

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Медико-профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

*На правах рукописи*

Михайлова Анастасия Радиславовна

**Микробиологическая характеристика штамма  
*Bacillus altitudinis* API-2019**

Научный руководитель:  
Доктор биологических наук  
Профессор

Маркушева Т.В.

**Уфа-2021**

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1. БИОСУРФАКТАНТЫ - СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ .....	6
1.1.1. Классификация биосурфактантов.....	6
1.1.2. Структурно-функциональные особенности сурфактина .....	7
1.1.3. Структурно-функциональные особенности итурина.....	14
1.1.4. Структурно-функциональные особенности фенгицина .....	16
1.2. Перспективы использования биосурфактантов.....	19
1.2.1. Биосурфактанты в медицине. Потенциально новый подход к COVID-19.....	19
1.2.2. Применение биосурфактантов для решения экологических проблем .....	22
1.2.3. Промышленное применение биосурфактантов для увеличения добычи нефти .....	24
1.3. Производство микробных сурфактантов .....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	27
2.1. Объект исследования .....	27
2.2. Приготовление питательных сред для культивирования штамма <i>Bacillus altitudinis</i> . .....	27
2.3. Рост штамма <i>Bacillus altitudinis</i> в жидкой среде.....	28
2.4. Выделение препаратов ДНК .....	28
2.5. Выделение ДНК с помощью Chelex.....	28
2.6. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). .....	29
2.7. Определение эмульгирующей активности штамма <i>Bacillus altitudinis</i> API -2019 .....	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	32
ВЫВОДЫ .....	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность.**

Поверхностно-активные вещества, представляющие собой амфифильные молекулы, имеющие тенденцию накапливаться на границах раздела между жидкими фазами с разной полярностью (например, нефть-вода или воздух-вода), снижая поверхностное и межфазное напряжение, в настоящее время широко используются в сельском хозяйстве, пищевой, фармацевтической, текстильной, бумажной, нефтяной промышленности.

Большинство ПАВ синтезируются химическим путем из нефтехимических продуктов, поэтому они лишь частично поддаются биологическому разложению, вызывая пагубное воздействие на окружающую среду.

Синтезируемые микроорганизмами поверхностно-активные вещества (биосурфактанты) в настоящее время привлекают все большое внимание из-за потенциальных преимуществ по сравнению с химическими аналогами, а именно: они имеют сходные или лучшие характеристики и оказывают меньшее отрицательное воздействие на экосистемы из-за более низкой токсичности и биоразлагаемости. Как следствие, биосурфактанты могут заместить синтетические поверхностно-активные вещества во многих областях промышленности, включая производство товаров бытовой химии, косметики, пестицидов и многих других.

Несмотря на повышенный рост спроса на биологические поверхностно-активные вещества, широкое применение биосурфактантов зависит от возможности их производства в крупных масштабах. В некоторых аспектах биоПАВ неконкурентоспособны по сравнению с синтетическими с экономической точки зрения, поскольку для их производства требуются дорогие субстраты и они обладают относительно низкой производительностью, что препятствует их широкому использованию и коммерциализации.

Вместе с тем в последнее десятилетия существенные усилия были направлены на удешевление промышленного синтеза биосурфактантов, а также на поиск и изучение свойств новых микроорганизмов - продуцентов ПАВ.

**Объектом данного** исследования являлся вновь выделенный из зобика медоносной пчелы штамм продуцент сурфактантов *Bacillus altitudinis* API-2019.

**Цель исследований** - выявить гены синтеза сурфактантов в геноме штамма *Bacillus altitudinis* API-2019.

**В задачи исследования** входило:

- изучение культурально-морфологические и физиолого-биохимические характеристики *Bacillus altitudinis* API – 2019
- детекция генов сурфактантов методом ПЦР (сурфактина, фенгицина, итурина) у *Bacillus altitudinis* API-2019
- анализ эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API – 2019

В работе был использован комплекс **классических методов** микробиологии, в том числе, приготовление питательных сред для культивирования штамма, выделения препаратов ДНК, детекции генов методом ПЦР в реальном времени.

**В результате** исследования установлено, что в геноме вновь выделенного штамма *Bacillus altitudinis* API - 2019 присутствуют гены, контролирующие синтез сурфактантов, в частности ген *srfAA*, кодирующий сурфактин, ген *ituD*, кодирующий итурин, и кодирующий фенгицин ген *fend*. ПЦР анализ также обнаружил отсутствие в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 гена *sfp*, кодирующего сурфактин и гена *femb*, кодирующемого фенгицин.

**Практическое применение результатов исследования.** Полученные данные позволяют расширить ведения о продуцентах сурфактантов рода

*Bacillus*, открывают возможности применения вновь выделенного штамма в научных и промышленных целях.

# **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## **1.1. БИОСУРФАКТАНТЫ - СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ**

Микробные ПАВ - соединения, продуцирующиеся живыми микроорганизмами, которые, концентрируясь на поверхности раздела фаз, вызывают снижение поверхностного натяжения.

Низкомолекулярные вещества, названные биоПАВ или биосурфактанты, снижают межфазное поверхностное натяжение [32]. Биосурфактанты способны улучшать перенос питательных веществ через мембранны, увеличивают биодоступность гидрофобных субстратов за счет солюбилизации / десорбции.

Биосурфактанты как поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами, имеют широкий спектр применения. Они нашли широкое применение в качестве эмульгаторов для увеличения площади поверхности гидрофобных молекул, а также в качестве деэмульгаторов, смачивателей, вспенивающих и намазывающих агентов, функциональных пищевых ингредиентов и моющих средств. Способность биосурфактантов снижать межфазное поверхностное натяжение позволяет им играть важную роль в добыче нефти и биоремедиации среды от тяжелой сырой нефти [32].

### **1.1.1. Классификация биосурфактантов**

Микробные ПАВ разделены на две основные группы .

В первую входят низкомолекулярные вещества, названные биоПАВ или биосурфактанты. Группа включает молекулы, которые эффективно снижают поверхностное и межфазное натяжение.

Ко второй группе относят высокомолекулярные соединения, называемые эмульсанами, или биоэмультгаторами и представленные полисахаридами, липополисахаридами, протеинами, липопротеинами и их комплексами. Эта группа объединяет полимеры, которые более эффективны для стабилизации эмульсий типа «масло в воде».

Основные типы сурфактантов, продуцируемых микроорганизмами представлены в таблице 1[39].

### Основные типы сурфактантов и их продуценты

Microorganism	Biosurfactant type	Reference
<i>Nocardia</i> SFC-D	Trehalose lipid	Kosaric et al. 1990
<i>Rhodococcus</i> sp. H13 A	Trehalose lipid	Singer et al. 1990
<i>Rhodococcus</i> sp. ST-5	Trehalose lipid	Abu Ruwaida et al. 1991a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1	Rhamnolipid	Arino et al. 1996
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UW-1	Rhamnolipid	Sim et al. 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1	Rhamnolipid	Patel and Desai 1997
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Glycolipid	Abraham et al. 1998
<i>Tsukamurella</i> sp.	Glycolipid	Vollbrecht et al. 1998
<i>Serratia rubidea</i>	Glycolipid	Matsuyama et al. 1990
<i>Serratia marcescens</i>	Glycolipid	Pruthi and Cameotra 1997b
<i>Candida antarctica</i>	Mannosylerythritol lipids	Kitamoto et al. 1993
<i>Candida bombicola</i>	Sophorose lipid	Brakemeier et al. 1995
<i>Candida apicola</i> IMET 43747	Sophorose lipid	Hommel et al. 1994
<i>Bacillus pumilus</i> A1	Surfactin	Morikawa et al. 1992
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin	Makkar and Cameotra 1997
<i>Bacillus subtilis</i> C 9	Surfactin	Kim et al. 1997
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenysin A	Yakimov et al. 1995
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Lichenysin B	Lin et al. 1994
<i>Arthrobacter</i> sp. EK1	Trehalose tetraester	Schulz et al. 1991
<i>Arthrobacter</i> sp. MIS 38	Arthrobactin	Morikawa et al. 1993
<i>Lactobacillus</i> sp.	Surfactin	Velraeds-Martine et al. 1996b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosin	Laycock et al. 1991
<i>Streptomyces tendae</i> TU901/8c	Streptofactin	Richter et al. 1998
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan	Navon-Venezia et al. 1995
<i>Pseudomonas marginalis</i> PD 14 B	Particulate-surfactant (PM factor)	Burd and Ward 1996
<i>Pseudomonas maltophilia</i> CSV 89	Biosur Pm	Phalle et al. 1995

Табл. 1

Самое тщательное внимание привлекли к себе сурфактин, итурин, фенгицин. Сурфактин проявляет антимикробную активность против широкого спектра бактерий и грибов, в то же время он обладает противовоспалительной активностью. Итурин и фенгицин могут подавлять прорастание микросклероцитов многих грибов, но имеют узкий спектр действия в антибактериальном спектре.

### 1.1.2. Структурно-функциональные особенности сурфактина

Сурфактин, вторичный метаболит, впервые обнаруженный в культуральном бульоне *Bacillus subtilis* в 1968 г., является наиболее известным липопептидом с широким спектром антибактериальной активности.

На рисунке 1 показана химическая структура сурфактина, он имеет кольцевую пептидную цепь, содержащую семь аминокислот, и цепь β-гидрокси жирных кислот из 13–16 атомов углерода. Из-за некоторых

различий в длине цепи жирных кислот и типах аминокислот сурфактин имеет множество изоформ.

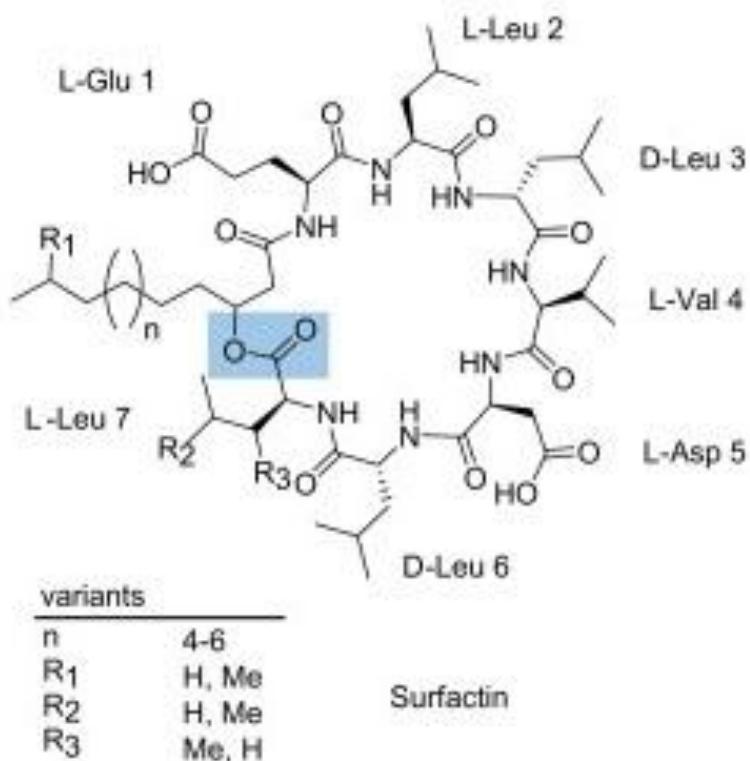


Рис 1. Структура сурфактина. Лактонная связь окрашена в голубой цвет [2]

Благодаря своей уникальной структуре сурфактин может не только снижать поверхностное натяжение воды с 72 до 27 мН / м, но также обладает высокой термической стабильностью и солеустойчивостью.

