

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ
*BACILLUS VELEZENSIS***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Басалаевой Дарьи Леонидовны

Научный руководитель

доцент кафедры, к.б.н., доцент

_____ Е.В. Глинская

Научный консультант:

мл. науч. сотрудник ИБФРМ РАН

_____ С. С. Евстигнеева

Зав. кафедрой микробиологии

и физиологии растений, д.б.н., профессор

_____ С.А. Степанов

Саратов 2020

Введение

Актуальность темы. Разработка противомикробных препаратов, необходимых для борьбы с заболеваниями растений, животных и человека, является одним из перспективных направлений фармацевтической индустрии и сельского хозяйства. В настоящее время ведется поиск и изучение новых штаммов бактерий рода *Bacillus*, продуцирующих широкий спектр биологически активных веществ и проявляющих антагонистические свойства в отношении патогенных бактерий и грибов [1].

Бактерии рода *Bacillus*, являются удобными объектами исследований, поскольку широко распространены в природе, легко культивируются с использованием различных питательных субстратов, устойчивы к неблагоприятным условиям среды, в том числе благодаря спорообразованию, и содержат множество ферментных систем, ответственных за синтез разнообразных вторичных метаболитов [2].

Bacillus velezensis – вид, выделенный в 2005 году из пресноводного источника в провинции Малага, Испания [3]. Данный вид является непатогенным для человека и животных и способен вступать во взаимовыгодные отношения с растениями. Он широко распространен в природе и его метаболиты проявляют антибактериальную и антимикотическую активности. Бактерии *B. velezensis* продуцируют липопептиды, такие как сурфактин, итурин, фунгицидные антибиотики и аминокликозиды, которые находят применение в различных отраслях агропромышленности и медицины.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является установление антагонистических свойств и спектра продуцируемых веществ бактериями *B. velezensis* 13.

На основании данной цели были поставлены следующие задачи.

1. Определить антагонистическую активность *B. velezensis* 13 в отношении тест-культур бактерий и аскомицетов.

2. Выявить продукцию бактериями *B. velezensis* 13 гидролитических экзоферментов и веществ липопептидной природы.

3. Охарактеризовать моносакхаридный состав экзополисахаридов выделяемых бактериями *B. velezensis* 13 в культуральную жидкость.

Материал и методы исследования. В качестве объекта исследования был выбран штамм *B. velezensis* 13, выделенный с поверхности листьев ястребинки могучей *Hieracium robustum* Fr. s. L., 1848.

Определение антагонистической активности исследуемых бактерий проводили методом агаровых блоков [4]. В качестве тест-культур были использованы грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209-Р и *Bacillus cereus* 8035, грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* 113-13 (предоставлены ГИСК имени Л.И. Тарасевича, г. Москва), а также аскомицеты *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium equiseti*, *Trichoderma harzianum* и *Phoma fungicola* (предоставлены коллекцией кафедры микробиологии и физиологии растений биологического факультета СГУ им. Н.Г. Чернышевского). Культивирование бактерий проводили на агаризованной среде ГРМ, а выращивание грибов – на среде ПДА.

Для выявления ферментативной активности бактерий *B. velezensis* 13 использовали агаризованные среды различного состава. В качестве специфических субстратов для липаз применяли поверхностно-активные вещества (твин-40, твин-60, твин-85) и растительные масла; для протеаз – обезжиренное молоко; для амилаз – растворимый крахмал; для целлюлаз – порошковую целлюлозу [5 - 9].

Получение веществ липопептидной природы из культуральной жидкости штамма *B. velezensis* 13 осуществляли метанольной экстракцией в соответствии с методикой, описанной в работе [10]. В дальнейшем полученные экстракты анализировали методами ТСХ и ИК-спектроскопии.

ЭПС выделяли из культуральной жидкости бактерий *B. velezensis* 13 осаждением трехкратным объемом охлажденного этанола и фракционировали методом гель-фильтрации на Sepharose CL-6B. В образце ЭПС определяли содержание углеводов [11] и белков [12]. Моносакхаридный состав препарата ЭПС устанавливали методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов [13].

Структура и объем работы. Работа изложена на 52 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 3 таблицами и 8 рисунками. Список использованных источников включает в себя 111 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлена краткая характеристика бактерий рода *Bacillus* и возможности их практического применения в различных отраслях промышленности, медицины, ветеринарии и сельского хозяйства. Приведены сведения об особенностях вида *B. velezensis*, их способности продуцировать биологически активные вещества различной природы и их роли в стимуляции роста и развития растений.

