

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

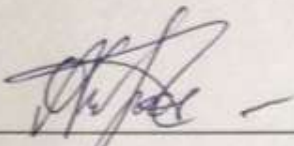
Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА *BACILLUS PUMILUS* 3-19 В КАЧЕСТВЕ
PGP- ШТАММА

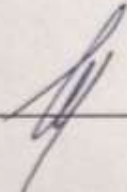
Обучающийся 4 курса
группы 01-902

" ___ " _____ 2023 г.

 _____ А.В. Коробова

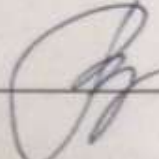
Научные руководители
д-р биол. наук, профессор

" ___ " _____ 2023 г.

 _____ М.Р. Шарипова

кан-т биол. наук,
старший науч. сотр.

" ___ " _____ 2023 г.

 _____ Н.Л. Рудакова

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор

" ___ " _____ 2023 г.

 _____ О.Н. Ильинская

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 <i>Bacillus pumilus</i> – бактерия, стимулирующая рост растений.....	8
1.2 Сидерофоры бацилл	9
1.2.1 Типы сидерофор	11
1.3 Антимикробная активность сидерофоров и потенциальное применение в сельском хозяйстве.....	13
1.4 Роль сидерофор в эволюционном взаимодействии внутри бактериального сообщества и с организмом-хозяином	14
1.5 Биосурфактанты бацилл	18
1.6 Значение биопленкообразования для PGP-штаммов бацилл	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Питательные среды и условия культивирования	25
2.2 Анализ генома.....	27
2.3 Определение роста планктонной культуры.....	27
2.4 Определение активности сидерофоров в жидкой среде.....	27
2.5 Анализ способности штамма <i>Bacillus pumilus</i> 3-19 к формированию биопленок	28
2.6 Первичный скрининг способности продуцировать биосурфактанты.....	29
2.7 Оценка антибактериальной активности.....	29
2.8 Оценка фунгистатической активности <i>Bacillus pumilus</i> 3-19	30
2.9 Статистическая обработка данных	30
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Анализ генома	31
3.2 Синтез сидерофор <i>Bacillus pumilus</i> 3-19.....	33

3.3 Оптимизация жидкой среды культивирования для продукции сидерофоров	34
3.4 Анализ способности штамма <i>Bacillus pumilus</i> 3-19 к формированию биопленок	38
3.5 Анализ способности <i>Bacillus pumilus</i> 3-19 к продукции биосульфактантов	39
3.6 Оценка антимикробной активности <i>Bacillus pumilus</i> 3-19	42
3.7 Исследование фунгистатической активности <i>Bacillus pumilus</i> 3-19	44
ВЫВОДЫ	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	49
БЛАГОДАРНОСТИ	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	51

ВВЕДЕНИЕ

В условиях постоянного роста населения мира, уменьшения площади пахотных земель и истощения генетического потенциала сельскохозяйственных культур существует настоятельная необходимость внедрения новых сельскохозяйственных технологий. Подавляющее большинство предприятий с этой целью использует синтетические пестициды и удобрения. Однако прогрессирующее изменение климата и загрязнение окружающей среды требуют разработки экологически чистых продуктов с данными свойствами [Zielewicz *et al.*, 2021]. Одним из лучших решений для безопасного внесения удобрений являются удобрения на основе бактерий, стимулирующих рост растений (PGPB) [Ćimo *et al.*, 2020].

Штаммы рода *Bacillus* – обязательные участники подавляющего большинства почвенных микробных сообществ. Они также активно взаимодействуют с растениями, продуцируя значимые метаболиты, факторы роста, фитогормоны, сидерофоры и т.д. Многие бациллы выделяют в среду ряд антимикробных компонентов, способных антагонистически взаимодействовать с фитопатогенными микроорганизмами.