Преимуществом сурфактина, вырабатываемого микроорганизмами, является то, что белок проявляет биоразлагаемость только в условиях экстремальной температуры и pH. Сурфактин продуцируемый *B. subtilis* сохраняет свою antimикробную активность после воздействия высокой температуры, изменения pH и обработки желудочными ферментами. Примечательно, что сурфактин показывает стабильность при высоких температурах доходящих до 80-100°C, что указывает на то, что этот белок может иметь потенциальное применение в промышленном производстве.

Стабильность сурфактина можно объяснить его формой, которая придает ему плотную структуру; тем самым поддерживая баланс биоценоза в ЖКТ [51]

Биосинтез сурфактина представляет собой сложный процесс, который находится под контролем нескольких генетических локусов. Первыми из них были найдены локусы *sfp* и *srfAA*, участвующие в производстве сурфактина *Bacillus subtilis* [2]

Локус *sfp* при переносе из продуцирующего сурфактин (*Srf +*) штамма ATCC 21332 в сурфактин непродуцирующий штамм JH642 (производное стандартного штамма 168 *Bacillus subtilis*) делал клетки *Srf +* [2]. Неизвестно, выполняет ли продукт *sfp* регуляторную роль в производстве сурфактина или он кодирует фермент, завершающий путь биосинтеза сурфактина. Данные исследований Nakano[52] показали, что локус *srf* присутствует в клетках непродуцирующего штамма. Локус *srf* охватывает более 15 тысяч пар нуклеотидов ДНК, что позволяет предположить, что *srf* содержит гены, кодирующие ферменты катализирующие биосинтез сурфактина [54]

Это согласуется с наблюдением, о том, что ферменты, которые катализируют синтез пептидных антибиотиков тирокидина и грамицидина, имеют очень высокую молекулярную массу и гены, которые их кодируют, сгруппированы в большие опероны [55]

Сурфактин синтезируется большими многофункциональными NRPS (нерибосомная пептидная синтетаза), которые содержат три модуля, *SrfAA*, *SrfAB* и *SrfAC*, которые составляют линейный массив из семи модулей (по одному модулю на остаток), каждый из которых отвечает за добавление одной аминокислоты [53]

Как видно на рисунке 2, каждый модуль содержит как минимум три каталитических домена: домен аденилирования (A), домен образования пептидных связей (B) и домен эпимеризации (E). Домен аденилирования (A) отвечает за выбор и активацию субстрата, небольшой белок-носитель пептидил (PCP), который несет аминоацил-аденилатный субстрат в виде

связанного с ферментом тиоэфира и конденсации, домен (B) отвечает за образование пептидных связей между интермедиатами ацил-S-PCP. Домены эпимеризации (E) осуществляют стереохимическое преобразование с образованием d-изомера некоторых из включенных остатков. Дополнительная тиоэстераза (TE) модуля терминации катализирует высвобождение продукта путем гидролиза или макроциклизации с образованием циклических или циклических разветвленных молекул.

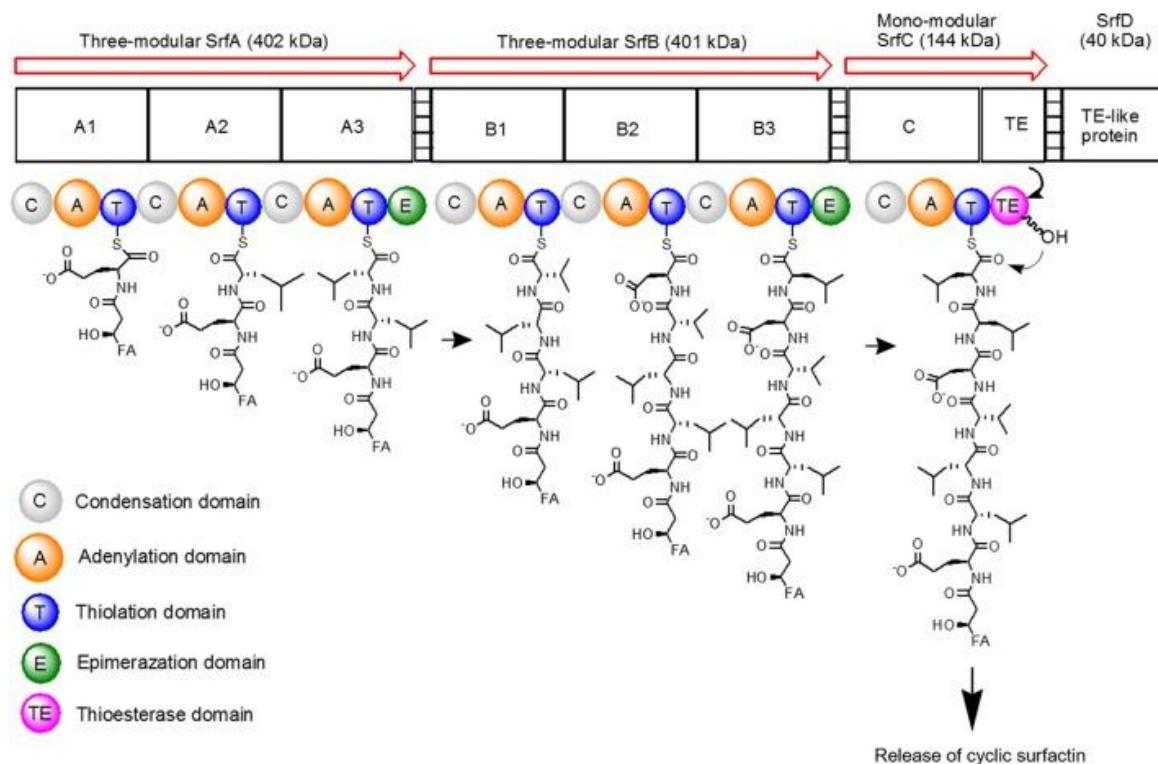


Рис 2. Схема функционирования комплекса сурфактинсинтетазы для биосинтеза циклического сурфактина. Комплекс сурфактинсинтетазы состоит из трехмодульных субъединиц SrfA, трехмодульных SrfB, мономодульных субъединиц SrfC и SrfD, которые используются для синтеза семи аминокислот сурфактина. Пептидная цепь удлиняется слева направо до тех пор, пока линейный продукт не будет циклизован TE-доменом [59]

Процесс синтеза сурфактина можно разделить на три части: инициирование синтеза, удлинение пептидной цепи и циклизация пептидной цепи. Первый модуль (C-AGlu-PCP) сурфактинсинтетазы SrfAA отвечает за реакцию липоинициации. Донорный сайт стартового С-домена имеет очень

четкую специфичность в отношении длины цепи его субстрата 3-гидроксижирной кислоты [4]

В дополнение к его роли в биосинтезе сурфактина, экспрессия гена *srfA* также коррелирует с развитием генетической компетентности *B. subtilis* в ответ на экзогенное поглощение ДНК в культурах стационарной фазы выращенных глюкозой клеток [60]. Примером является то, что пищевой стресс во время поздней экспоненциальной фазы может стимулировать глобальные регуляторные механизмы, ComP-ComA и Spo0A-AbrB, тем самым индуцируя экспрессию *srfA* [61]. Помимо этого, ген *comS*, который расположен внутри или вне каркаса гена *srfA*, также участвует в развитии компетентности *Bacillus subtilis* [61].

Синтез сурфактина инициируется под действием сигнальных молекул, что показано на рисунке 3. Основным регулятором является продукт гена *comX* [16]

ComX представляет собой модифицированный пептид из 10 аминокислот[16], используемый *Bacillus subtilis* для регуляции экспрессии генов в ответ на увеличение количества плотности клеток - это явление называется Quorum Sensing или “чувство кворума” и вызывает индукцию кворум-чувствительных генов (*srfA*). За выработку продукта ComX отвечают два регуляторных гена *comX* и *comQ* [16]

Мембранный рецептор ComP связывает ComX в высокой концентрации, аутофосфорилирует и активирует ComA [16].

Впоследствии фосфорилированный ComA (ComA-P) активирует транскрипцию оперона *srfA* после связывания с промоторной областью [17].

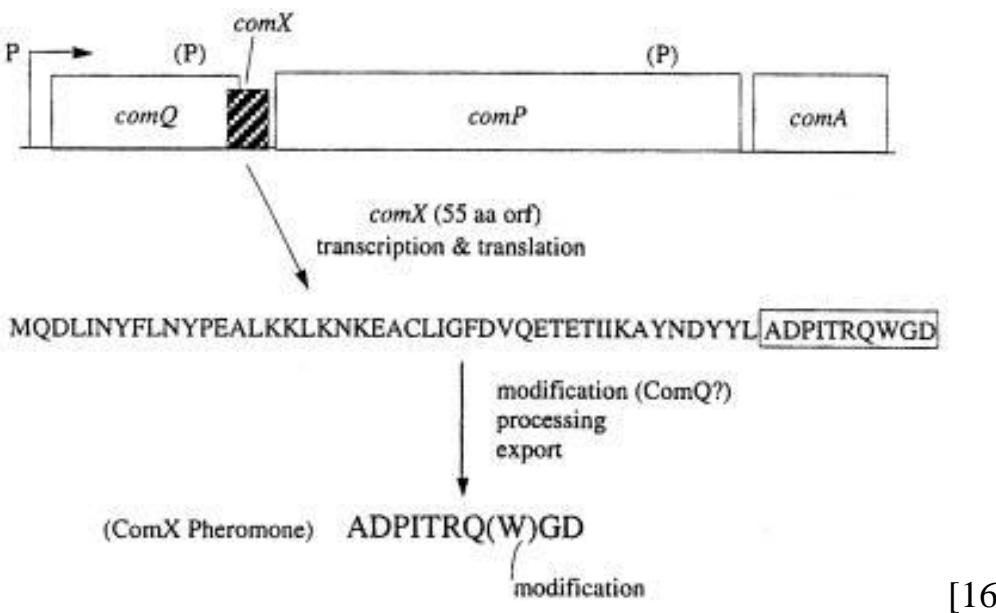


Рис. Синтез ComX. Синтез ComX требует экспрессии 55 аминокислотного предшественника (кодируемого геном *comX*), с заменой в положении 53 на триптофан. Последние 10 аминокислот, которые составляют пептидную основу ComX, помечены в последовательности. *comP* и *comA* кодируют двухкомпонентную систему, необходимую для рецепции ComX [17].

Роль сурфактина во внеклеточных взаимодействиях заключается ещё и в активации синтеза внеклеточного матрикса [18].

Сурфактин косвенно активирует мембранный гистидинкиназу KinC, что показано на рисунке 4. KinC фосфорилирует главный регулятор Spo0A, в конечном итоге приводя к продукции внеклеточного матрикса или биопленки через путь SinI-SinR[19]. Большинство клеток в популяции, по-видимому, способны продуцировать ComX, только небольшая часть клеток реагирует на сигнал, становясь продуцентами сурфактина [18].

Удивительно, но сами производители сурфактина не становятся продуцентами матрикса. Скорее, на сурфактин реагирует другая субпопуляция. Эти продуцирующие матрикс клетки становятся невосприимчивыми к сигналу ComX и, таким образом, сами не становятся продуцентами сурфактина. Резистентность к ComX обусловлена наличием самого внеклеточного матрикса[20].

Таким образом, сурфактин представляет собой паракринную сигнальную молекулу, которая запускает выработку матрикса другими клетками, не позволяя этим клеткам продуцировать сурфактин[20].

