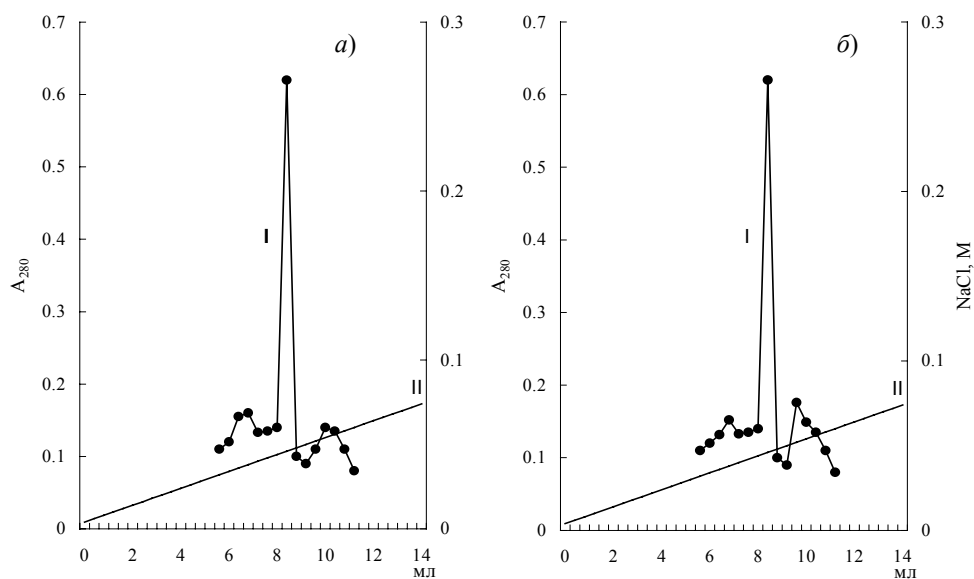


Рис. 3. Рехроматография глутамилэндопептидазы 2 *B. intermedius* на колонке Моно S: I –  $A_{280}$ , а) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , б) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 5 mM  $\text{CaCl}_2$

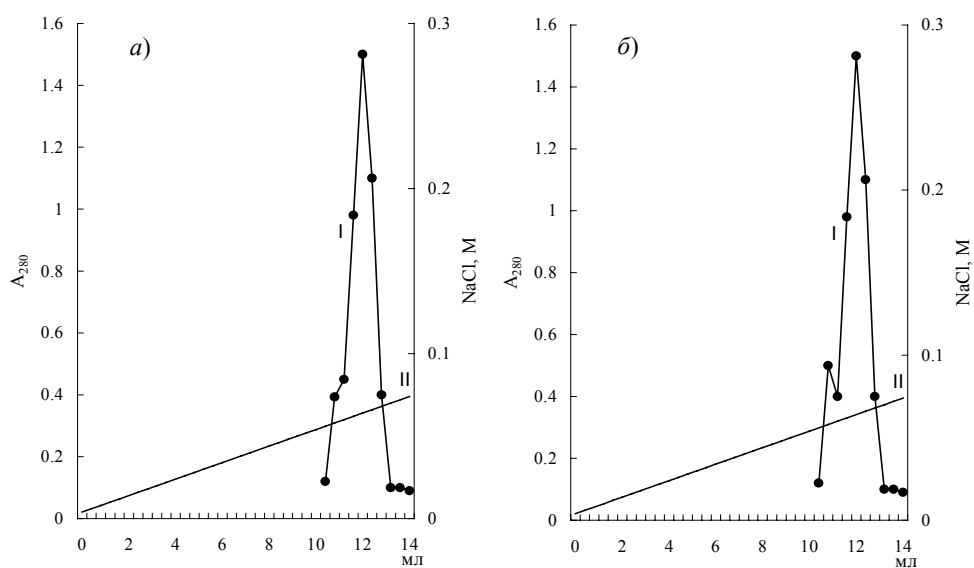


Рис. 4. Рехроматография субтилизиноподобной протеиназы 2 (фракция 3, рис. 1). I –  $A_{280}$ , а) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , б) II – градиент NaCl (0–0.5 M) в 15 mM Na-ацетатном буфере pH 6.3, содержащем 5 mM  $\text{CaCl}_2$

