


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология
Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
ЛИПОПЕПТИДОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* GM5

Обучающийся 4 курса
группы 01-903


« 13 » июня 2023 г.



Абубакирова А. М.

Научный руководитель,
д-р биол. наук, профессор

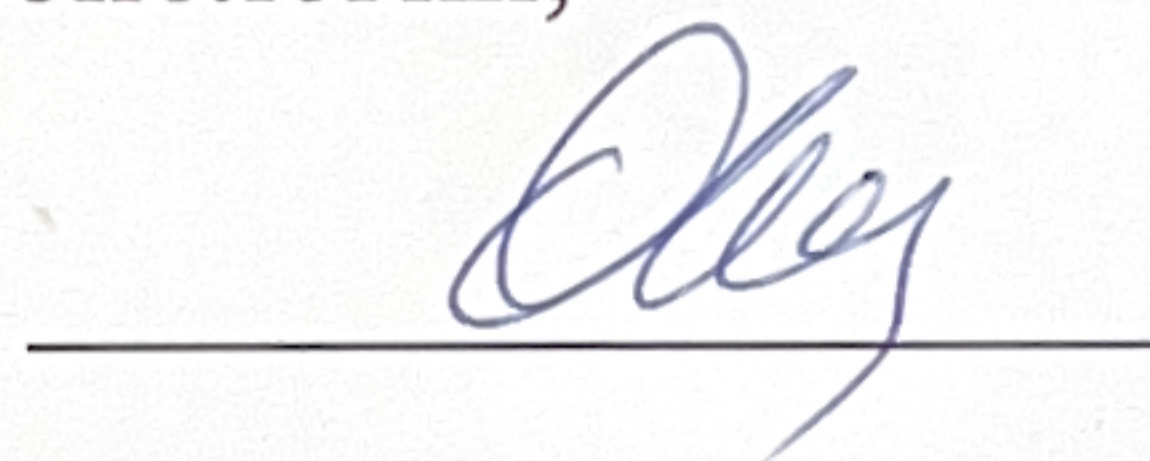
« 13 » июня 2023 г.



Марданова А. М.

Заведующий кафедрой микробиологии,
д-р биол. наук, профессор

« 13 » июня 2023 г.



Ильинская О. Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Характеристика бактерий рода <i>Bacillus</i>	8
1.2 Характеристика свойств и практическое применение бактерий <i>Bacillus subtilis</i>	8
1.3 Вторичные метаболиты бактерий рода <i>Bacillus</i>	10
1.4 Рибосомно-синтезированные пептиды бактерий рода <i>Bacillus</i>	11
1.5 Нерибосомно-синтезированные пептид синтетазы бактерий рода <i>Bacillus</i>	13
1.5.1 Характеристика семейства сурфактинов	15
1.5.1.1 Антимикробная активность и механизм действия сурфактина	15
1.5.1.2 Структура оперона <i>urfA</i> и гена <i>sfp</i>	17
1.5.2 Характеристика семейства фенгицинов	19
1.5.2.1 Антимикробная активность фенгицина	19
1.5.2.2 Регуляция экспрессии оперонов <i>fen</i> и <i>pps</i>	21
1.5.3 Семейство итуринов	21
1.5.3.1 Антимикробная активность	22
1.5.3.2 Структура оперона	24
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Объекты исследования	26
2.2 Питательные среды и условия культивирования	26
2.3 Исследование влияния условий культивирования на динамику роста бактерий и накопление суммарной фракции липопептидов с поверхностно-активными свойствами	27
2.3.1 Метод падения капли	27
2.3.2 Определение индекса эмульгирования	27

2.3.3	Метод вытеснения нефти	28
2.4	Культивирование, выделение и очистка липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	28
2.5	Исследование антибактериальной активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	29
2.5.1	Исследование антибактериальной активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5 на агаризованной среде	29
2.5.2	Исследование антибактериальной активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5 в жидкой культуре	30
2.6	Исследование фунгистатической активности штамма <i>B. subtilis</i> GM5 и его суммарной фракции липопептидов	30
2.6.1	Исследование фунгистатической активности штамма <i>B. subtilis</i> GM5	30
2.6.2	Исследование фунгистатической активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	31
2.6.3	Исследование изменения морфологии мицелия микромицетов	31
2.7	Поиск и анализ геномных локусов, ответственных за синтез антимикробных липопептидов, в геноме <i>B. subtilis</i> GM5	31
2.8	Конструирование праймеров к целевым генам	32
2.9	Исследование экспрессии генов антимикробных липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5 при разных условиях культивирования	32
2.9.1	Выделение РНК	32
2.9.2	Анализ экспрессии генов антимикробных липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	33
2.10	Статистическая обработка результатов	34
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	35
3.1	Исследование влияния условий культивирования на динамику роста бактерий <i>B. subtilis</i> GM5 и накопление липопептидов	35
3.1.1	Влияния температуры, рН и интенсивности качания на динамику роста бактерий	35
3.1.2	Метод падения капли	37
3.1.3	Определение индекса эмульгирования	39

3.1.4 Метод вытеснения нефти	40
3.2 Выделение и очистка суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	41
3.3 Исследование антибактериальной активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5 на агаризованной среде	42
3.4 Исследование антибактериальной активности липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5 в жидкой культуре	44
3.5 Исследование фунгистатической активности штамма <i>B. subtilis</i> GM5	45
3.6 Исследование фунгистатической активности суммарной фракции липопептидов <i>B. subtilis</i> GM5	47
3.7 Характеристика геномных локусов, ответственных за синтез антимикробных липопептидов, в геноме <i>B. subtilis</i> GM5 и сконструирование праймеров	50
3.8. Анализ экспрессии генов <i>srfAA</i> , <i>srfAD</i> , <i>DhBF</i> , <i>ppsB</i> штамма <i>B. subtilis</i> GM5	52
ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами разных групп метаболитов. Они способны продуцировать в среду культивирования гидролитические ферменты, антимикробные метаболиты, в том числе и антибиотики [Садунова, 2014; Caulier *et al.*, 2019]. Бактерии рода *Bacillus* вызывают большой интерес вследствие повсеместного распространения, способности некоторых штаммов выдерживать высокие и низкие температуры, а также широкий диапазон pH среды. Кроме того *Bacillus* способны образовывать споры, которые помогают бактериям переживать неблагоприятные условия среды.