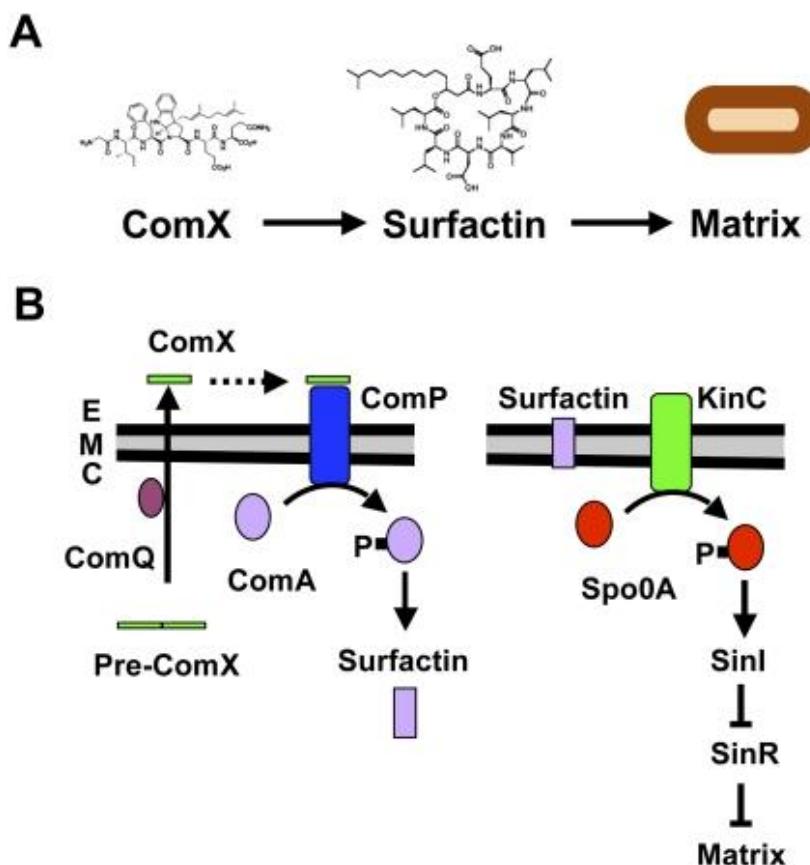


Рис. Передача сигналов участвует в формировании внеклеточного матрикса. (А) Схема потока сигнального каскада, который приводит к продукции внеклеточного матрикса биопленки у *B. subtilis*. Сигнальная молекула ComX необходима для производства сурфактина. Сурфактин, в свою очередь, запускает производство внеклеточного матрикса. Показаны структуры сигнальных молекул. (Б) Схематическое изображение соответствующих путей передачи сигнала, ведущих к продукции сурфактина (слева) и внеклеточного матрикса (справа). (Слева) Сигнальная молекула ComX, воспринимающая кворум, запускает выработку сурфактина путем фосфорилирования главного регулятора ComA через активацию мембранный киназы ComP. (Справа) молекула сурфактина, воспринимающая кворум, индуцирует фосфорилирование Spo0A через активацию мембранный киназы KinC. Spo0A индуцирует экспрессию SinI, который противодействует репрессору SinR и вызывает дерепрессию генов, участвующих в синтезе матрикса [20].

Секреция сурфактина *Bacillus subtilis* уменьшает поверхностное натяжение окружающей жидкости, облегчая движение жгутиковых и не жгутиковых бактерий при передвижении по питательной среде. Это указывает на то, что поверхностная подвижность *B. subtilis* больше зависит от выработки сурфактина, чем от наличия жгутиков. Рост биопленки подавлялся после удаления или изменения гена, ответственного за экспрессию сурфактина [20].

### **1.1.3. Структурно-функциональные особенности итурина**

Итурины являются важным классом липопептидов, которые широко изучены на предмет их антибиотической активности и производятся *Bacillus subtilis* [5]

Итурины были впервые описаны как антибиотики, продуцируемый *B. subtilis* в 1950 году и названный в честь региона Итури в Конго, где был выделен штамм[6]. Позже сообщалось, что химическая структура итурина А представляет собой циклический гептапептид с алкильной цепью[7]. Было показано, что механизм действия этих липопептидов заключается в образовании пор в клеточных мембранах[8]. Все они обладают сильной противогрибковой активностью и являются известными активными ингредиентами во многих продуктах биологической борьбы, нацеленных на грибковые патогены растений[10]. В дополнение к их противогрибковой активности, они, как было показано, вызывают у растений защитные реакции[11].

Существуют липопептиды по структуре близкородственные итуринам: микозубтилин, бацилломицин L, бацилломицин D, бацилломицин F и мохавенсин[13].

Наряду с итурином эти соединения образуют мультигенное семейство итуриновых липопептидов. Отличительной особенностью этого семейства является то, что первые три аминокислоты циклического гептапептида

являются общими для членов, тогда как остальные четыре аминокислоты являются вариабельными

В последних исследованиях Kenji Tsuge[14] был изучен оперон синтетазы итурина А RB14, а также определена его последовательность.

Оперон *iturin A* охватывает область длиной более 38 тысяч пар нуклеотидов. и состоит из четырех открытых рамок считывания, *ituD*, *ituA*, *ituB* и *ituC*. Ген *ituD* кодирует предполагаемую трансцилазу малонил-кофермента А, нарушение которой приводит к специальному дефициту продукции итурина А, и которая связана с синтезом жирных кислот. Второй ген, *ituA*, кодирует белок массой 449 кДа, который имеет три функциональных модуля, гомологичных синтетазе жирных кислот, трансферазе аминокислот и пептид синтетазе. Третий ген, *ituB*, и четвертый ген, *ituC*, кодируют пептидные синтетазы массой 609 и 297 кДа, содержащие четыре и два аминокислотных модуля соответственно. Кроме того, на С-конце *ituC* расположен TE-домен, который отвечает за циклизацию и высвобождение липогептапептидного промежуточного продукта[21,14]

Биосинтез липопептидов антибиотиков у штаммов *Bacillus* регулируется сложной метаболической системой[21]. Биосинтез итурина у штаммов *Bacillus* регулируется специфическими плейотропными регуляторами аналогично, как и биосинтез сурфактина. Было исследовано, что три плейотропных регулятора (DegU, DegQ и ComA), и два сигма-фактора ( $\sigma$ B и  $\sigma$ H) положительно регулируют активацию транскрипции промотора *bmy*, способствуя синтезу бацилломицина D - аналога итурина[25]. Было также подтверждено, что мембранный белок YczE и 4'-fosfopanteteinilтрансфераза Sfp оказывают свое влияние на синтез бацилломицина D посттранскрипционным образом[26]. Недавнее исследование показало, что уровень экспрессии AbrB и PhrC снижался с увеличением продукции бацилломицина[27].

Также было проведено исследование противогрибковых свойства штамм *Bacillus altitudinis* ZJ 186[15]. Фильтрат из культурального бульона

штамма ZJ 186 показал сильное ингибирование роста против всех испытанных штаммов грибов *Magnaporthe Oryzae* являющихся возбудителями пирикуляриоза риса. Подавление роста грибов было связано с присутствием итурина в ферментном бульоне [15].

К настоящему времени описано несколько штаммов, продуцирующих итурин A, включая *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus methyltrophicus*[22][23][24].

#### **1.1.4. Структурно-функциональные особенности фенгицина**

Фенгицин, циклический липопептид, продуцируемый штаммом *Bacillus subtilis*, содержащий β-гидроксижирную кислоту с длиной боковой цепи 16-19 атомов углерода[56].

Фенгицин, как и итурин, проявляет сильную противогрибковую активность, особенно в отношении нитчатых грибов, включая *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerell pinodes* и *Fusarium moniliforme*[35]. Противогрибковая действие фенгицина дополнительно повышается в присутствии других липопептидов-сурфактина и итурина. Однако фенгицин совершенно неэффективен против бактерий [35]. Фенгицин взаимодействует с грибами, вызывая различные морфологические изменения, в том числе скручивание и/или разрыв гифы. Последнее потенциально объясняет эффективность фенгицина против нитчатых грибов, поскольку гифы являются основным способом их вегетативного размножения. Кроме того, фенгицин может образовывать комплексы со стероидами, которые являются важной органической молекулой, жизненно важной для структуры и функции клеточных мембран [35]. Также имеет гемолитическую активность в 40 раз ниже, чем сурфактин [35]. Компоненты фенгицина представляют собой липопептиды.

Фенгицин, липопептидный антибиотик, синтезируется мультикомплексной нерибосомной-пептид-синтетазой - NRPS, состоящей

из 5 синтетаз: FenC, FenD, FenE, FenA и FenB[57]. Мультикомплекс кодируется фрагментом ДНК длиной 37 тысяч пар нуклеотидов. Эти синтетазы фенгицина сцепляются с образованием цепи, которая скручивается в структуру 14,5 нм. Структура фенгицина представлена на рисунке 6. В этой цепи фенгицин-синтетазы связаны в порядке FenC-FenD-FenE-FenA-FenB посредством взаимодействий между C-концевой областью вышестоящего фермента и N-концевой областью его нижележащего партнерского фермента [30]. FenB фермент отвечает за аденилирование изолейцина и за связывание аминокислоты с ее кофактором, 4'-fosфопантетеином, что свидетельствует о том, что FenB участвует в активации последней аминокислоты пептида фенгицина. FenE1 активирует L-глу, а FenE2 активирует L-ала, L-вал и L-аминомасляную кислоту, что указывает на то, что FenE активирует пятую и шестую аминокислоты в фенгицине[29]. Ген FenD кодирует фермент, который включает два модуля, активирующих аминокислоты, FenD1 и FenD2, которые активируют L-тиroxин и L- треонин и соответственно третью и четвертую аминокислоты в фенгицине[30]. FenC белок содержит два модуля активации аминокислот, FenC1 и FenC2, которые активируют L-глутаминовую кислоту и L-орнитин соответственно, а его матричная ДНК является инициирующим кодоном трансляции[31].

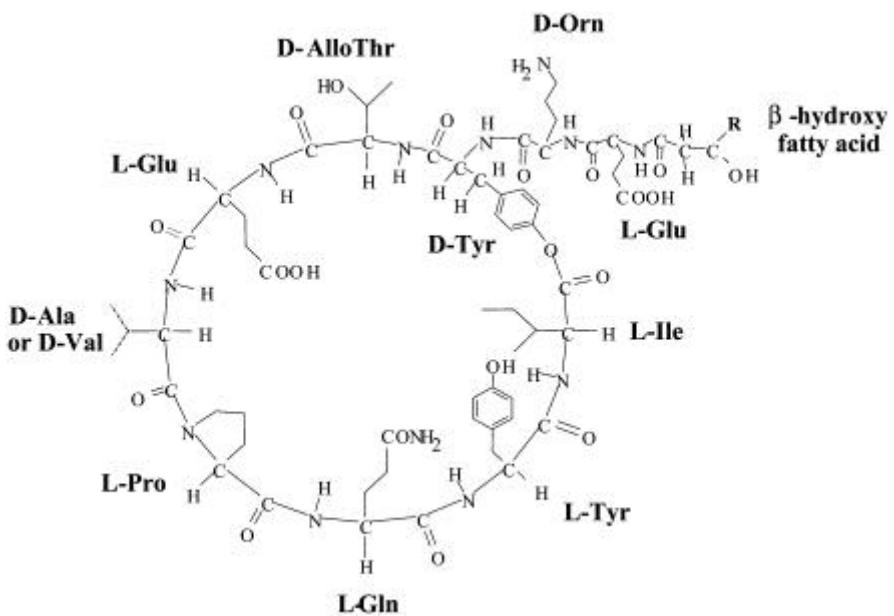


Рис 6. Первичная циклическая структура фенгицина А. Структура, содержащая пептидную цепь из десяти аминокислот и цепь  $\beta$ -гидрокси жирной кислоты, которая может варьироваться в зависимости от изомера фенгицина от C-14 до C-17 атомов углерода. В структуре аминокислот шесть L-аминокислот (Glu, Glu, Pro, Gln, Тир и Ile) и четыре D-аминокислоты (Tyr, Orn и Thr, Ala).

Генетические исследования позволили, предложить ряд праймеров для ПЦР скрининга сурфактина, итурина, фенгицина[28].