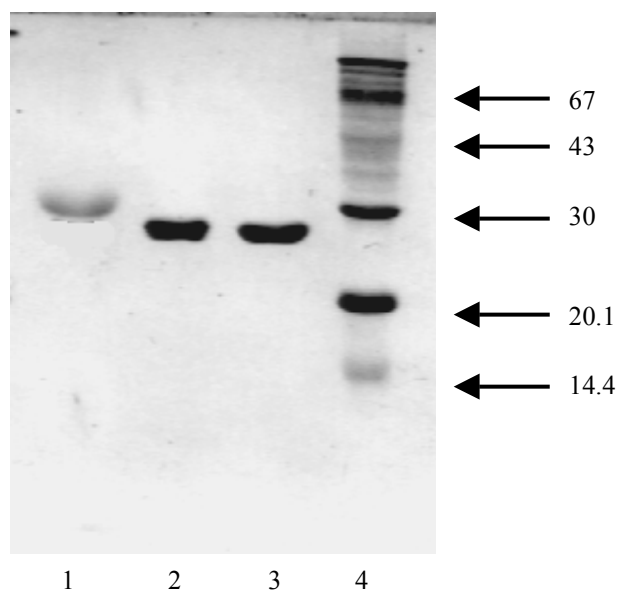


Рис. 5. Электрофорез внеклеточных щелочных протеиназ поздней стационарной фазы роста *Bacillus intermedius* в ПААГ с DS-Na: 1 – субтилизин (фракция 3), 2 – глутамилендопептидаза, 3 – субтилизин (фракция 1), 4 – маркеры: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овалбумин (43 кДа), карбоксиангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20.1 кДа), лизоцим (14.4 кДа)



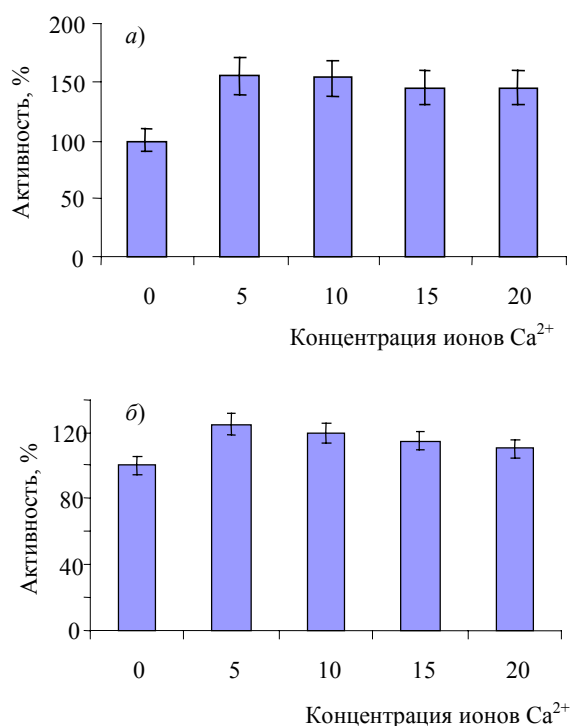


Рис. 6. Влияние ионов Ca<sup>2+</sup> на активность протеиназ *B. intermedius* 3-19 ( $x \pm \sigma$ ), где  $\sigma$  – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического: а) глутамилэндопептидаза, б) субтилизиноподобная протеиназа

сле каждой стадии очистки ферменты становятся не только более чистыми, но и менее стабильными. Добавление в элюирующий буфер ионов кальция (5 мМ против 0.5 мМ) приводит к стабилизации молекулы белка, что, в свою очередь, ведет к увеличению активности препарата. Удельная активность и степень очистки увеличиваются незначительно, что свидетельствует о получении гомогенных препаратов белков при использовании любого варианта элюирующего буфера.

Из рис. 2–4 видно, что рехроматография позволила получить хроматографически гомогенные белки.

С помощью DS-Na-электрофореза подтверждена гомогенность полученных ферментов (рис. 5).

Ранее было показано, что ионы кальция способны стабилизировать структуру молекул сериновых протеиназ, предохранять от тепловой денатурации и протеолитической деградации. Так, при анализе третичных структур некоторых известных субтилизинов были обнаружены три Ca-связывающих сайта, причем два из них обладали высоким сродством к ионам Ca<sup>2+</sup>, а третий сайт слабо связывает ионы кальция. Подобное присутствие кальция в структуре может быть связано с особенностями функционирования ферментов. Субтилизины BPN<sup>r</sup>, Карлсберг и протеиназа К проявляют каталитическую активность лишь вне клетки, где концентрация кальция существенно выше, чем внутри [11].