Bacillus subtilis – широко распространенная грамположительная бактерия, которая показывает высокую генетическую приспособляемость, позволяющую ей колонизировать самые разнообразные среды обитания [Kaspar *et al.*, 2019; Kovács, 2019]. В течение многих десятилетий *B. subtilis* использовался в качестве модельного микроорганизма для исследования свойств спорообразующих грамположительных бактерий [Michna *et al.*, 2014; Caulier *et al.*, 2019]. Также *B. subtilis* называют «рабочей лошадкой», так как его широко используют в биотехнологической промышленности для синтеза различных метаболитов и ферментов [Drejer *et al.*, 2018; Hara *et al.*, 2014]. *B. subtilis* был признан эффективным агентом биологической борьбы в сельском хозяйстве, одновременно ингибирующий рост фитопатогенов и стимулирующий рост растений [Shafi *et al.*, 2017]. Благодаря противовоспалительным свойствам многие штаммы *B. subtilis* были признаны пробиотиками и нашли широкое применение в сельском хозяйстве [Rhayat *et al.*, 2019]. Разные штаммы дикого типа *B. subtilis*, выделенные из различных источников, показали огромный биосинтетический потенциал этого вида. Антибактериальная и противогрибковая активность *B. subtilis* обусловлена продукцией активных вторичных метаболитов [Kovacs, 2019]. Известно, что 4-5% генома *B. subtilis* состоит из генов, ответственных за

синтез вторичных метаболитов [Caulier *et al.*, 2019]. *B. subtilis* известен как продуцент сложных циклических липопептидов, включая сурфактины, итурины и фенгицины, которые привлекают повышенный биотехнологический и фармацевтический интерес в качестве биосурфактантов и антибиотиков [Cochrane, Vederas, 2016]. Разнообразная структура и высокая антимикробная активность нерибосомных циклических липопептидов *B. subtilis* обуславливает интерес к их выделению и дальнейшему исследованию.

Целью работы являлось выделение суммарной фракции липопептидов *Bacillus subtilis* GM5 и характеристика их антимикробной активности.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Оптимизация условий культивирования бактерий *B. subtilis* GM5 для накопления суммарной фракции липопептидов с поверхностно-активными свойствами.
- 2) Выделение и очистка суммарной фракции липопептидов *B. subtilis* GM5.
- 3) Характеристика антибактериальной активности суммарной фракции липопептидов *B. subtilis* GM5.
- 4) Характеристика фунгистатической активности штамма *B. subtilis* GM5 и суммарной фракции липопептидов.
- 5) Анализ геномных локусов, ответственных за синтез антимикробных липопептидов, в геноме *B. subtilis* GM5. Определение уровня экспрессии генов сурфактин синтетазы (*srfAA*, *srfAD*), плипастатин синтетазы (*ppsB*) и синтетазы бациллибактина (*DhBF*).

ВЫВОДЫ

1) Оптимальными условиями для роста штамма *B. subtilis* GM5 и накопления липопептидов с поверхностно-активными свойствами являются температура 37 °С, рН от 6.0 до 8.0 и максимальная интенсивность аэрации (200 об/мин). Оценка поверхностно-активных свойств тремя методами (метод падения капли, индекс эмульгирования, метод вытеснения нефти) показал, что *B. subtilis* GM5 является активным продуцентом биосурфактантов.

2) Суммарный выход липопептидов *B. subtilis* GM5 составил 0.192 г/л на среде SMN и 0.065 г/л на среде FM.

3) Суммарная фракция липопептидов *B. subtilis* GM5, выделенная из среды SMN, ингибировала рост грамположительных бактериальных тест-культур: *M. luteus*, *B. cereus*, *B. pumilus* 6, *L. sphaericus* MG_RT4, и проявляла низкую активность против грамотрицательных тест-культур. Показали, что в жидкой среде суммарная фракция липопептидов ингибировала рост *M. luteus* на 78.6% на 24 ч и *B. cereus* на 83.3% на 16 ч роста.

4) Штамм *B. subtilis* GM5 и суммарная фракция липопептидов ингибировали рост фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium* на 65-75% и 25-35% соответственно. Штамм GM5 и его липопептиды вызывали изменения морфологии мицелия грибов рода *Fusarium*, деформацию спор и образованием клеток типа хламидоспор.

5) В геноме штамма *B. subtilis* GM5 выявили генные кластеры *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*, ответственные за синтез сурфактина; *ppsA*, *ppsB*, *ppsD*, *ppsC* – за синтез плипастатина; *DhBF* – за синтез бациллибактина. Установили, что на среде SMN у штамма GM5 повышался уровень относительной экспрессии м-РНК генов сурфактин синтетазы (*srfAA*, *srfAD*), плипастатин синтетазы (*ppsB*) и синтетазы бациллибактина (*DhBF*). Индукция генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* коррелирует с антибактериальной и фунгистатической активностью суммарной фракции липопептидов.