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ

	Ген	Последовательность праймеров	Размер (bp)	Темп. Отжига (°C)
Surfactin	<i>sfp</i>	F-5'ATGAAGATTACCGAATTAA 3' R-5'TTATAAAAAGCTCTCGTACG 3'	675	50
	<i>srfAA</i>	F-5'TCAGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5'CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3'	201	60
Fengycin	<i>femB</i>	F-5'CCTGGAGAAAGAATATAACGTACCCY 3' R-5'GCTGGTTCAAGTT KGATCACAT 3'	670	57
	<i>femD</i>	F-5'GGCCCCTCTCTAAATCCAT 3' F-5'GTCATGCTGACGAGAGCAAA 3'	269	60
Iturin A	<i>ituD</i>	F-5' TTGAA YGTCAGYGCSCCTT 3' R-5' TGCGMAAATAATGGSGTCGT 3'	482	57

**1.2. Перспективы использования биосурфактантов.**

В последние годы благодаря своим уникальным свойствам, таким как специфичность, низкая токсичность и относительная простота получения, эти поверхностно-активные биомолекулы привлекли широкий интерес. Биосурфактанты как поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами, имеют широкий спектр применения. Благодаря своим уникальным функциональным свойствам биосурфактанты используются в нескольких отраслях промышленности, включая фармацевтическую, пищевую, химическую, нефтяную и горнодобывающую отрасли, металлургию.

**1.2.1. Биосурфактанты в медицине. Потенциально новый подход к COVID-19.**

Биосурфактанты используются в медицине благодаря их бактерицидной, вирулицидной и фунгицидной активности, которая, среди прочего, измеряется с точки зрения минимальной ингибирующей

концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК). Софоролипиды из *Candida bombicola* подавляли рост бактерий *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, а также *Staphylococcus aureus* ATCC 6358 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Биосурфактант, продуцируемый *Pediococcus dextrinicus* SHU1593, показал антибактериальную активность против *Enterobacter aerogenes* и *Escherichia coli* в концентрации 25 мг / мл. Эти биомолекулы проявляют аналогичную или лучшую антимикробную активность по сравнению с синтетическими антибиотиками, возможно, из-за их самоассоциации и образования пор в структуре клеточной мембранны. Например, биосурфактант (гликолипид) из *Streptomyces* sp. MAB36 проявлял аналогичную противогрибковую активность против *Aspergillus niger* и *Candida albicans* по сравнению с синтетическим нистатином.

В другом исследовании было обнаружено, что обычный антибиотик, хлорамфеникол, менее эффективен против *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* по сравнению с биосурфактантом, продуцируемым *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08 [44].

Кроме того, некоторые биоповерхностно-активные соединения обладали значительной антиадгезивной и антибиотикопленочной активностью. Изучена антибиотикопленочная активность биосурфактанта гликолипида, produцируемого *Brevibacterium casei* MSA19 [42]. Биосурфактант удалял предварительно сформированные биопленки всех протестированных штаммов патогенных микробов при применении в концентрации 30 мкг / мл. Точно так же биосурфактант лунасан, продуцируемый *Candida sphaerica*, использовали в качестве антиадгезивного агента в концентрации 10 мг / мл для предотвращения образования биопленок *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus* sp. Было зарегистрировано примерно 80–92% ингибирования роста [43], тогда как биосурфактант руфизан проявлял антиадгезионную активность против большинства протестированных микроорганизмов, включая *Streptococcus sanguis*,

*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* J22, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mutans*.

Биосурфактанты были выделены как потенциальные противораковые агенты, мешающие процессам развития рака. Эти метаболиты участвуют в нескольких этапах клеточного развития. Например, сурфактин обычно используется в качестве потенциального противоракового средства против многих линий раковых клеток. Было обнаружено, что итурин А, продуцируемый *Bacillus megaterium*, значительно снижает пролиферацию и ингибирует сигнальные молекулы гена Akt, что приводит к индукции апоптоза в клетках рака молочной железы [45]. Кроме того, липопептид сомоцистинамид А, секretируемый *Lyngbya majuscula*, продемонстрировал заметную цитотоксичность в отношении клеток рака легких, груди и простаты [46].

Наблюдалось, что сурфактин BS из *Bacillus subtilis* подавляет индуцированные липополисахаридом сигнальные пути, нарушает функцию макрофагов и экспрессию IL-12, снижает экспрессию белка TLR-4 с усилением противовоспалительного эффекта и подавлением “цитокинового шторма” [40]. Сурфактин из *Staphylococcus aureus* значительно снижал количество провоспалительных цитокинов, блокировал индуцированный липотеихоевой кислотой сигнальный путь, увеличивал фосфорилирование STAT-3 и блокировал экспрессию гемоксигеназы-1 (НО-1). Установлено, что сурфактин обладает противовоспалительным и нейропротективным действием [41]. Природа биосурфактантов, существующих в виде мицелл, может быть эффективной системой доставки лекарств при лечении инфекции SARS-CoV-2. Кроме того, биосурфактанты не влияют на репликацию вируса, но могут инактивировать вирусные эффекты до адсорбции или проникновения.

## **1.2.2. Применение биосурфактантов для решения экологических проблем**

Специфика и доступность сырья также сделали биосурфакткнты наиболее предпочтительными поверхностно-активными веществами [33] в комплексе методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов — растений, грибов, насекомых, червей и других организмов, получившем название биоремедиация.

Биоремедиация в целом направлена на обеспечение рентабельных, специфичных для загрязняющих веществ обработок для снижения концентрации отдельных или смешанных загрязнителей окружающей среды. Биосурфактанты могут использоваться для очистки окружающей среды путем регулирования биодеградации и детоксикации загрязнителей промышленных стоков, а также для биоремедиации загрязненной почвы.

Присутствие в морской воде микроорганизмов, разлагающих углеводороды, делает биодеградацию одним из наиболее эффективных методов удаления загрязняющих веществ [34].

Несколько аварийных разливов нефти в прошлые годы привели к значительному загрязнению океанов и прибрежной среды. Разлив нефти в Мексиканском заливе 20 апреля 2010 года - приблизительно 672 000 тонн достигли моря. Помимо этого случайного разлива, преднамеренные выбросы нефти также вызвали значительное загрязнение. Такие инциденты активизировали попытки разработать различные химические вещества, процедуры и методы борьбы с нефтяным загрязнением как в море, так и на береговой линии. Биосурфактанты были применены к частям разлива нефти Exxon Valdez. Способность биосурфактантов эмульгировать смеси углеводородов с водой усиливает разложение углеводородов в окружающей среде.

Нефтяное загрязнение является одним из ведущих факторов антропогенного воздействия на водные экосистемы. Ежегодно в Мировой океан попадает по разным оценкам от 0,5 до 11 млн. т нефти и нефтепродуктов. Нефть, попадая в водный объект, достаточно быстро (часы и сутки) распределяется на агрегатные фракции (формы нахождения), одной из которых является пленка. Она тонким слоем локализуется на поверхности, приводя к нарушению газо-, энерго-, тепло и влагообмена между атмосферой и гидросферой[36]. Это не только негативно сказывается на физических, химических и гидробиологических условиях водной среды и жизнедеятельности ее обитателей, но и способно серьезно повлиять на климат и кислородный баланс в атмосфере Земли, а значит, ухудшить экологическую обстановку на планете в целом и жизнь человека в частности.

Самоочищение поверхностных вод от нефтяного загрязнения протекает под действием физических, химических и биологических факторов. Однако за счет первых двух происходят лишь частичные изменения в составе нефти и нефтепродуктов без полной деструкции. Ведущее место в процессе самоочищения водоемов принадлежит биологическим факторам, среди которых решающую роль играют нефтеокисляющие микроорганизмы. Благодаря их деятельности нефть трансформируется до простых соединений, происходит накопление нового органического вещества и дальнейшее включение его в круговорот углерода в водоемах. На этом основан метод биологической очистки с применением препаратов, содержащих УОМ[36]

Перспективным направлением очистки водных поверхностей и промышленных сточных вод от нефти и нефтепродуктов является использование биосорбентов, т.е. носителей с иммобилизованными на его поверхности микроорганизмами. Носитель защищает клетки от прямого воздействия токсичных веществ и неблагоприятных внешних факторов (температура, кислотность, концентрация электролитов), что позволяет иммобилизованному УОМ в течение длительного времени сохранять жизнеспособность и метаболическую активность[37]. Кроме того, благодаря

иммобилизации собирается значительное количество биомассы и предотвращается ее вынос при поступлении большого объема воды в очистные сооружения. Актуальным является разработка биосорбентов, обладающих способностью к повышенной концентрации растворенных и эмульгированных углеводородов в твердой фазе. Дальнейшая деструкция локализованных загрязнителей нефтеокисляющей микробиотой, иммобилизованной на носителе, обеспечивает эффект саморегенерации сорбента.

### **1.2.3. Промышленное применение биосурфактантов для увеличения добычи нефти**

Биосурфактанты имеют высокий потенциал в области микробиологического повышения нефтеотдачи (МПН). Были разработаны методы повышения нефтеотдачи пластов для извлечения нефти, оставшейся в пластах после первичных и вторичных процедур добычи. Нефть как невозобновляемый ресурс будет постепенно уменьшаться по мере ее непрерывной разведки. Для разведки нефтяных месторождений на месторождениях нефти обычно используются три метода: первичный (5–10%), вторичный (30–40%) и третичный, который также называется повышенной нефтеотдачей (EOR)[39]. После первичной и вторичной разведки примерно 50% нефти остается под землей и эта технология третичного восстановления использует микроорганизмы и/или их метаболиты для извлечения остаточной нефти. При МПН стимулируется рост микроорганизмов в резервуарах для производства полимеров и поверхностно-активных веществ, которые снижают поверхностное натяжение на границе нефть-порода. В результате чего уменьшаются капиллярные силы, препятствующие продвижению нефти через поры породы.

## **1.3. Производство микробных сурфактантов**

Микробные поверхностно-активные вещества производятся внеклеточно в водной среде или внутриклеточно в присутствии

водорастворимых или водонерастворимых субстратов посредством de novo. Производство этих биомолекул зависит от соответствующего выбора микробных штаммов, типа субстрата и технологии ферментации.

Параметры биопроцесса, включая источники углерода и азота, температуру, pH, ионы металлов, скорость перемешивания и т.д., влияли на рост микроорганизмов для производства поверхностно-активных веществ. Взаимодействие этих параметров друг с другом влияет на кинетику продукции.

Источники углерода включаемые в среду подразделяются на водорастворимые (например, глюкоза, сахароза, глицерин) и нерастворимые в воде (кокосовое масло, растительные масла) и влияют на состав биоПАВ. Однако среди источников углерода глюкоза для микроорганизмов является первостепенной. Было доказано что синтез биосурфактанта *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7815 при культивировании на средах содержащих глюкозу, глицерин, фруктозу и крахмал, был максимальным на среде с глюкозой[46].

Govindammal и Parthasarathi [48] исследовали влияние глюкозы, субстратов на нефтяной основе, отработанного обжаренного растительного масла и кокосового жмыха на производство биосурфактанта у *Pseudomonas fluorescence* MFS03, выделенной из почвы мангровых лесов. Сообщалось, что растительное и кокосовое масла являются многообещающими субстратами для производства биосурфактантов. Зарегистрированные результаты показали 10–12-кратное увеличение выхода рамнолипида при использовании растительного масла вместо глюкозы в качестве единственного источника углерода. В результате было предложено использовать растительное масло в качестве недорогого субстрата для производства биосурфактантов . Растительное масло представляет собой один из первых субстратов, обеспечивающих высокий выход биосурфактантов[49].