В главе «Результаты и обсуждение» описаны и проанализированы экспериментально полученные данные о способности исследуемого штамма к проявлению антагонизма по отношению к тест-культурам грамположительных и грамотрицательных бактерий и аскомицетов, а также о продукции гидролитических ферментов, соединений липопептидной природы и экстраклеточных полисахаридов.

Изучение антагонистических свойств бактерий *B. velezensis* 13 показало, что исследуемый штамм подавлял рост грамположительных бактерий *S. aureus* 209-Р и *B. cereus* 8035, а также грибов *A. tubingensis*, *F. equiseti*, *T. harzianum* и *P. fungicola*. Антимикробный эффект культуры *B. velezensis* 13 в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* 113-13 и аскомицета *F. tricinctum* не проявлялся.

Количественная оценка ингибирования роста тест-культур бактериями штамма *B. velezensis* 13 свидетельствовала о том, что антагонистический эффект наиболее эффективно проявлялся в случае грамположительных бактерий *S. aureus* 209-Р и аскомицета *T. harzianum* – приблизительно 33 и 37 мм соответственно.

Полученные результаты указывают на избирательное действие бактерий *B. velezensis* 13 на рост различных бактериальных и грибных культур. Как

оказалось, данный штамм не проявляет антагонизма по отношению к грамотрицательным бактериям. Этот факт может быть обусловлен механизмом действия антибиотиков, продуцируемых *B. velezensis* 13, действие которых, вероятно, направлено на повреждение клеточной стенки грамположительных бактерий. Штамм *B. velezensis* 13 не влияет на рост гриба *F. tricinctum*, который поражает различные сельскохозяйственные культуры, что позволит не применять данный штамм в составе биопрепаратов для борьбы с подобным возбудителем фузариоза. В то же время, существенная антагонистическая активность исследуемого штамма была отмечена применительно к *T. harzianum*, который является распространенным компонентом различных биоудобрений, поскольку синтезирует фунгициды широкого спектра действия. В связи с этим при разработке микробных удобрений следует учитывать возможный антагонизм бактерий и грибов, полезных для роста и развития растений, но губительно влияющих друг на друга.

Продукция бактериями литических ферментов может выступать одним из важных критериев их агрономической значимости. С использованием дифференциально-диагностических питательных сред нами была проведена оценка способности бактерий *B. velezensis* 13 к синтезу ряда гидролитических экзоферментов. Было обнаружено, что исследуемый штамм в той или иной мере обладал целлюлолитической, протеолитической, амилолитической и липолитической активностями. Наблюдалось возрастание продукции экзоферментов в ходе 7-суточного культивирования данного штамма.

Целлюлитическая активность бактерий *B. velezensis* 13 была более выражена, чем активности других ферментов, и величина зон гидролиза целлюлозы к 7 суткам роста составляла в среднем 46 мм. Биодеградация и биоконверсия целлюлозосодержащих отходов является важнейшими направлениями биотехнологии. По всему миру зарегистрированы и введены в практику микробные препараты на основе различных микроорганизмов, продуцирующих ферменты целлюлазного комплекса. В связи с этим

исследуемый штамм *B. velezensis* 13 может выступать в качестве перспективного для биотехнологии продуцентов микробных целлюлаз.

Зоны гидролиза казеина и крахмала к 7 суткам роста *B. velezensis* 13 достигали в среднем 40 и 28 мм соответственно, что свидетельствует о продукции данным штаммом экстраклеточных протеаз и амилаз. Способность бактерий проявлять протеолитическую и амилолитическую активности обуславливает их возможное применение в различных областях производства. К ним относится медицинская, текстильная, мясомолочная, спиртовая промышленность, пивоварение, хлебопечение, производство детергентов, а также кормовых добавок в сельском хозяйстве, утилизация отходов мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

У бактерий *B. velezensis* 13 липолизная активность в отношении поверхностно активных веществ и растительных масел проявлялась значительно слабее по сравнению с другими ферментами. Так, наибольшие зоны гидролиза (17-23 мм) наблюдались при использовании твин-40 (монопальмитат) и твин-85 (эфир трансизомера олеиновой кислоты), а также кукурузного масла в качестве субстратов. Подсолнечное и оливковые масла разлагались исследуемым штаммом слабее, а в случае добавления в среду культивирования твин-60 (эфир стеариновой кислоты) гидролиз не происходил. Такая избирательность может объясняться сложным составом липазного комплекса бацилл, т.е. наличием нескольких типов липаз, избирательно гидролизующих субстраты с различной длиной углеродной цепочки и степенью насыщенности жирных кислот.

