

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ *BACILLUS VELEZENSIS*

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы


Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Роденко Ксении Андреевны

Научный руководитель

доцент кафедры, к.б.н., доцент




30.05.23

Е.В. Глинская

Зав. кафедрой микробиологии

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



30.05.23

С.А. Степанов

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы. Все чаще в последние годы перед аграрной отраслью встает проблема отсутствия биологически безопасных аналогов синтетических фунгицидов, не наносящих вреда окружающей среде и живым организмам. Основным возбудителем болезней растений, требующим внедрение фунгицидов, являются фитопатогенные грибы, вызывающие множественное поражение различных частей растений, что может привести к гибели всего урожая. Многие виды фитопатогенных грибов являются видами-космополитами, широко распространенными по всему миру. Их выделяют из почвы, воды, воздуха, частей растений и животных [1].

Биологическая защита растений на современном этапе включает использование веществ природного происхождения и использование препаратов, полученных из живых культур микроорганизмов. В то же время применение биопрепаратов позволяет достичь нескольких целей: защитить растения и сельскохозяйственные культуры от фитопатогенов, стимулировать прорастание семян и рост растений, улучшить питание растений, получить соединения, подавляющие возбудителей корневых гнилей растений и др. [2, 3].

Бактерии рода *Bacillus* способны продуцировать большое количество экзоферментов класса гидролаз, расщепляющих полисахариды, полипептиды и жирные кислоты – именно поэтому данные микроорганизмы активно используются в качестве биологических агентов. Однако некоторые из этих экзометаболитов в процессе онтогенеза могут тормозить развитие и рост растений. В связи с этим при выборе перспективных штаммов бактерий для создания биопрепаратов, направленных на биоконтроль фитопатогенов сельскохозяйственных культур, учитывают его биобезопасность и отсутствие фитотоксического действия [4].

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение биологических свойств штамма *Bacillus velezensis* HR 13.

Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи.

- 1 Определить ферментативную активность *Bacillus velezensis* HR 13;
- 2 Оценить способность *Bacillus velezensis* HR 13 к мацерации растительных тканей;
- 3 Установить способность *Bacillus velezensis* HR 13 к некрозу растительных тканей;
- 4 Выявить наличие гена целлюлазы *celV* (эндоглюканаза семейства V) у штамма *Bacillus velezensis* HR 13

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

Определение ферментативной активности проводили методом высева исследуемого штамма на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с источниками специфических субстратов. В качестве субстратов использовали: обезжиренное молоко – протеолитические ферменты, растворимый крахмал – амилолитические ферменты, порошковую целлюлозу – целлюлолитические ферменты, растворимую целлобиозу – β -глюканазные ферменты, Твин-40, Твин-85 и растительные масла (кукурузное, оливковое, подсолнечное) – липолитические ферменты, яблочный и свекловичный пектины – пектинолитические ферменты. Посев исследуемой культуры осуществляли уколом и инкубировали при 28 °С в течение 7 суток. Учет результатов проводили на 3, 5 и 7 сутки культивирования. О ферментативной активности судили по диаметру зон гидролиза субстрата. Для визуализации зон гидролиза крахмала, целлюлозы и целлобиозы использовали раствор Люголя, а для поверхностно-активных веществ и пектинов – 0,05 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего [5 – 7].

Оценку способности к мацерации исследуемого штамма *B. velezensis* HR 13 проводили по стандартной методике. В стерильные чашки Петри раскладывали диски фильтровальной бумаги, смачивали стерильным физиологическим раствором. На поверхность помещали диски стандартных тест-объектов диаметром 1 см и толщиной 0,5 см: клубни картофеля и

корнеплоды моркови и свеклы. Исследуемую суточную культуру петлей наносили на поверхность растительных тканей и инкубировали при температуре 28 °С в течение 48 – 72 ч. Оценку фитопатогенного влияния проводили визуально и касанием петли [7].

Определение способности штамма *B. velezensis* HR 13 к некрозу растительных тканей проводили по стандартной методике. В стерильные чашки Петри раскладывали листья *Nicotiana alata* Link & C. F. E. Otto, 1828. Готовили взвесь из суточной культуры исследуемого штамма в концентрациях: 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 и 10^5 м.к./мл. Далее суспензию клеток бактерий в объеме 0,1 мл стерильным шприцом вводили в центральную жилку листа. Инкубировали при температуре 18 – 20 °С в течение 72 ч при поддержании смены светового режима. Реакцию гиперчувствительности оценивали по появлению некротических зон почернения листовой пластинки [7].