Из источников азота использовались NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O. Нитрат натрия был самым эффективным по сравнению с другими источниками по результатам производства рамнолипидов до 3,16 г/л. Кроме

того, добавление аминокислот (таких как аспарагиновая кислота, аспарагин, глицин и глутаминовая кислота) в питательную среду усиливает производство биоповерхностно-активного вещества микробами. Это заметно в двухкратном и четырехкратном увеличении выхода лихенизина А, вызываемого *Bacillus licheniformis* BAS50, после добавления L-глутаминовой кислоты и L-аспарагина, соответственно, в питательную среду[50].

В недавних исследованиях было обнаружено, что *Bacillus subtilis* НН2 показывает лучший рост в глюкозной среде, сопровождающейся низкой экспрессией сурфактина. И наоборот, при повышенной концентрации целлюлозы (0,33% целлюлозы и 0,67% глюкозы) экспрессия сурфактина увеличивалась. Предыдущие исследования показали, что рост колоний в условиях стресса, например, в присутствии клетчатки, высокой температуры и повышенной соли, может привести к селективной активации некоторых генов, которые вызывают синтез сурфактина. К защитным эффектам относят секрецию антибиотиков и иных химических веществ угнетающих микробы конкуренты. В целлюлозной среде *Bacillus subtilis* НН2 может увеличить экспрессию сурфактина для ингибирования других бактерий и уменьшения конкуренции[51].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм *Bacillus altitudinis* API -2019, выделенный из зобика медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. *Bacillus altitudinis* - относится к роду *Bacillus*, является грамположительной, мезофильной, галофильной, подвижной, аэробной, палочковидной формы бактерией. Культуральные свойства: размеры колоний варьируют от 2 до 5 мм, круглой формы, белого цвета, блестящая, непрозрачная, с гладким краем, гладкой и выпуклой поверхностью. Рост по штриху сплошной с волнистым краем, практически не расплывающийся. Границы роста расположены в пределах от 10<sup>0</sup>С до 45<sup>0</sup>С. Растут на питательном агаре. Устойчивы в 2% NaCl, а также в пределах pH[5] – pH[8]

### 2.2. Приготовление питательных сред для культивирования штамма *Bacillus altitudinis*.

Для выделения чистой культуры *B. altitudinis* использовали жидкую тиогликолевую среду и кровяной агар.

Состав (г/л) тиогликолевой среды: гидролизат казеина – 15,00; дрожжевой экстракт – 5,00; глюкоза – 5,50; NaCl – 2,50; L-цистин – 0,50; натрия тиогликолят – 0,50; резазурин – 0,001; агар-агар – 0,75.

Состав кровяного агара (г/л): настой говяжьего сердца – 500,00; триптона – 10,00; NaCl – 5,00; агар-агар – 15,00. Приготовление в 1000 мл дистиллированной воды размешали 40,0 г порошка. Прокипятили до растворения частиц, при 121 °С автоклавировали в течение 15 мин. После того как остудили до 50 °С добавили до 5% дефибринированную кровь. Перемешали и разлили в чашки Петри.

#### Методы посева бактерий

При посеве культуры бактериологической петлёй методом истощающего штриха накопительную культуру отбирают петлёй. Затем на поверхности плотной среды делают штрихи по площади первого сектора чашки Петри, далее второго, третьего и т.д. Перед каждым новым штрихом

бактериальную петлю стерилизуют в пламени горелки (Нетрусов и др., 2005). Чашки помещают в термостат и через определенное время проводят визуальный анализ посевов (Нетрусов и др., 2005).

Для оживления штамма во флакон добавляют жидкую тиогликоловую среду и инкубируют 24 ч. в термостате при 37 °С. Далее проводят визуальный анализ посевов (Рис.1).

Посевы газоном производили на плотную питательную среду в чашке Петри по методу Дригальского. Приоткрыв крышку, вносили посевной материал на поверхность питательной среды, тщательно втирали посевной материал круговыми движениями в пламени горелки (Нетрусов и др., 2005).

### **2.3. Рост штамма *Bacillus altitudinis* в жидкой среде**

Для получения биомассы штамма *Bacillus altitudinis* засевали в колбы, в которые внесли по 10 мл среды LB. Посевы инкубировали в термостатированном шейкере 18-20 часов. После инкубирования из каждой колбы взяли по 1000 мкл, для выделения ДНК. Культуральную жидкость использовали для изучения эмульгирующей активности.

### **2.4. Выделение препаратов ДНК**

Препараты ДНК выделяли способом, описанным Llop P. 1 мл бактериальной суспензии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера для экстракции (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP). После встряхивания, пробирки центрифугируем в течение 5 мин при 5000 об/мин. В новые пробирки переносили 450 мкл, в которые далее добавляли 450 мкл изопропанола. Проводили осаждение в течении 1 часа, после этого центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Полученный осадок ДНК высушивали и ресуспендировали в 200 мкл дистиллированной воды.

### **2.5. Выделение ДНК с помощью Chelex.**

В пробирку внесли 200 мкл Chelex и 50 мкл исследуемого образца. Ресуспендировали и инкубировали в термостате 10 мин при температуре 95°C. После перемешивания на вортексе центрифугтировали при 12 000

об/мин в течение 5 мин. Супернатант использовали для дальнейшего анализа методом ПЦР.

## **2.6. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).**

В основе ПЦР лежит естественный для клеток процесс репликации (процесс удвоения молекулы ДНК). Полимеразная цепная реакция была предложена американским ученым Кэри Мюллисом в 1983-1984 гг. ПЦР проводится в реакционной смеси содержащей: анализируемый образец, праймеры, Таq-полимеразу, смесь dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфат), буфер, деионизованную воду.

Процесс амплификации включает несколько циклов, состоящих из трех этапов:

1. Денатурация – процесс разрушении водородных связей между двумя цепями ДНК в результате которого происходит переход ДНК из двухнитевой в однонитевую форму. Нагревают дцДНК до 94 – 96 °С на 0,5-2мин.

2. Отжиг – производится при снижении температуры для того, чтобы праймеры присоединились к оцДНК-мишени. Праймеры подбираются к определенному участку ДНК по принципу комплементарности. При отжиге реакционную смесь охлаждают примерно до 55 °С. Если температура подобрана неправильно, то праймеры могут плохо связаться с матрицей, а также возможно появление неспецифических продуктов.

3. Элонгация – достраивание второй цепи ДНК. Таq-полимераза при 72 °С начинает репликацию второй цепи от 3'-конца праймера с использованием dNTP.

Циклический процесс амплификации повторяется многократно (30 и более). Количество реплицированных копий ДНК удваивается на каждом цикле.

Табл. 2

## Параметры программы амплификации ДНК

	Температура	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	95 °C	3 мин	1
Денатурация	94 °C	1 мин	35
Отжиг	предложенная для праймера °C	30 с	
Элонгация	70 °C	45 с	
Финальное удлинение	70 °C	10 мин	1

ПЦР в реальном времени проводили согласно инструкции производителя набора реагентов производителя СИНТОЛ Смесь для РТ-ПЦР.

Для обнаружения генов сурфактантов у *Bacillus altitudinis* методом ПЦР выбраны праймеры генов сурфактина, фенгицина, и итурина

Табл. 3

## Праймеры для скрининга сурфактантов методом ПЦР

	Ген	Последовательность праймеров	Размер (bp)	Темп. Отжига (°C)
Surfactin	<i>sfp</i>	F-5'ATGAAGATTACCGAATTAA 3' R-5'TTATAAAAAGCTCTTCGTACG 3'	675	50
	<i>srfAA</i>	F-5'TCGGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5'CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3'	201	60
Fengycin	<i>fengB</i>	F-5'CCTGGAGAAAGAATATACCGTACCY 3' R-5'GCTGGTTCAAGTT KGATCACAT 3'	670	57
	<i>fengD</i>	F-5'GCCCGTTCTCTAAATCCAT 3' F-5'GTCATGCTGACGAGAGCAAA 3'	269	60
Iturin A	<i>ituD</i>	F-5' TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT 3' R-5' TGCGMAAATAATGGSGTCGT 3'	482	57

Ход работы:

1. Пробирки с растворами dNTP, праймеров, Таq-полимеразы расположить для разморозки в штативе. Затем осторожно перемешать на вортексе.

2. Взять необходимое количество стерильных пробирок для ПЦР с выгнутой крышкой объемом 0,2 мл, сделать маркировку и расставить их в штативе в определенном порядке.

3. Приготовить смесь для проведения ПЦР (на 1 пробирку): реакционная смесь – 10 мкл, mQ – 9 мкл, праймер – по 2 мкл, исследуемый образец – 3 мкл (используя для каждой пробирки отдельный наконечник с фильтром).

4. Провести ПЦР в соответствующем режиме.

5. Провести сравнительный анализ полученных результатов ПЦР.

## **2.7. Определение эмульгирующей активности штамма *Bacillus altitudinis* API -2019**

Активность эмульгирования штамма *Bacillus altitudinis* измеряли по методике Rosenberg, а также методом Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987). В мерные пробирки с притертymi пробками объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл культуральной жидкости. Содержимое пробирок перемешали на вортексе на максимальной скорости в течение 2 мин. Спустя 24 ч после проведения эксперимента по формуле рассчитывали индекс эмульгирования как отношение объема плотной эмульсии, которая образуется при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объему раствора, умноженному на 100%:

$$E_{24} = V_e/V * 100\%, \text{ где}$$

$E_{24}$  – индекс эмульгирования, %;

$V_e$  – объем плотной эмульсии, мл;

$V$  – общий объем раствора, мл.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде исследований было показано, что в медовом зобике медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. содержатся бактерии, обладающие спектром сурфактантов с антимикробной активностью, направленной против патогенных для пчел и человека микроорганизмов.

В настоящее время ПЦР - анализ генетических детерминант, контролирующих синтез сурфактантов с антибиотическими свойствами группы сурфактина, итурина и фенгицина у бактерий неисследованных групп пчел, позволяет не только получить сведения об особенностях микробиоты современной медоносной пчелы, но и создает перспективу их практического применения в борьбе с патогенами, в том числе устойчивыми к современным антибиотикам.

На первом этапе работы гены биосинтеза сурфактина, итурина и фенгицина в геноме вновь выделенного из медового зобика штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 исследовали с помощью ПЦР с использованием сравнительного анализа амплификаторов с помощью электрофореграммы.

На рис. 7 видно, что в ходе исследования были идентифицированы целевые амплификаторы размером 201 п.н. в случае проведения полимеразной цепной реакции с праймерами к гену *srfAA*, контролирующему синтез сурфактина.

