

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ *BACILLUS METHYLOTROPHICUS* SA77, ИЗОЛИРОВАННОГО С ПОБЕГА ЯБЛОНИ

Х. А. Мохамед¹, А. М. Петерсон¹, В. И. Ибрахим²

¹ Саратовский государственный национальный исследовательский университет

² Институт фармацевтической биологии и биотехнологии

Поступила в редакцию 24.10. 2016 г.

Аннотация. Исследована антагонистическая и цитотоксическая активность штамма *Bacillus methylotrophicus* SA77, выделенного с побега яблони сорта Голден Делишес в Саратовской области. Наиболее высокую антагонистическую активность *Bacillus methylotrophicus* SA77 проявил по отношению к фитопатогенным грибам *Aspergillus tubingensis* и *Fusarium tricinctum*. Установлена высокая антибактериальная активность экстракта продуктов метаболизма исследованного штамма в концентрации 0.01 мг/мл ДМСО в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 и умеренная антибактериальная активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. Показано умеренное цитотоксическое действие экстракта продуктов метаболизма на клетки мышинной лимфомы линии L 5178Y.

Ключевые слова: *Bacillus methylotrophicus*, антагонистическая активность, цитотоксическая активность.

Abstract. In this work we studied the antagonistic and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus* SA77, selected and isolated from Golden Delicious apple shoots in Saratov region. The results showed that the highest antagonistic activity of *Bacillus methylotrophicus* SA77 against phytopathogenic fungi *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium tricinctum*, our results also showed highly antibacterial activity of crude extract against *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, and moderate activity against *Mycobacterium tuberculosis*, at concentration 0.01 mg/ml DMSO. As well as bacterial crude extract exhibited moderate cytotoxic effects against mouse lymphoma cell line L5178Y.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, antagonistic activity, cytotoxicity.

Известно, что надземные части растений населены разнообразными бактериями, дрожжами и грибами. Некоторые виды микроорганизмов могут быть локализованы на поверхности здоровых растений, другие – внутри растительных тканей. Богатая микрофлора характерна как для репродуктивных частей растений (бутоны, цветы) [1, 2], так и для вегетативных [3,4]. Наиболее тесные взаимоотношения характерны для растений и эндофитных микроорганизмов за счет совместных эволюционных процессов [5]. Внутри растений эндофиты имеют мало конкурентов среди микроорганизмов [5] и, как правило, не вызывают видимых симптомов у растений [6,7].

Между микроорганизмами, заселяющими растения, часто складываются антагонистические отношения. Штаммы, способные подавлять развитие других микроорганизмов, чаще всего выявляются среди представителей родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* и *Streptomyces*. [8].

Виды *Bacillus* широко распространены на поверхности и во внутренних тканях различных видов растений [9]. *Bacillus* секретируют множество вторичных метаболитов, в том числе антибиотики, противогрибковые вещества и сидерофоры. Метаболиты, продуцируемые *Bacillus*, могут подавлять развитие широкого круга фитопатогенов или стимулировать иммунные реакции самого растения [10, 11]. Уже сегодня многие метаболиты бацилл используются как альтернатива хими-

ческим методам борьбы с фитопатогенами [8]. Кроме того, их метаболиты могут быть использованы в качестве безопасных и эффективных терапевтических веществ при лечении болезней человека и животных [12]. Несмотря на наличие большого количества уже выявленных штаммов бактерий-антагонистов, поиск новых продуцентов по-прежнему остаётся актуальным в связи с постоянным появлением новых резистентных штаммов возбудителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и идентификация штаммов микроорганизмов. *B. methylotrophicus* SA77 был выделен на картофельной среде при изучении микрофлоры побегов яблонь сорта Голден Делишес в Саратовской области. Первоначальная идентификация штамма проводилась с использованием морфологических, биохимических и физиологических тестов в соответствии с микробиологическим определителем Берджи [4]. Молекулярную идентификацию *B. methylotrophicus* SA77 осуществляли после экстракции геномной ДНК. 16S рРНК амплифицировали с универсальными праймерами эубактерий 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGYTCAG -3') и 16S-907R2 (5'-CCGTGAATTCCTTTRAGTTT -3'). Амплификацию проводили в термоциклере (CS Cleaver, Scientific Ltd., TC 32/80CS). Использовали следующие температурные циклы: один цикл денатурации при 94° С в течение 1 мин, затем 40 циклов денатурации при 94° С в течение 1 мин, отжиг при 45° С в течение 1 мин и полимеризация при 72° С в течение 1 мин. Амплификация была завершена элонгацией при 72° С в течение 7 мин. Амплификаты секвенировали. Определение гомологии последовательности 16S рРНК данного изолята проводили с использованием программы BLAST базы данных Genbank (HTTP: www.ncbi.nlm.gov/BLAST/), *B. methylotrophicus* является широко распространенным представителем бактерий ризосферы и филлосферы многих растений, сообщается, что данные микроорганизмы могут контролировать многие патогенные микроорганизмы посредством синтеза вторичных метаболитов, включая антибиотики [13].