ДНК для выявления наличия целлюлаз у штамма *Bacillus velezensis* HR 13 выделяли с помощью готовой реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген»), предназначенной для проведения ПЦР с последующим анализом на гель-электрофорезе. В состав 5X ScreenMix входят: Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} и реакционный буфер, а также красители для непосредственного нанесения реакционной смеси на гель при проведении электрофоретического анализа. Для выделения ДНК использовали суточные культуры *Bacillus velezensis* HR 13, выращенные на плотной среде ГРМ (Оболенск, Россия) при температуре 28 °С.

Структура и объем работы. Работа изложена на 46 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 5 таблицами и 15 рисунками. Список использованных источников включает в себя 51 наименование.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена краткая характеристика бактерий рода *Bacillus* и их возможности синтезировать гидролитические экзоферменты – амилалитические, протеолитические, целлюлолитические и

липолитические ферменты, а так же фитопатогенные свойства бактерий рода *Bacillus*. Приведены сведения об особенностях вида *B. velezensis*.

В главе «Результаты исследования» описаны и проанализированы экспериментально полученные данные ферментативной активности, способности к мацерации и некрозу растительных тканей, а так же данные о наличии в геноме *B. velezensis* HR 13 нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены целлюлаз.

Результаты определения ферментативной активности показали, что бактерии *B. velezensis* HR 13 обладают протеолитической активностью – расщепляют белки, амилолитической – деградируют крахмал, целлюлолитической – разрушают целлюлозу, β -глюканазной – подвергают гидролизу целлобиозу, липолитической и пектинолитической активностями – расщепляют липиды и пектин соответственно. В ходе 7-суточного культивирования наблюдалось увеличение продукции гидролитических экзоферментов.

Максимальная сахаролитическая активность на седьмой день культивирования наблюдалась по отношению к целлюлозе, где зона гидролиза составила 49,5 мм. Зона гидролиза целлобиозы составила 44,0 мм.

Пектиная активность, проявляющаяся так же в размере зон гидролиза, составила: яблочный пектин – 47,0 мм, свекловичный пектин – 22,0 мм.

Амилолитическая активность была несколько ниже, зона гидролиза крахмала к 7 суткам достигала 32,5 мм.

Протеолитическую активность изучали по отношению к казеину – главному белку молока, зона гидролиза которого составила 32,5 мм.

Липолитическая активность исследуемого штамма проявлялась значительно слабее. Исследуемый штамм использовал в качестве источника специфических субстратов Твин-40, Твин-85 и кукурузное масло.

К 7 дню культивирования зоны гидролиза Твин-40 достигла 21,9 мм, Твин-85 – всего 18,2 мм. Липолитическая же активность, где субстратами служили растительные масла, проявилась хуже, чем в случае с твинами – зоны гидролиза

кукурузного масла составили 17,2 мм, оливкового масла – 9,2 мм, а подсолнечного масла всего 7,3 мм.

По литературным данным бактерии *B. velezensis* обладают проеолитической, амилолитической, сахаролитической и липолитической активностями, что соответствует полученным нами результатам [8 – 11].

Проведя, оценку мацерации штаммом *B. velezensis* HR 13 по истечении инкубирования, выяснили, что исследуемый штамм мацерирует все тест-объекты.

Данный штамм активно мацерировал ткани клубней картофеля и корнеплодов свеклы, полностью размягчая верхний слой среза тест-объекта.

Менее активно проявилась мацерация на тест-объекте корнеплода моркови – разрушение растительных клеток происходило преимущественно в месте нанесения бактериальной культуры.

Оценку проводили касанием микробиологической петли в месте нанесения культуры исследуемого штамма.

По литературным данным бактерии *Bacillus velezensis* не способны подвергать мацерации растительные ткани, а наоборот – способны подавлять мацерацию другими микроорганизмами, если находятся в одном сообществе, что расходится с полученными нами данные и стимулирует на дальнейшее исследование штамма *B. velezensis* HR 13 в отношении фитотоксичности и фитопатогенности [12].

Оценивая результаты способности штамма *Bacillus velezensis* HR 13 подвергать растительные ткани некрозу, получили следующие данные: тест-объект был подвержен некротическим поражениям в различной степени.

Наибольшее поражение наблюдали на тест-объекте, где концентрации инокулята были 10^6 и 10^7 м.к./мл. В иных случаях (инокуляция проводилась в концентрациях 10^5 , 10^8 и 10^9 м.к./мл) наблюдалось очаговое поражение частей листа.