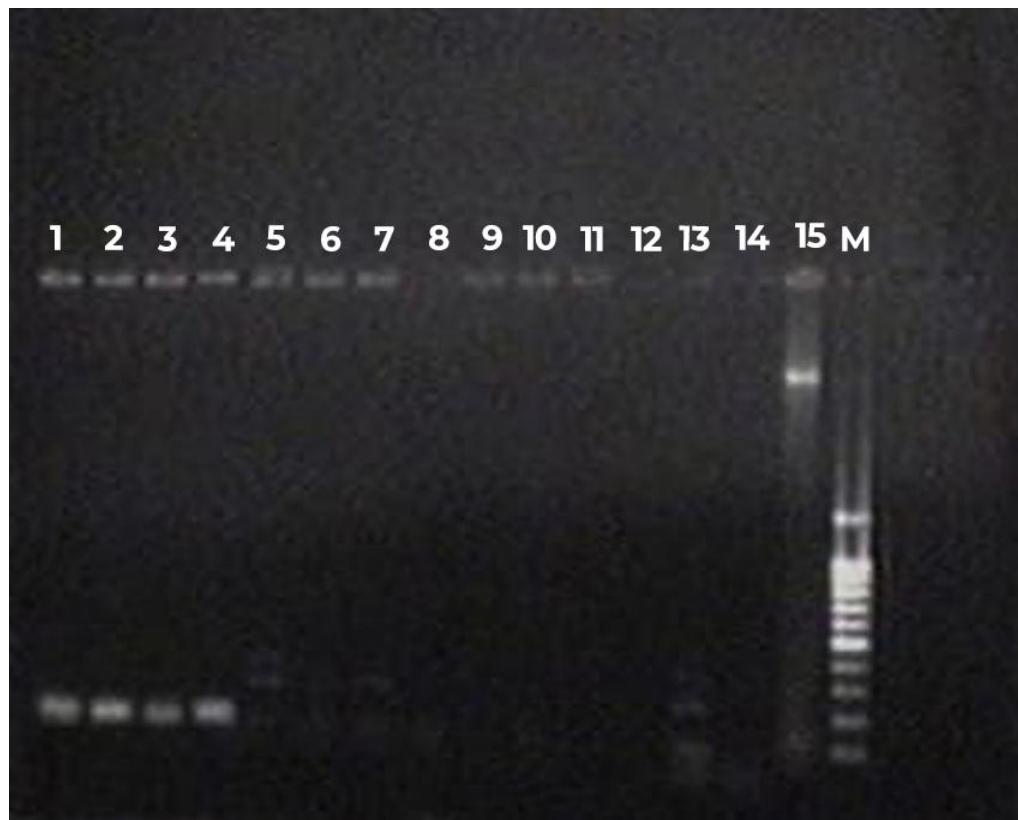


Рис 7. Электрофореграмма ПЦР – продуктов. Условные обозначения: образец 1-4, ген *srfAA*; образец 5-7, *fenD*; образец 8, контрольный образец; образец 9-11, *ituD*; образец 12-14, *fenB*; образец 15, ДНК *Bacillus altitudinis*; образец 16, маркер 100+ bp DNA Ladder.

Электрофореграмма, представленная на рис. 8, показывает, что при использовании праймеров гена *fenD*, контролирующего синтез фенгицина, накапливались искомые ПЦР-продукты длиной 269 п.н.

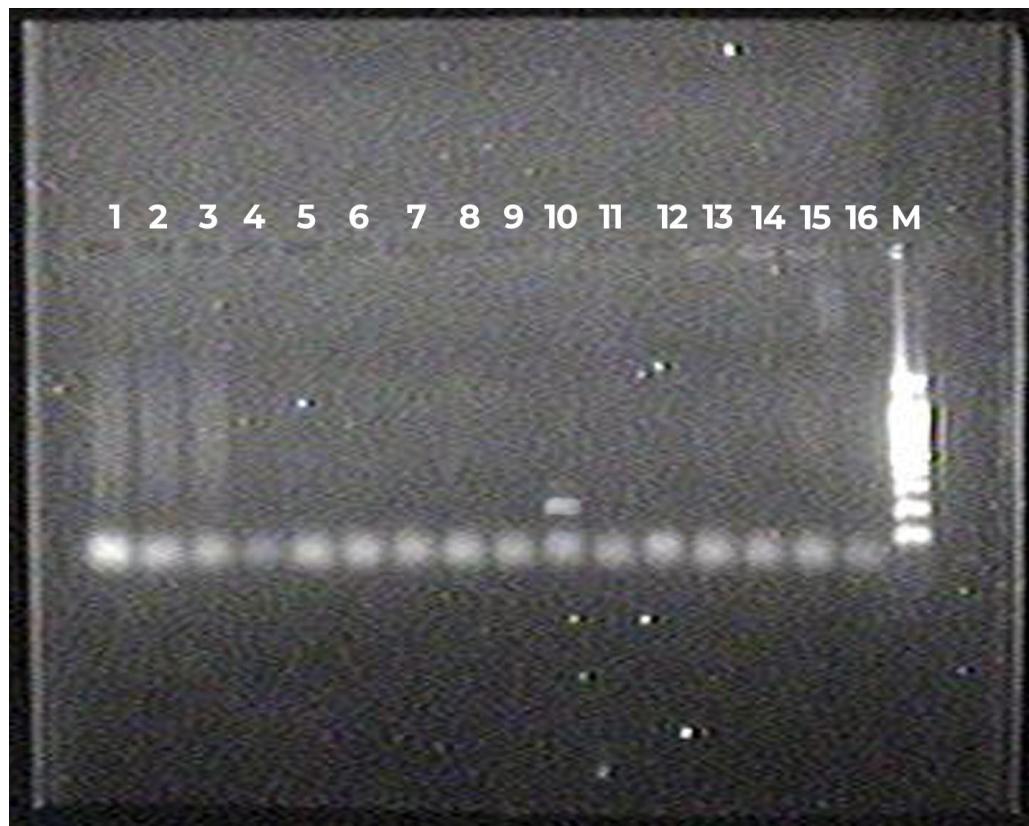


Рис 8. Электрофореграмма ПЦР – продукта. Условные обозначения: образец 1-4, ген *srfAA*; образец 5-7, *fenB*; образец 8-10, *fenD*; образец 11-13, *sfp*; образец 14-15, *ituD*; образец 16, маркер 100+ bp DNA Ladder

Анализ электрофореграммы на рис. 9 позволяет обнаружить присутствие синтезированных с участием праймера к гену итурина *ituD* фрагментов ДНК длиной 482 п.н., указывающих на присутствие в пробе гена биосинтеза итурина.



Рис 9. Электрофорограмма ПЦР – продукта. Условные обозначения : образец 1-2, ген *fenB*; образец 3-4, *ituA*; образец 5-6, *srfAA*; образец М, маркер 100+ bp DNA Ladder

Полученные данные ПЦР анализа свидетельствуют в пользу того, что в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 присутствуют гены биосинтеза нескольких сурфактантов, а именно, сурфактина *srfAA*, фенгицина *fenD* и итурина *ituD*.

В ходе дальнейшей работы скрининг генов биосинтеза сурфактина, итурина и фенгицина в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 проводили с помощью ПЦР в реальном времени.

В ходе анализа подъем кривых до 30 цикла при отсутствии их подъема у контроля считали за положительный результат.

При совпадении роста кривой с контрольной пробой и подъёме кривых после 30 цикла результат считался отрицательным.

На рис 10 представлены графики накопления амплификаторов генов биосинтеза сурфактина *srfAA* и фенгицина *fenD* штамма *Bacillus altitudinis* API-2019.

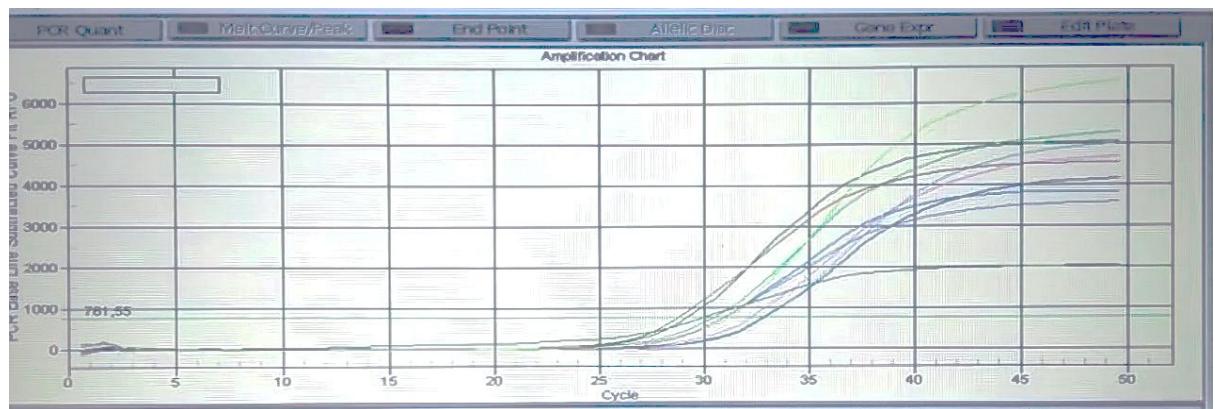


Рис 10. Графики накопления амплификаторов генов *srfAA* и *fenD* штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 .

Из графиков, представленных на рис. 11, становится понятным характер накопления амплификаторов гена *ituD* штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 в режиме ПЦР в реальном времени .

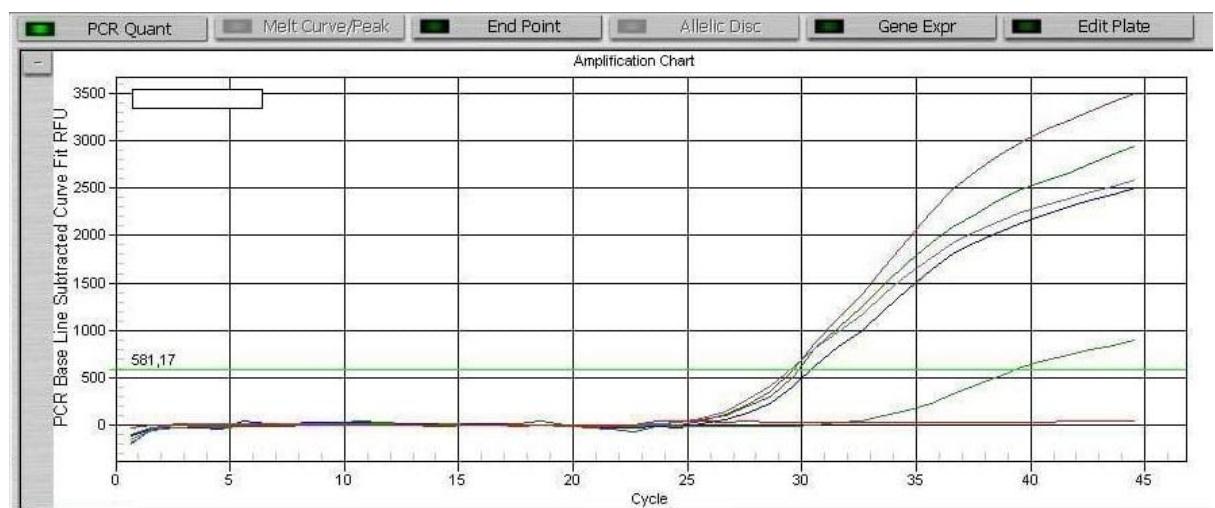


Рис 11. Графики накопления амплификаторов генов *ituD* штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 в режиме ПЦР в реальном времени

Графики, представленные на рис. 12 и 13, показывают особенности накопления амплификаторов с праймерами генов *sfp* (рис 12) и *fenB* (рис.13).

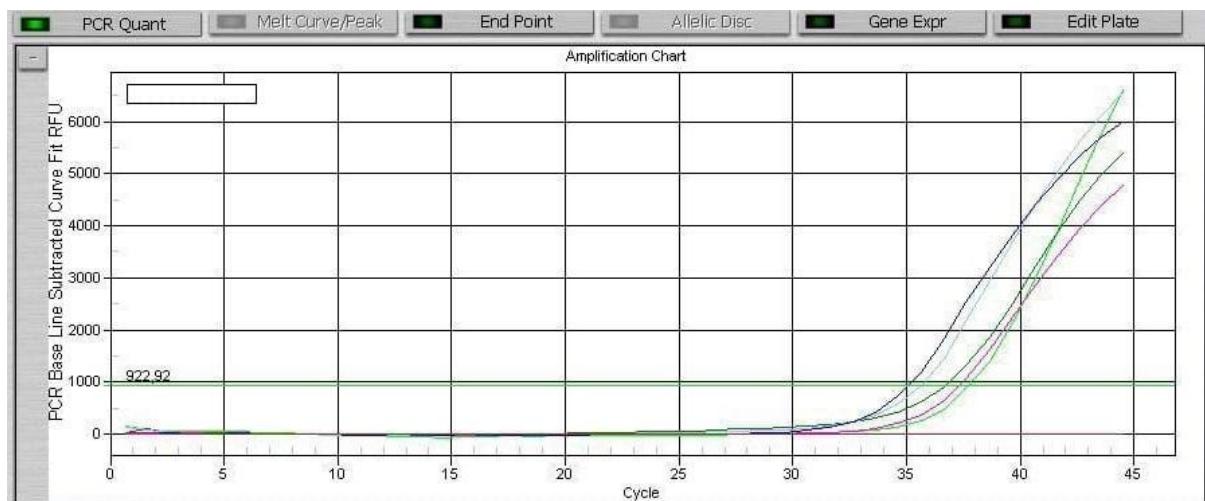


Рис 12. Графики накопления амплификаторов при использовании праймеров гена *fenB* у штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 в режиме ПЦР в реальном времени.