Бациллы продуцируют биосурфактанты – липопептиды, эти биосурфактанты состоят из циклических пептидов, связанных цепью жирных кислот. Например, сурфактин, полученный из *Bacillus subtilis*, состоит из семи аминокислотных колец, соединенных с цепью жирных кислот посредством лактоновой связи. Среди других биосурфактантов он обладает мощной активностью поверхностно-активного вещества и обладает противомикробным свойством в отношении многих бактерий, грибов, вирусов и микоплазмы [Meena *et al.*, 2017]. Подобным биосурфактантом является и лихенизин, продуцируемый *Bacillus licheniformis* [Anuradha, 2010]

Bacillus pumilus – одна из наиболее изученных бактерий, стимулирующих рост растений. Как было показано в многочисленных исследованиях, данный вид способен вырабатывать ряд фитогормонов, среди них различные гибберелины и индолил-3-уксусная кислота (ИУК); переводить фосфорсодержащие минералы в доступные для растений формы, продуцировать дезаминазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, которая способствует снижению уровня этилена, а также фиксировать атмосферный азот [Chakraborty *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2021; Masood *et al.*, 2020; Upadhyay *et al.*, 2019].

B. pumilus традиционно считается почвенным микроорганизмом, эти бактерии локализованы преимущественно в ризосфере [Fall *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004]. Бациллы колонизируют корни и листья растений, исследования показали, что способность образовывать надежную биопленку на корнях растений коррелирует с защитой от развития болезней растений [Chen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2013; Zeriouh *et al.*, 2013].

Важной характеристикой *B. pumilus* как PGPB-штамма является потенциальная способность синтезировать сидерофоры. Основная функция сидерофор заключается в связывании железа в почве и увеличении его подвижности и биодоступности. Данный микроэлемент играет огромную роль в жизнедеятельности как растений, так и бактерий. В случае растений железо входит в состав белков электрон-транспортной цепи окислительного фосфорилирования и фотосинтеза, участвует в синтезе хлорофилла, а также служит кофактором в синтезе многих гормонов, таких как этилен и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат. У бактерий железо принимает участие в транспорте электронов, ферментативных реакциях, метаболизме кислорода, синтезе ДНК и РНК, что не только усиливает их собственный рост, но и положительно влияет на способность бактерий стимулировать рост растений.

Целью данного исследования явилась оценка потенциала природного почвенного изолята *B. pumilus* 3-19 как PGP-штамма.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

- 1) Поиск в геноме *Bacillus pumilus* 3-19 генов, ответственных за биопленкообразование, синтез сидерофоров, биосурфактантов и антимикробных соединений.
- 2) Подтвердить наличие синтеза сидерофоров у *Bacillus pumilus* 3-19 при культивировании на агаризованной среде, содержащей краситель хром азурол S (CAS агар). Оценить способность штамма *Bacillus pumilus* 3-19 синтезировать сидерофоры при культивировании на жидкой среде
- 3) Оценить способность *Bacillus pumilus* 3-19 к образованию биопленок.
- 4) Оценить способность штамма *Bacillus pumilus* 3-19 к синтезу биосурфактантов.
- 5) Оценить антибактериальную активность штамма *Bacillus pumilus* 3-19 по отношению к фитопатогенным штаммам.

ВЫВОДЫ

1) Анализ генома *Bacillus pumilus* 3-19 показал наличие у штамма гена бациллибактина – сидерофора катехолового типа, генов биосурфактантов - лихенизина, фенгицина и циттермицин А-подобного белка, а также группы генов, вовлеченных в формирование биопленок.

2) Культивирование исследуемого штамма на агаризованной среде, содержащей краситель хром азурол S (CAS агар), показало наличие синтеза сидерофоров, но на жидкой среде активности сидерофоров не обнаружилось. Вероятно, что для синтеза сидерофоров предпочтительной формой является биопленка, а не планктонная культура.

3) Оценка способности к биопленкообразованию показала, что культура *Bacillus pumilus* 3-19 активно формирует биопленки на жидких средах в диапазоне температур от 22-37°C с оптимумом в 37 °C.

4) Оценка эмульгирующей активности культуральной жидкости показала, что *Bacillus pumilus* 3-19 продуцирует биосурфактанты, причем наиболее устойчивая эмульсия образовывалась при росте на минимальной среде с крахмалом.

5) Штамм *Bacillus pumilus* 3-19 способен ингибировать рост фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* и *Xanthomonas vesicatoria*. Штамм *Bacillus pumilus* 3-19 не проявил фунгистатической активности против фитопатогенных микромицетов *Alternaria solani* и *Fusarium oxysporum*.