Использованные в работе грибные изоляты *Aspergillus tubingensis* (A103), *Alternaria alternata* (A104), *Fusarium incarnatum equiseti species complex* (A105), *Fusarium tricinctum* (F106), *Phoma fungicola* (AT100), *Trichoderma harzianum* (T104), *Cladosporium cladosporioides* (C102),

были выделены нами при исследовании тех же побегов яблонь, сапрофитические и фитопатогенные грибы. Идентификацию проводили молекулярными методами с использованием праймеров ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Определение фунгицидной активности. Культура *B. methylotrophicus* SA77 засеивалась газонном на ГРМ-агар, культивировалась при 28° С в течение двух суток. Культуры грибов засеивали аналогичным образом на среду PDA, культивировалась при 28° С в течение пяти суток. Затем из полученных газонов вырезали диски диаметром 5 мм и накладывали их на чашку Петри со средой PDA. На каждую чашку накладывали один диск с культурой *B. methylotrophicus* SA77 и один диск с культурой тестируемого гриба. Расстояние между дисками составляло 7 см. Чашки с дисками культивировали при 28° С в течение семи суток. Микробные взаимодействия оценивали по наличию зоны ингибирования роста гриба [5].

Выявление антибактериальной активности. Бактериальный неочищенный экстракт (0.5 мг экстракта / 50 мкл ДМСО) исследовали на активность против *S. aureus* ATCC 25922 и *M. tuberculosis* (клинический штамм). Несколько колоний (от 3 до 10) тестируемых организмов пересеивали в триптозо-соевый бульон (4 мл) и инкубировали от 2-х до 5 часов. Суспензию разбавляли стерильным физиологическим раствором. Стандарты готовили с помощью добавления 0.5 мл 1%-ного BaCl_2 к 99.5 мл 1% H_2SO_4 (0.36 N). Приготовленный бактериальный бульон (0.1 мл) наносили на чашку с агаризованной средой Мюллера-Хинтона и засеивали с помощью стерильных бусинок. На стерильные диски из бумажных фильтров наносили 500 мкг подготовленного неочищенного экстракта *B. methylotrophicus* SA77. Пропитанные диски помещали на чашки с агаром, предварительно засеянные выбранными тестируемыми организмами. В качестве контроля использовали диски без культуры, пропитанные только растворителем. Подготовленные таким образом чашки инкубировали при 37° С в течение 24 часов. Антимикробную активность регистрировали по наличию прозрачных зон отсутствия роста вокруг дисков с экстрактом *B. methylotrophicus* SA77.

Выявление цитотоксической активности. Бактериальный неочищенный экстракт тестировали на цитотоксичность против клеточной

линии мышинной лимфомы L5178Y. ($IC_{50} > 10$ мг/мл) с помощью анализа микрокультуры тетразолия (МТТ). Клетки L5178Y лимфомы мыши выращивали в минимальной поддерживающей среде Игла с добавлением 10% лошадиной сыворотки в пробирках в культуре роллерного типа. Для определения цитотоксичности, L5178Y высевали на 96-луночные планшеты - 50.000 клеток/луночка. Клеткам позволяли закрепляться в течение 24 часов, а затем обрабатывали различными концентрациями кахалалидов в течение 24 часов. После этой обработки носитель был изменен, и клетки инкубировали в течение 3 часов в условиях клеточной культуры с МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) в концентрации 20 мкг/мл. После этой инкубации клетки фиксировали на пластине с водным раствором, содержащим 1% формальдегида и 1% хлорида кальция и затем лизировали с 95% изопропиловым спиртом-5%-ной муравьиной кислотой.