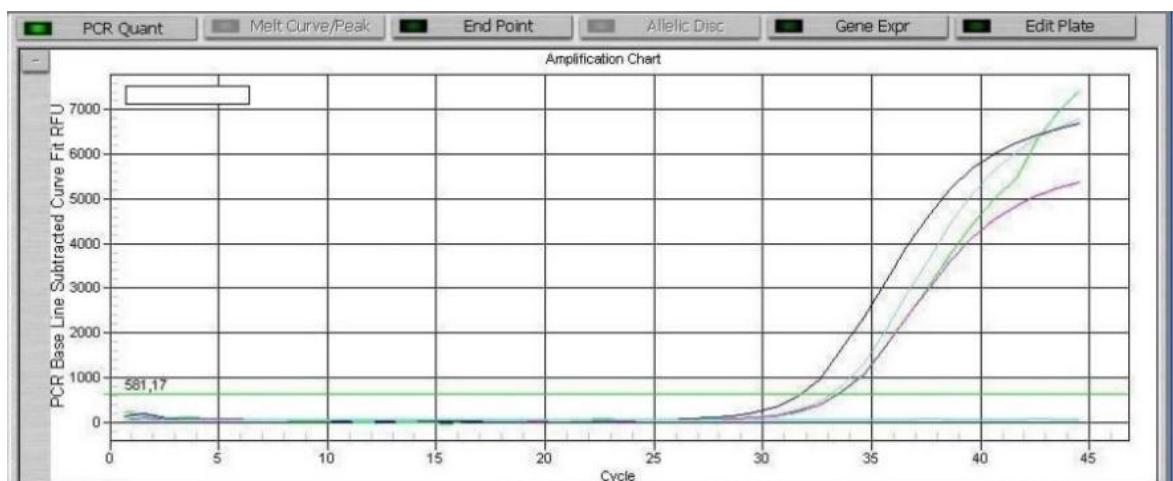


Рис 13. Графики накопления амплификаторов при использовании праймеров гена *sfp* у штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 в режиме ПЦР в реальном времени.

Результаты представленные на рис. 12 и 13 предполагают отсутствие генов *sfp* и *fenB* в геноме штамма *Bacillus altitudinis* API-2019.

Данные сравнительного анализа кривых накопления амплификаторов ПЦР в режиме реального времени указывают на присутствие в геноме вновь выделенного штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 генов биосинтеза сурфактина *srfAA*, фенгицина *fenD* и итурина *ituD* при отсутствии генов *sfp* и *fenB*.

Результаты ПЦР - анализа в режиме реального времени хорошо согласуются с результатами ПЦР-анализа, проведенного с применением гель-электрофореза.

Для исследования эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API – 2019 была использована методика Cooper и Goldenberg (1987). В пробирки вносили гексадекан и культуральную жидкость *Bacillus altitudinis* API - 2019. Содержимое пробирок перемешивали и анализировали спустя 24 ч.

Результаты сравнения взаимодействия воды с гексадеканом, служащего в качестве контроля, и взаимодействия гексадекана с культуральной жидкостью *Bacillus altitudinis* API – 2019 приведены на рис. 14.

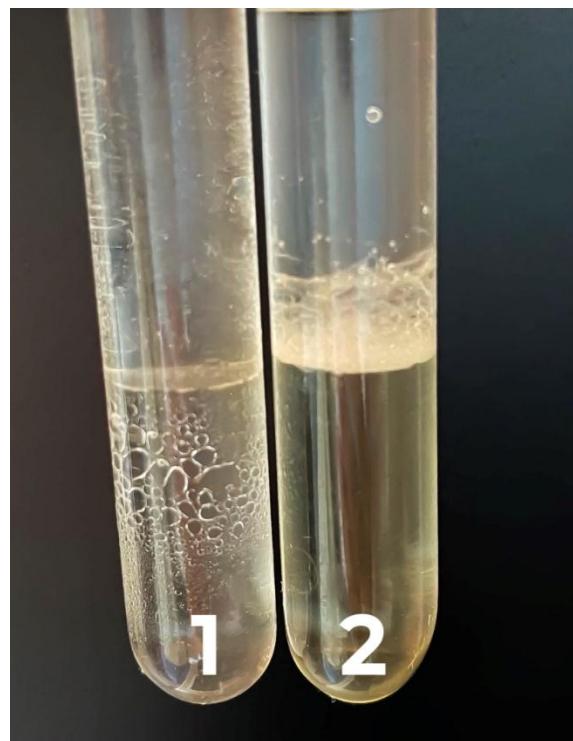


Рис 14. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API – 2019. Условные обозначения: образец 1 – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль); образец 2 – взаимодействие гексадекана и эмульсификатора, присутствующего в культуральной жидкости *Bacillus altitudinis* API – 2019.

Характер расслоения жидкостей, наблюдаемый в образце 2, обнаруживают взаимодействие гексадекана и эмульсификатора, присутствующего в культуральной жидкости *Bacillus altitudinis* API – 2019.

Полученные результаты, приведенные на рис. 14, указывают на присутствие эмульсификатора(ов) в культуральной жидкости *Bacillus altitudinis* API - 2019.

Исходя из полученных экспериментальных данных следует отметить, что полученные в данном исследовании характеристики вновь выделенного из зобика медоносной пчелы штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 могут определить его практическое значение как продуцента биосurfактантов, а именно, сурфактина, фенгицина, и итурина.

## **ВЫВОДЫ**

1. Методом ПЦР установлено, что в геноме штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 присутствует ген *srfAA*, кодирующий синтез сурфактина.
2. Методом ПЦР в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 обнаружен ген *femD*, кодирующий синтез фенгицина.
3. Методом ПЦР в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 обнаружен ген *ituD*, кодирующий синтез итурина.
4. ПЦР анализ показал отсутствие в геноме *Bacillus altitudinis* API-2019 гена *sfp*, кодирующего сурфактин и гена *femB*, кодирующего фенгицин.
5. Экспериментальные данные подтвердили наличие эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API-2019

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ziyao Zhou, Furui Liu, Xinyue Zhang et other. “Cellulose-dependent expression and antibacterial characteristics of surfactin from *Bacillus subtilis* HH2 isolated from the giant panda”
2. Fangxiang Hu, Yuyue Liu, and Shuang Li. “Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures”. *Microb Cell Fact*. 2019; 18: 42.
3. Michiko M., Nakano AND Peter Zuber. “Cloning and Characterization of srfB, a Regulatory Gene Involved in Surfactin Production and Competence in *Bacillus subtilis*”
4. Fangxiang Hu, Yuyue Liu, and Shuang Li “Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures”
5. Ongena M, Jacques P. “*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol”. *Trends Microbiol*. 2008 Mar; 16(3):115-25.
6. Delcambe L. “Iturine, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*”. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1950 Oct; 144(19-20):1431-4.
7. Peypoux F, Guinand M, Michel G, Delcambe L, Das BC, Lederer E. “Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*”. *Biochemistry*. 1978 Sep 19; 17(19):3992-6.
8. Besson F, Peypoux F, Quentin MJ, Michel GJ *Antibiot (Tokyo)* “Action of antifungal peptidolipids from *Bacillus subtilis* on the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*”. 1984 Feb; 37(2):172-7.
9. Besson F, Peypoux F, Quentin MJ, Michel G. *J Antibiot (Tokyo)* “Action of antifungal peptidolipids from *Bacillus subtilis* on the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*”. 1984 Feb; 37(2):172-7.
10. Farace G, Fernandez O, Jacquens L, Coutte F, Krier F, Jacques P, Clément C, Barka EA, Jacquard C, Dorey S. “Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine”. *Mol Plant Pathol*. 2015 Feb; 16(2):177-87

11. Park K., Park Y. S., Ahamed J., Dutta S., Ryu H., Lee S. H., et al. “Elicitation of induced systemic resistance of chili pepper by iturin a analogs derived from *Bacillus vallismortis* EXTN-1”. (2016). *Can. J. Plant Sci.* 96 564–570. [10.1139/cjps-2015-0199](https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0199)
12. Wu G, Liu Y, Xu Y, Zhang G, Shen Q, Zhang R. “Exploring Elicitors of the Beneficial Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Induce Plant Systemic Resistance and Their Interactions With Plant Signaling Pathways”. *Mol Plant Microbe Interact.* 2018 May; 31(5):560-567.
13. Peypoux F, Michel G, Delcambe L “The structure of mycosubtilin, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis* (author's transl)”. *Eur J Biochem.* 1976 Apr 1; 63(2):391-8.
14. Kenji Tsuge, Takanori Akiyama, and Makoto. “Cloning, Sequencing, and Characterization of the Iturin A Operon”. *Shoda. J Bacteriol.* 2001 Nov;183(21):626573.
15. Alvina Hanif, Feng Zhang, Pingping Li, Chuchu Li, Yujiao Xu, Muhammad Zubair,Mengxuan Zhang, Dandan Jia, Xiaozhen Zhao, Jingang Liang, Taha Majid,Jingyuau Yan, Ayaz Farzand, Huijun Wu, Qin Gu, and Xuewen Gao. “Fengycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Inhibits *Fusarium graminearum* Growth and Mycotoxins Biosynthesis.” *Toxins.* 2019 May 24;11(5):295.
16. Katherine Bacon Schneider, Tanya M Palmer, Alan D Grossman “Characterization of comQ and comX, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*”. *J Bacteriol.* 2002 Jan; 184(2): 410–419
17. Yan Zhi, Qun Wu “Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45”. Published online 2017 Jan 23. doi: [10.1038/srep40976](https://doi.org/10.1038/srep40976)
18. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. “A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*.” *Mol Microbiol.* 2005 Feb; 55(3):739-49.