Подводя итоги, можно заявить, что данный штамм микроорганизмов обладает фитотоксическим действием по отношению к тест-объекту, что ранее не подвергалось изучению и обсуждению в литературных источниках.

В результате проведенного исследования была выделена ДНК исследуемого штамма *Bacillus velezensis* HR 13 и проведен анализ амплифицированных последовательностей гена целлюлазы *celV* с использованием гель-электрофореза (1 % агарозный гель).

Оценивая результаты, проведенного электрофореза, можно утверждать, что данный штамм не имеет в своем геноме нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген *celV*, т. к. не было отмечено флюоресценции в месте нанесения пробы в агарозном геле при просвечивании на трансиллюминаторе.

По литературным данным бактерии *Bacillus velezensis* имеют в своем геноме последовательности, кодирующие эндоглюканазные и β -глюканазные ферменты [13]. По нашим данным штамм *Bacillus velezensis* HR 13 не обладает эндоглюканазами семейства V, что расходится с данными, которые есть в литературе, но на данный момент нет данных, подтверждающих отсутствие и других генетических и молекулярных систем, способных подвергать гидролизу целлюлозу растительного происхождения.

Выводы

1. Штамм *Bacillus velezensis* HR 13 обладает широким спектром гидролитических экзоферментов – протеолитическими, амилолитическими, целлюлолитическими, β -глюканазными, липолитическими и пектинолитическими. Максимальная активность наблюдалась по отношению к целлюлозе (зона гидролиза – 49,5 мм), яблочному пектину (зона гидролиза – 47,0 мм), целлобиозе (зона гидролиза – 44,0 мм), крахмалу (зона гидролиза – 32,5 мм), казеину (зона гидролиза – 32,5 мм).

2. Штамм *Bacillus velezensis* HR 13 способен к мацерации растительных тканей клубней картофеля и корнеплодов моркови и свеклы.

3. Штамм *Bacillus velezensis* HR 13 способен к некрозу растительных тканей листьев *Nicotiana glauca*.

4. У штамма *Bacillus velezensis* HR 13 отсутствуют генетические системы, кодирующие ген целлюлазы celV.

Список использованных источников

1 Пучкова, Е. П. Грибы-возбудители инфекционных болезней растений / Е. П. Пучкова, В. К. Ивченко. - Красноярск : КрасГАУ, 2020. - 198 с.

2 Садунова, А. В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* [Электронный ресурс] URL : <http://scienceforum.ru/2014/article/2014001198> (дата обращения 27.02.2022). Загл. с экрана.

3 Штерншис, М. В. Биологическая защита растений / М. В. Штерншис, И. В. Андреева, О. Г. Томилова. - СПб : Лань, 2018. - 332 с.

4 Оценка ферментативной активности и способности к мацерации бактерий *Bacillus velezensis* / Д. Л. Басалаева [и др.] // ЭкоБиоТех 2021 : сборник научных трудов VII Всероссийской конференции с международным участием. - Уфа : Уфимский Институт биологии, 2021. - С. 8-11.

5 Антагонистические свойства бактерий *Bacillus velezensis* / Д. Л. Басалаева [и др.] // Живые системы-2019. - сборник научных статей. - Саратов : Амирит, 2019. - С. 171-173.

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.] // Biotech. - 2018. - V. 3. - P. 325-335.

7 Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. - Минск : БГУ, 2006. - 116 с.

8 A novel cold-adapted phospho-beta-galactosidase from *Bacillus velezensis* and its potential application for lactose hydrolysis in milk / Y. Liu [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. - 2021. - V. 166. - P. 760-770.

9 Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase / K. Bhatt [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. - 2020. - V. 164. - P. 3332-3339.

10 Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review / N. Bhardwaj [et al.] // *Bioresources and Bioprocessing*. - 2021. - V. 8. - P. 1-34.

11 Elegbeleye, J. A. Potential spoilage of extended shelf-life (ESL) milk by *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* / J. A. Elegbeleye, E. M Buys // *LWT*. - 2022. - V. 153. - P. 112.

12 Kumvinit, A. Antibiotic biosynthesis gene of *Bacillus velezensis* as a bioagent for controlling blackleg and soft rot of potato / A. Kumvinit, A. Akarapisan // *Technology*. - V. 19, № 2. - P. 505-516.

13 Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus* / L. Ma [et al.] // *BMC biotechnology*. - 2020. - V. 20, № 1. - P. 1-13.

Prof