Выделение и идентификация метаболитов. Бактериальный штамм культивировали на твердой среде с рисом (100 г риса и 100 мл воды). Ферментацию проводили в течение 3-х недель при комнатной температуре. После ферментации продукты метаболизма экстрагировали этилацетатом (2 x 400 мл). Полученный неочищенный экстракт из рисовой среды (1.1 г) распределяли между н-гексаном и 90%-ным водным раствором MeOH. Метанольный экстракт подвергали хроматографии на колонке с Сефадексом LH-20 с использованием MeOH в качестве элюента. Масс-спектры были измерены с помощью LC-MS HP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest, масс-спектры высокого разрешения (HRESIMS) регистрировали на масс-спектрометре FTHRMS-Orbitrap (Thermo Finnigan). ВЭЖХ-анализ проводили с помощью системы Dionex P580, соединенной с детектором с фотодиодной матрицей (UVD340S). Детектирование было установлено на уровне 235, 254, 280 и 340 нм. Аналитическая колонка (125 мм 4 мм, Li.d.) была внесена в соответствующее поле с Europhere 10 C18 (Knauer, Германия). Разделение ВЭЖХ проводили на полупрепаративной системе ВЭЖХ LachromMerck Hitachi (насос L7100, УФ-детектор L7400; колонка Europhere 100 C18, 300 мм 8 мм, Кнауэр, Германия) со скоростью потока 5.0 мл/мин. Колоночную хроматографию проводили с использованием 60 М (0.04-0.063 мм) силикагеля Merck MN или Sephadex LH-20 в качестве стационарной фазы. Для тонкослойной

хроматографии (TLC) и препаративной TLC пластины Merck предварительно покрывали силикагелем 60 F254 с последующим обнаружением при УФ 254 и 366 нм или после того, как проводили опрыскивание реагентом (анисовым альдегидом). Растворители очищали перед использованием, и для спектроскопических измерений использовали спектральные градиентные растворители.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, *B. methylotrophicus* широко распространён и на поверхности, и во внутренней среде побегов яблонь. Его количественные показатели составляли 10^6 - 10^7 КОЕ/г. Широкому распространению этого вида в значительной степени способствуют его широкие адаптационные возможности, выявленные при фенотипической идентификации изолятов, в том числе и *B. methylotrophicus* SA77 (Таблица 1). Молекулярные исследования показали, что ген 16S рРНК *B. methylotrophicus* SA77 амплифицировался с праймером 16S-27F-16S-907R2. Последовательность ДНК имела 99% сходство с *B. methylotrophicus*.

B. methylotrophicus SA77 проявил различную антагонистическую активность по отношению к тестируемым штаммам грибов. Для удобства сравнения результатов нами была введена следующая шкала интенсивности антагонистической активности:

- отсутствие ингибирования роста гриба;
- слабое ингибирование роста гриба: быстрый рост гриба на среде, блокировка роста происходит только вокруг диска бактериальной культуры;
- умеренное ингибирование роста гриба: грибной рост распространяется на половину чашки Петри;
- сильное ингибирование роста гриба: гриб не даёт роста на чашке.

Штамм *B. methylotrophicus* SA77 не проявил антагонистической активности по отношению к *C. cladosporioides* и *F. equiseti*. Слабое ингибирование роста было отмечено для *P. fungicola* и *T. harzianum*, умеренное – для *A. alternata* (Таблица 2).

Сильную антагонистическую активность *B. methylotrophicus* SA77 проявил по отношению к *A. tubingensis* и *F. tricinctum* (Рис. 1). Столь активное подавление исследованным штаммом этих фитопатогенных грибов позволяет рассматривать его как возможную основу для создания противогрибкового биопрепарата.

Таблица 1.
Морфологические и биохимические характеристики *B. methylotrophicus* SA77

	Характеристики	Результат	
Морфологические тесты	Окрашивание по Грамму	Положительный	
	Клеточная морфология	Палочки	
	Подвижность	Положительный	
	Спорообразование	Положительный	
	Окрашивание	Кремовый белый	
Биохимические тесты	Активность каталазы	Положительный	
	Активность оксидазы	Положительный	
	Анаэробный рост	Отрицательный	
	VP - тест	Положительный	
	Утилизация цитрата	Отрицательный	
	Редукция нитрата	Положительный	
	Гидролиз желатина	Положительный	
	Гидролиз крахмала	Положительный	
	Продукция кислот из	Глюкоза	Положительный
		Арабиноза	Отрицательный
		Ксилоза	Положительный
		D-рафиноза	Отрицательный
		Маннитол	Положительный
		Сорбитол	Положительный
		Сахароза	Отрицательный
		Лактоза	Положительный
	Рост при	6.5 % NaCl	Положительный
		10 % NaCl	Положительный
		15 % NaCl	Отрицательный
	Рост при	pH 5	Положительный
		pH 6	Положительный
		pH 9	Положительный
		pH 10	Положительный