Исследовали влияние ионов кальция на активность ферментов поздней стационарной фазы роста *B. intermedius* 3-19. Внесение в реакцию смесь 5–20 мМ ионов кальция достоверно увеличивает активность глутамилэндопепти-

мМ ионов кальция достоверно увеличивает активность глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы (рис. 6). Ранее было установлено, что активность глутамилэндопептидазы поздней логарифмической фазы роста *B. intermedius* 3-19 увеличивается в присутствии 5–25 мМ ионов кальция в два раза [5], субтилизиноподобной протеиназы – на 20% [4]. Похожие результаты были получены для глутамилэндопептидазы *Bacillus licheniformis*, когда активность фермента увеличивалась на 80% при увеличении концентрации ионов кальция от 4 до 30 мкМ. Активность протеиназы *Bacillus mesentericus* 64 увеличивалась на 15–20% под действием ионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  вследствие стабилизации молекулы белка [11].

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны условия очистки внеклеточных сериновых протеиназ *B. intermedius*, позволяющие получить ферменты с более высоким выходом на каждой стадии очистки. Целесообразно добавлять в элюирующий буфер ионы кальция в конечной концентрации 5 мМ при хроматографии в системе FPLC, так как при этом увеличивается активность глутамилэндопептидазы в 1.3 раза, субтилизиноподобной протеиназы – в 1.8 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-48182а).

#### Summary

*E.A. Sokolova, T.R. Shamsutdinov, N.P. Balaban.* The optimization of the *Bacillus intermedius* 3-19 extracellular proteinases isolation.

Serine proteinases from *Bacillus intermedius* 3-19, secreted at the late stationary phase of growth, were isolated by ion-exchange chromatography on the Km-cellulose followed by FPLC on Mono S column. The enzymes were identified as glutamyl endopeptidase and two subtilisin-like serine proteinases using synthetic chromogenous substrates. The isolation was resulted in glutamyl endopeptidase and subtilisin-like serine proteinase fractions with the purity degree of 1400 and 234 and yield of 22.5% and 16.9%, respectively, as a result of the study of enzyme isolation conditions. There were not significant differences in values of purity degree and yield of the second subtilisin-like serine proteinase.

#### Литература

1. Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М. и др. Glu, Asp – специфичная протеиназа актиномицетов // Биохимия. – 1987. – Т. 52. – С. 414–422.
2. Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П. и др. Glu, Asp-специфичная протеиназа из *Streptomyces thermovulgaris* // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 46–52
3. Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарпова М.Р. и др. Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* 3-19 // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 323–329.
4. Ицкович Е.Л., Балабан Н.П., Марданова А.М. и др. Энзиматические свойства тиол-зависимой сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 1. – С. 49–53.
5. Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovich E.L., et al. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius*, strain 3-19 // FEBS Lett. – 1997. – V. 404. – P. 241–244.

6. Балабан Н.П., Шарпова М.Р., Габдрахманова Л.А. и др. Синтез и секреция протеиназ *Bacillus intermedius* на поздних стадиях спорообразования // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 328–343.
7. Houtard J., Drapeau G.R. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1972. – V. 69, No 12. – P. 3506–3509.
8. Laemmli H.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
9. Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарпова М.Р. и др. Выделение и характеристика сериновой протеиназы 2 *Bacillus intermedius* 3-19 // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – С. 519–526.
10. Балабан Н.П., Марданова А.М., Шарпова М.Р. и др. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы 2 *Bacillus intermedius* // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 11. – С. 1514–1521.
11. Тепляков А.В., Куранова И.П., Арутюнян Э.Г. и др. Кристаллическая структура термитазы и стабильность субтилизинов // Биоорг. химия. – 1990. – Т. 16, № 4. – С. 437–447.

Поступила в редакцию  
12.07.06

---

**Соколова Евгения Александровна** – аспирантка кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

**Шамсутдинов Талгат Рахимзянович** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

**Нэлли Павловна Балабан** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.