Поскольку для ранее изученных штаммов бактерий *B. velezensis* была продемонстрирована продукция сурфактинов, нами был выполнен поиск веществ липопептидной природы в культуральной жидкости штамма *B. velezensis* 13. В соответствии с методикой выделения сурфактинов были получены метанольные экстракты, компоненты которых разделяли методом ТСХ. В качестве контрольного образца был использован метанольный экстракт, полученный из питательной среды без бактерий. В результате разделения исследуемого экстракта на хроматограмме были обнаружены три фракции с

различными значениями R_f : 0,16; 0,32; 0,47. В случае вытяжки из чистой среды соединений липопептидной природы обнаружить не удалось, что служит подтверждением микробного происхождения выявленных фракций в изучаемом экстракте. Отсутствие стандартного образца сурфактина не позволяет точно судить о принадлежности выявленных соединений к липопептидам. Однако, в работе [14] были представлены значения R_f сурфактина бактерий *B. subtilis* ИБ-17 и коммерческого стандарта («Sigma», США), которые составляли 0,184. Поскольку на величину R_f влияют качество и активность сорбента, его влажность, толщина слоя, природа растворителей, постановка эксперимента, в частности способ нанесения пробы и метод детектирования, не исключено, что полученная нами фракция с $R_f = 0,16$ соответствует циклическому липопептиду сурфактину. Наличие двух дополнительных фракций в исследуемом образце может быть обусловлено присутствием нескольких изоформ выделенного липопептида, либо следствием его недостаточной очистки от других компонентов, отличных по строению от сурфактинов.

Для уточнения природы соединений, которые удалось обнаружить с помощью ТСХ в лиофильно высушенных метанольных экстрактах, полученных из культуральной жидкости *B. velezensis* 13, нами была проведена ИК-спектроскопия.

Полученный ИК-спектр выявил наличие полос поглощения, характеристичных для пептидов при 3305 см^{-1} (валентные колебания связи N–H), при 1643 см^{-1} (амид I) и при 1548 см^{-1} (амид II). Присутствие валентных колебаний связи C=O при 1727 см^{-1} , вероятно, обусловлено дикарбоновыми аминокислотами (аспарагиновой и/или глутаминовой кислотами) в составе сурфактинов. Полосы поглощения при $2956\text{--}2924$ и 2869 см^{-1} (валентные колебания связи C–H), а также при 1463 и 1377 см^{-1} (деформационные колебания групп $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$) указывают на наличие алифатических цепей, которые выступают как структурная основа липопептидов. Таким образом, данные ИК-спектроскопии подтвердили предположение о возможной липопептидной

структуре веществ, продуцируемых исследуемым штаммом в культуральную жидкость.

Бактерии *B. velezensis* принадлежат к группе ризобактерий, стимулирующих рост и развитие растений (PGPR). Представители данного вида обладают важными для компонентов биоудобрений свойствами, в частности высокой конкурентоспособностью в почве и продукцией ряда антимикробных вторичных метаболитов. Однако, остается много неясного в плане взаимодействия данных бактерий с растениями на молекулярном уровне. В связи с этим нами были получены и охарактеризованы образцы ЭПС штамма *B. velezensis* 13.

Выход образца ЭПС, выделенного из культуральной жидкости бактерий *B. velezensis* 13, составил 7,5 г/л. По данным колориметрического анализа препарат ЭПС практически на 95% состоял из углеводов, в то время как примеси белков не превышали 5%.

Гетерогенность образца ЭПС по молекулярной массе оценивали с помощью гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-6B. Так, для исследуемого образца ЭПС была свойственна гетерогенность по молекулярной массе, что выражалось в наличии двух основных фракций.

Для каждой фракции, полученной после гель-фильтрации препарата ЭПС *B. velezensis* 13, был определен моносахаридный состав методом ГЖХ ацетатов полиолов. Оказалось, что в ЭПС_I преобладающим моносахаридом является манноза, на долю которой приходилось приблизительно 78% от общей суммы моносахаридных остатков. В составе ЭПС_{II} преобладали остатки маннозы и глюкозы, соотношение которых составляло 3:1. В меньших количествах были обнаружены остатки фукозы, галактозы и галактозамина, содержание которых не превышало 7%.