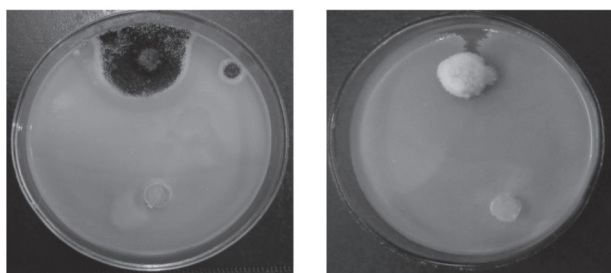


Рис. 1. Ингибирование роста *A. tubingensis* (слева) и *F. tricinctum* (справа) *B. methylotrophicus* SA77

Неочищенный экстракт *B. methylotrophicus* SA77 показал сильную антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 и умеренную активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (Таблица 3). Рост *S. aureus* подавлялся неочищенным бактериальным экстрактом в концентрации 25 мг/мл, *M. tuberculosis* – 100 мг/мл.

Таблица 2.
Антагонистическая активность *B. methylotrophicus* SA77 в отношении фитопатогенных грибов

Микроорганизмы		<i>B. methylotrophicus</i> SA77
Грибы	<i>A. tubingensis</i>	+++
	<i>P. fungicola</i>	+
	<i>T. harzianum</i>	+
	<i>C. cladosporioides</i>	-
	<i>F. tricinctum</i>	+++
	<i>F. equiseti</i>	-
	<i>A. alternata</i>	++

Таблица 3.
Результаты тестов на биоактивность *B. methylotrophicus* SA77

Тестируемый штамм	Концентрация бактериального неочищенного экстракта мг/мл				Контроль
	100	50	25	12.5	
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	+	+	+	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-	-	-

- наличие роста бактерий

+ ингибирование роста бактерий

Кроме того, обнаружен умеренный цитотоксический эффект в отношении клеточной линии лимфомы мыши L5178Y. Рост клеток снижался до 77.9 % при обработке экстрактом *B. methylotrophicus* SA77 в концентрации 10 мкг/мл со значением LC_{50} 12.78 г/мл.

Результаты ВЭЖХ анализа бактериального экстракта *B. methylotrophicus* SA77 представлены на рисунке 2. Лишь некоторые пики ВЭЖХ-хроматограммы совпали по УФ-видимой области спектра и времени удерживания с эталонными соединениями, имеющимся в базе данных. Эти пики были идентифицированы как цитринин гидрат (пик № 4), и метил стеарат, (пик № 11). Цитринин гидрат описывается как микотоксин, а метил стеарат является токсичным и антибактериальным соединением. Это первые данные, указывающие на синтез данных метаболитов (цитринин гидрата и метил стеарата) бактериями *B. methylotrophicus*.