19. López D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R. "Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 6; 106(1):280-5.
20. Daniel López, Hera Vlamakis, Richard Losick, and Roberto Kolter [Paracrine signaling in a bacterium]. *Genes Dev*. 2009 Jul 15; 23(14): 1631–1638.
21. Stein T. "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions." *Mol Microbiol*. 2005;56:845–857.
22. Tsuge K, Inoue S, Ano T, Itaya M, Shoda M. [Horizontal transfer of iturin A operon, itu, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer.] *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4641–4648. doi: 10.1128/AAC.49.11.4641-4648.2005.
23. Zhang QX, Zhang Y, Shan HH, Tong YH, Chen XJ, Liu FQ. "Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens*" W10. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24:25000–25009. doi: 10.1007/s11356-017-0179-8.
24. Zhao X, Zhou ZJ, Han Y, Wang ZZ, Fan J, Xiao HZ. "Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey" *Microbiol Res*. 2013;168:598–606. doi: 10.1016/j.micres.2013.03.001.
25. Koumoutsi A, Chen XH, Vater J, Borriß R. "DegU and YczE positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42". *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:6953–6964. doi: 10.1128/AEM.00565-07
26. Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Borriß R. "More than anticipated-production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42". *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2009;16:14–24. doi: 10.1159/000142891.
27. Qian S, Lu H, Meng P, Zhang C, Lv F, Bie X, Lu Z. "Effect of inulin on efficient production and regulatory biosynthesis of bacillomycin D in *Bacillus*

28. J Biol Chem. 2007 Feb 23;282(8):5608-16. Nonribosomal synthesis of fengycin on an enzyme complex formed by fengycin synthetases. Cheng-Yeu Wu, Chyi-Liang Chen, Yu-Hsiu Lee, Yu-Chieh Cheng, Ying-Chung Wu, Hung-Yu Shu, Friedrich Götz, Shih-Tung Liu
29. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Apr 12;292(4):789-93. Amino acids activated by fengycin synthetase FenE. Hung-Yu Shu, Guang-Huey Lin, Ying-Chung Wu, Johannes Scheng-Ming Tschen, Shih-Tung Liu
30. Biochim Biophys Acta. 2005 Aug 15;1730(2):159-64. Epub 2005 Mar 2. "Functional analysis of fengycin synthetase FenD." Tsuey-Pin Lin, Chyi-Liang Chen, Hui-Chuan Fu, Cheng-Yeu Wu, Guang-Huey Lin, Shih-Hao Huang, Li-Kwan Chang, Shih-Tung Liu
31. J Bacteriol. 1999 Aug;181(16):5060-7. "Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, fenC, from *Bacillus subtilis*." T P Lin, C L Chen, L K Chang, J S Tschen, S T Liu
32. Volkering, F., A.M. Breure and W.H. Rulkens, 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation, 8: 401-417.
33. Olivera, N.L., M.G. Commendatore, O. Delgado and J.L. Esteves, 2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30: 542-548.
34. Gutnick DL, Rosenberg E (1977) Oil tankers and pollution. A microbiological approach. Annu Rev Microbiol 31: 379±396
35. Pathak, K.V, 2011. Purification and characterization of antifungal compounds produced by Banyan entophytic Bacilli. Sardar Patel University.
36. Коршунова Т.Ю. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук "Микробиологические технологии ликвидации нефтезагрязнений в различных климатических условиях"

37. Wang, Zh.-Y. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms / Zh.-Y. Wang, Y. Xu, H.-Y. Wang [et al.] // Pedosphere. – 2012. – V. 22, № 5. – P. 717-725.
38. I. M. Banat á R. S. Makkar á S. S. “Cameotra Potential commercial applications of microbial surfactants”. *Appl Microbiol Biotechnol* (2000) 53: 495±508.
39. Datta P., Tiwari P., Pandey L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresour. Technol.* 270 439–448.
40. Gross R. A., Shah V. (2007). *Anti-Herpes Virus Properties of Various Forms of Sophorolipids*. Patent No 2007/130738A1
41. Gudiña E. J., Rangarajan V., Sen R., Rodrigues L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 667–675. 10.1016/j.tips.2013.10.002
42. George Seghal Kiran, Balu Sabarathnam, Joseph Selvin “Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*” *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volume 59, Issue 3, August 2010, Pages 432–438
43. B. Quan Luna, J. Blahut, C. J. van Westen “The application of numerical debris flow modelling for the generation of physical vulnerability curves”
44. Joseph Selvin, R. Gandhimathi, G. Seghal Kiran, S. Shanmuga Priya, T. Rajeetha Ravji & T. A. Hema “Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria” *Helgoland Marine Research* volume 63, pages239–247(2009)
45. Goutam Dey, Rashmi Bharti, Gunaseelan Dhanarajan, Subhasis Das, Kaushik Kumar Dey, B N Prashanth Kumar, Ramkrishna Sen & Mahitosh Mandal “Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3 $\beta$  and FoxO3a signaling

and triggers apoptosis in breast cancer”. *Scientific Reports* volume 5, Article number: 10316 (2015)

46. Wolf Wrasidlo, Ainhoa Mielgo, Vicente A. Torres, Simone Barbero, Konstantin Stoletov, Takashi L. Suyama, Richard L. Klemke, William H. Gerwick, Dennis A. Carson, and Dwayne G. “The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase”. *Stupack Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19; 105(7): 2313–2318.

47. Fatima Shatila, Mamadou Malick Diallo, Umut Şahar, Guven Ozdemir & H. Tansel Yalçın “The effect of carbon, nitrogen and iron ions on mono-rhamnolipid production and rhamnolipid synthesis gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442”. *Archives of Microbiology* volume 202, pages 1407–1417 (2020)

48. M. Govindammal, Parthasarathi Rengasamy “Investigation of antimicrobial activity of biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* isolated from Mangrove ecosystem”. *International Research Journal of Pharmacy* 4(1):230-232 January 2013

49. M. Robert, M. E. Mercadé, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa & J. Guinea. “Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1”. *Biotechnology Letters* volume 11, pages 871–874 (1989)

50. Yakimov M.M., Fredrickson H.L., Timmis K.N. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1996;23:13–18.

51. Ziyao Zhou, Furui Liu, Xinyue Zhang, Xiaoxiao Zhou, Zhijun Zhong, Huaiyi Su, Jin Li, Haozhou Li, FanFeng, Jingchao Lan, Zhihe Zhang, Hualin Fu, Yanchun Hu. “Cellulose-dependent expression and antibacterial characteristics of surfactin from *Bacillus subtilis* HH2 isolated from the giant panda.” Published: January 31, 2018

52. Nakano MM, Magnuson R, Myers A, Curry J, Grossman AD, Zuber P.J. “srfA is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*”. *Bacteriol.* 1991 Mar;173(5):1770-8. doi: 10.1128/jb.173.5.1770-1778.1991
53. Fang Zhang, Kaiyue Huo, Xingyi Song, Yufen Quan, Shufang Wang, Zhiling Zhang, Weixia Gao, and Chao Yang. *Microb Cell Fact.* 2020; 19: 223. “Engineering of a genome-reduced strain *Bacillus amyloliquefaciens* for enhancing surfactin production”
54. C D'Souza, M M Nakano, D L Frisby, P Zuber. *J Bacteriol.* 1995 Jul;177(14):4144-8. “Translation of the open reading frame encoded by comS, a gene of the srf operon, is necessary for the development of genetic competence, but not surfactin biosynthesis, in *Bacillus subtilis*”
55. D'Souza C, Nakano MM, Zuber P. “Identification of comS, a gene of the srfA operon that regulates the establishment of genetic competence in *Bacillus subtilis*”. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Sep 27;91(20):9397-401
56. Anupam Roy, Denial Mahata, Debarati Paul, Suresh Korpole, Octavio L. Franco, and Santi M. Mandal. “Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like antifungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1”. Published online 2013 Nov
57. H Lu, S Qian, U Muhammad, X Jiang, J Han, Z Lu. Effect of fructose on promoting fengycin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmb-60. *Appl Microbiol.* 2016 Dec;121(6):1653-1664
58. Khem Raj Meena and Shamsher S. Kanwar “Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics” *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 473050
59. Yuan-Seng Wu, Siew-Ching Ngai, Bey-Hing Goh, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee, and Lay-Hong Chuah. “Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery”. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 761.

60. D'Souza C., Nakano M. M., Corbell N., Zuber P. (1993). Aminoacylation site mutations in amino acid-activating domains of surfactin synthetase: effects on surfactin production and competence development in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 3502–3510
61. Hamoen L. W., Venema G., Kuipers O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* 149(Pt 1), 9–17. 10.1099/mic.0.26003-0
62. Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B. and Jacques, P. (2010) New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1521–1530.
63. Jacques, P. (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In Biosurfactants: From Genes to Applications ed. Soberon-Chavez, G. pp. 57–93. Berlin Heidelberg: Springer, Microbiology Monographs vol. 20.
64. G. Płaza, J. Chojniak, K. Rudnicka, K. Paraszkiewicz, P. Bernat (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification.
65. Nitschke M, Araújo LV, Costa SG, Pires RC, Zeraik AE, Fernandes AC, Freire DM, Contiero J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett Appl Microbiol.* 2009 Aug; 49(2):241-7.
66. Zhang R, Zhou M, Tu Y, Zhang NF, Deng KD, Ma T, Diao QY. Effect of oral administration of probiotics on growth performance, apparent nutrient digestibility and stress-related indicators in Holstein calves. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2016 Feb; 10(1):33-8.

## ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А  
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)  
Михайловой Анастасии Радиславовны  
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Микробиологическая характеристика штамма *Bacillus altitudinis* API-2019»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию  
Полностью соответствует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).  
Тема работы актуальна.

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач  
Михайлова А.Р. проявила умение самостоятельно и творчески решать поставленные теоретические задачи, владеет практическими навыками для решения экспериментальных задач в области микробиологии

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.  
при написании работы использовались следующее программное обеспечение: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint, и др.

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной.  
Михайлова А.Р. показала хороший уровень умения использования справочной, научной, научно-технической и патентной литературы в том числе зарубежной

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.  
График подготовки ВКР соблюдался

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.  
Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР)

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).  
(дополнительные сведения представлены на — листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. .

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое. Результаты ВКР могут быть использованы в учебном процессе.  
Рекомендуются к публикации в научном журнале.

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации.  
Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично»

Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:

Профессор д.б.н  
Маркушева Т.В.

(Фамилия, имя, отчество, должность)

Подпись Маркушева Т.В. (Подпись)

Удостоверено  
руководителем  
менеджером управления кадров  
ФГБОУ ВПО «НИЦ РАНХиГС»  
22.06.2021 г.

## РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студентки группы \_\_\_\_\_ Михайловой Анастасии Радиславовны на тему: «Микробиологическая характеристика штамма *Bacillus altitudinis* API-2019»

1. Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.  
Соответствует полностью
2. Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения  
Тема ВКР актуальна, направлена на решение проблемы выявления и описания свойств вновь выделенных штаммов рода *Bacillus*. Экспериментальные результаты работы достоверны, оригинальны.
3. Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы.  
ВКР выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к квалификационным работам. В обзоре литературы (гл. 1) проведен анализ современных источников по теме исследования, показана актуальность цели работы. Для выполнения экспериментальной части привлечены современные методы изучения бактериальных объектов (гл.2). Выводы достоверны и хорошо обсуждены (гл.3)
4. Технико-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе.
5. Уровень использования вычислительной техники и программных средств.  
В работе применены методы планирования экспериментальных научных исследований.
6. Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.
7. Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач  
Уровень выполнения ВКР показывает хорошую теоретическую и практическую подготовку Михайловой А.Р. для решения профессиональных исследовательских задач в области микробиологии.
8. Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.  
Оформление ВКР соответствует требованиям действующих стандартов и регламентов.
9. Обоснованность выводов и предложений  
Выводы работы обоснованы, следуют из полученных результатов.
10. Замечания по усмотрению рецензента (дополнительные замечания представлены на \_\_\_\_\_ листах приложения)  
Результаты работы оригинальны, имеют практическое значение.
11. Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.  
Результаты ВКР могут быть использованы в учебном процессе. Полученные данные рекомендуются к публикации в научном журнале.
12. Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Выпускная квалификационная работа Михайловой А.Р. на тему «Микробиологическая характеристика штамма *Bacillus altitudinis* API-2019» может быть оценена на «отлично».

Михайловой А.Р. рекомендуется присвоить квалификацию «Бакалавр».

Рецензент  
к.б.н., н.с. Уфимского Института биологии  
Уфимского федерального исследовательского  
центра Российской академии наук

Ступак Е.Э.

Подпись: Ступак Е.Э.  
Заверю:  
степента-рук-щ Узарахмине А.А.



## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский  
университет

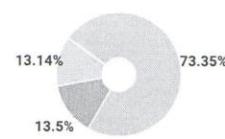
ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Михайлова Анастасия Радиславовна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Михайлова Анастасия Радиславовна  
Название работы: Микробиологическая характеристика штамма Bacillus altitudinis API-2019  
Тип работы: Выпускная квалификационная работа  
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

## РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	13.5%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	73.35%
ЦИТИРОВАНИЯ	13.14%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.06.2021



Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

26.06.2021.



Подпись проверяющего



Чтобы убедиться  
в подлинности справки, используйте QR-код,  
который содержит ссылку на отчет.

ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Представленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.