Полученные результаты указывают на продукцию бактериями *B. velezensis* 13 в составе ЭПС биополимеров двух типов – маннанов и манноглюканов с различным соотношением компонентов. Поскольку полисахариды являются регулярными биополимерами, не исключено, что моносахариды,

присутствующие в малых концентрациях в ЭПС, могут являться компонентами примесного ЭПС, либо нестехиометрическими заместителями доминирующего.

Таким образом, бактерии *B. velezensis* 13 проявляют антагонистические свойства в отношении грамположительных бактерий и ряда аскомицетов, а также синтезируют гидролитические экзоферменты и вещества, обладающие липопептидной структурой. Сведения о составе и структуре ЭПС исследуемых бактерий позволят установить молекулярные механизмы взаимодействия бактерий и растений в почве и оптимизировать применение микробных препаратов.

Выводы

1. Бактерии *B. velezensis* 13 проявляют антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий *S. aureus* 209-Р и *B. cereus* 8035, а также аскомицетов *A. tubingensis*, *F. equiseti*, *T. harzianum* и *P. fungicola*. Наибольший ингибирующий эффект выражен в отношении бактерий *S. aureus* 209-Р и гриба *T. harzianum*.

2. Исследуемый штамм *B. velezensis* 13 обладает способностью продуцировать протеазы, амилазы, а также ферменты липазного и целлюлолитического комплексов. Соединения липопептидной природы, предположительно представители семейства сурфактинов, обнаружены в культуральной жидкости бактерий.

3. Экзополисахариды, выделяемые бактериями *B. velezensis* 13, обладают гетерогенностью по молекулярной массе и содержат две основные фракции. Выявленные биополимеры различаются между собой по моносахаридному составу и представлены маннанами и манноглюканами с различными соотношениями компонентов.

Список использованных источников

1. Садунова, А. В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* [Электронный ресурс]: <http://scienceforum.ru/2014/article/2014001198> (дата обращения 29.05.2020). Загл. с экрана.
2. Пат. 2482174С Российская Федерация. 2013 Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, обеспечивающие восстановление микробиоценозов почвы и желудочно-кишечного тракта животных, обладающие бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, и препарат на основе этих штаммов / А. А. Лемяк, А. И. Лемяк. – Заявка № 2011104924/10 от 10.02.2011; опубл. 20.05.2013. Бюл. №11.
3. Ruis-Garsia, C. *Bacillus velezensis* sp. Nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, Southern Spain / C. Ruis-Garsia, V. Be'jar // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Part 1. – P. 191-195.
4. Иркитова, А. Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А. Н. Иркитова, Я. Р. Каган, Г. Г. Соколова // Известия Алтайского университета. – 2012. – Т. 1, № 3. – С. 41-44.
5. Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy? / L. A. Safronova [et al.] // Can. J. Microbiol. – 2012. – V. 58. – P. 212-219.
6. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 157 isolated from *Eucommia ulmoides* with pathogenic bacteria inhibiting and lignocellulolytic enzymes production by SSF / L. Chen [et al.] // 3 Biotech. – 2018. – V. 3. – P. 325-335.
7. A lipases production by *Bacillus circulans* under mesophilic and osmophilic conditions, factors affecting lipases production / S. H. Elwan [et al.] // J. Bacterial. Virol. Immunol. – 1983. – V. 76. – P. 187-199.
8. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKJ-1 / A. Sekhon [et al.] // J. Basic. Microbiol. – 2005. – V. 45. – P. 147-154.

9. Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry / F. Rasul [et al.] // Int. J. Biosci. – 2015. – V. 6. – P. 230-238.
10. Genome shuffling of *Bacillus velezensis* for enhanced surfactin production and variation analysis / L. Chen [et al.] // Curr. Microbiol. – 2020. – V. 77 (1). – P. 71-78.
11. Скоупс, Р. К. Методы очистки белков: перевод с англ. / Р. К. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 385 с.
12. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois [et al.] // Analytical Chemistry – 1956. – V. 28. – P. 350-356.
13. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography / J. S. Sawardeker [et al.] // Analytical Chemistry – 1965. – V. 37. – P. 1602-1604.
14. Яковлева, О. В. Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Sohn продуценты поверхностно активных веществ: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 : защищена 10.02.2005 : утв. 21.11.2006 / Ольга Валерьевна Яковлева; науч. рук. Л. Ю. Кузьмина; Ин-т биологии Уфим. науч. центра РАН – Уфа, 2004. – 117 с.