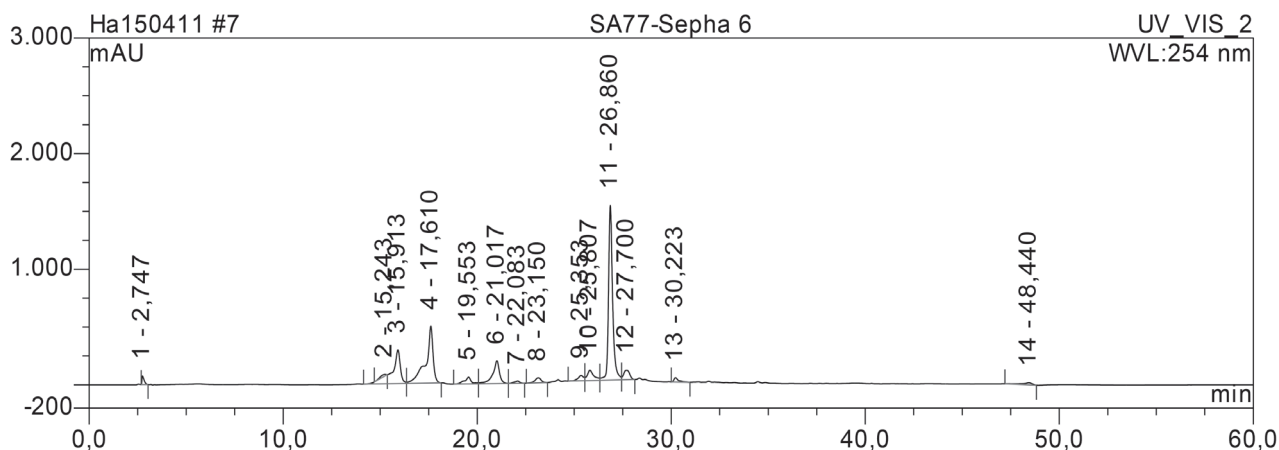


Рис. 2. ВЭЖХ – хроматограммы неочищенных экстрактов *B. methylotrophicus* SA77

Таким образом, штамм *B. methylotrophicus* SA77 представляет существенный интерес для биотехнологии. Его высокая антагонистическая активность по отношению к некоторым возбудителям болезней растений и животных позволяет рассматривать его как перспективную основу для создания новых биопрепаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrews J. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces / J. Andrews, R. Harris // *Ann. Rev. Phytopathol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 145–180.
2. Johnson K.B. Management of fire blight: a case study in microbial ecology / K.B. Johnson, V.O. Stockwell // *Ann. Rev. Phytopathol.* — 1998. — Vol. 36. — P. 227–248.
3. Morris C. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: Lindow S, Hecht-Poinar E, Elliott V, editors. *Phyllosphere Microbiology*. / C. Morris, L. Kinkel. — St. Paul, MN, USA: APS Press, 2002. — P. 365–375.
4. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca species*) phyllosphere / P. Hunter [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — Vol. 76. — P. 8117–8125.
5. Kuzyakov Y. Carbon input by plants into the soil / Y. Kuzyakov, G. Domanski // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* — 2000. — Vol. 163. — P. 421–431.

6. Hallmann J. Bacterial endophytes in agricultural crops / J. Hallmann // *Can. J. Microbiol.* — 1997. — Vol. 43. — P. 895–914.

7. Peñalver R. Characterization and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynarascolymus*L.) / R. Peñalver, N. Durán-Vila, M. López // *Annals of Applied Biology.* — 1994. — Vol. 125. — P. 501–513.

8. Metabolites from an Antarctic Sponge-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* / G. Jayatilake [et al.] // *J. Nat. Prod.* — 1996. — Vol. 59. — P. 293–296.

9. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao / L. Rachel [et al.] // *J. Biological Control.* — 2008. — Vol. 46. — P. 46–56.

10. Velusamy P. The Effect of Bacterial Secondary Metabolites on Bacterial and Fungal Pathogens of Rice. // *Soil biology.* – 2008. – Vol. 14. – P. 93–106.

11. Production of antimicrobial metabolites by *Bacillus subtilis* immobilized in polyacrylamide Gel / M. Awais [et al.] // *Pakistan. J. Zool.* — 2010. — Vol. 3. — P. 267- 275.

12. Singh P. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences / P. Singh, S. Cameotra // *Trends Biotechnol.* — 2004. — Vol. 22. — P. 142–146.

13. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79 / S. Hongying, [et al.] // *Crop Protection Journal.* — 2013. — Vol. 44. — P. 29–37.

Саратовский государственный национальный исследовательский университет

Мохамед Х. А., Аспирант

Тел.: +7 953 637-49-01

E-mail: hassan_awad37@mail.ru

Saratov State National Research University

Mohamed H. A., post-graduate student

Ph.: +7 953 637-49-01

E-mail: hassan_awad37@mail.ru

Мохамед Х. А., Петерсон А. М., Ибрахим В. И.

*Петерсон А. М., К.б.н., доцент
Тел.: +7 (8452) 51-16-30
E-mail: alexandra.peterson@yandex.ru*

*Peterson A. M., PhD, Associated professor.
Ph.: +7 (8452) 51-16-30
E-mail: alexandra.peterson@yandex.ru*

*Институт фармацевтической биологии и
биотехнологии*

*Ибрагем В. Е., Докторант
Тел. +49 211 811-41-64
E-mail: weaamnabil@hotmail.de*

*Institute of Pharmaceutical Biology and
Biotechnology*

*Ebrahim W. E., PhD, Associated professor
Ph.: +49 211 81-14164
E-mail: weaamnabil@hotmail.de*