

УДК 632.937.15

DOI 10.30679/2587-9847-2022-35-72-77

ИЗУЧЕНИЕ ФУНГИСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS VELEZENSIS* KRD-20

**Елисютикова А.В., Копыльцов С.В., канд. биол. наук,
Милованов А.В., канд. биол. наук, Савенкова Д.С.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» (Краснодар)

Реферат. Из почвы корнеобитаемого горизонта озимой пшеницы был выделен штамм бактерий рода *Bacillus*, проявивший фунгистатические свойства. В результате ПЦР-анализа с использованием маркеров FEND1F/R, ITUD1/R, SUR3F/R для обнаружения генов, кодирующих синтез фунгистатических липопептидов – итурина, сурфактина и фенгицина было выявлено, что изолят имеет гены, кодирующие биосинтез итурина и сурфактина. В ходе полногеномного секвенирования штамм был идентифицирован как *Bacillus velezensis*, а в его геноме установлено наличие генов, кодирующих липопептиды при помощи веб-сервиса NCBI tBLASTn.

Ключевые слова: *Bacillus*, фунгистатические свойства, липопептиды, ПЦР, полногеномное секвенирование.

Summary. A strain of the genus *Bacillus* was isolated from the soil of the root horizon of winter wheat, which showed fungistatic properties. As a result of PCR analysis using markers FEND1F/R, ITUD1/R, SUR3F/R to detect genes encoding the synthesis of fungistatic lipopeptides – iturin, surfactin and fengycin, it was revealed that the isolate has genes encoding the biosynthesis of iturin and surfactin. During whole genome sequencing, the strain was identified as *Bacillus velezensis*. The presence of genes encoding lipopeptides in its genome was established using the NCBI tBLASTn web service.

Key words: *Bacillus*, fungistatic properties, lipopeptides, PCR, whole genome sequencing.

Введение. В условиях интенсификации агропромышленного производства происходит уплотнение севооборотов и преобладанию монокультур, что пагубно влияет на микробиоценоз почвы и накоплению видоспецифических фитопатогенов. Самыми распространенными средствами борьбы против них являются химические препараты. Однако в последнее время в целях рационального природопользования все больше внимания уделяется использованию биологических агентов, контролирующих распространение патогенных микроорганизмов [1]. Вследствие этого важной задачей становится поиск и разработка новых штаммов этих продуцентов для борьбы с болезнями растений. В результате этого были разработаны биологические средства борьбы, которые считаются экологически безопасными [2]. Их действие основано на свойствах некоторых групп микроорганизмов продуцировать вещества, оказывающие ингибирующее действие на рост патогенной микрофлоры [3, 4].

За последние несколько десятилетий были описаны различные фунгистатики пептидной природы, которые были получены из микроорганизмов. Их применение в качестве компонентов биопрепаратов имеет много достоинств: широкий спектр действия, потенциал для развития экологически безопасного массового производства, снижение развития резистентности у патогенной микрофлоры к фунгицидам и прочие [5].

Почвенные бактерии являются наиболее распространенной и разнообразной группой микроорганизмов, которые часто используются в качестве эффективных биофунгицидов для борьбы с болезнями растений и стимулирования их роста [6]. В последние годы значительное внимание уделяется бактериям рода *Bacillus*, которые продуцируют ряд

циклических липопептидов с широким спектром антимикробных свойств [7]. Липопептиды *Bacillus sp.* делятся на три основных подсемейства – сурфактины, итурины и фенгицины (или плипастатины). Их специфическое действие, способность к биологическому разложению и минимальная фитотоксичность делают их основным выбором в качестве биофунгицидов [8]. Среди них самую большую фунгистатическую активность в отношении широкого спектра патогенов проявляют фенгицины [9]. Действие данных липопептидов эффективно подавляет рост грибов, таких как *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor rouxii* и т. д. [10]. В основном липопептиды индуцируют гибель клеток путем взаимодействия с клеточной мембраной и увеличения проницаемости клетки [11, 12].

Эта предрасположенность некоторых групп микроорганизмов к подавлению патогенной микрофлоры, а также стремление к рациональному природопользованию делает актуальным изучение фунгистатических свойств бактерий, поиск и селекцию перспективных штаммов, на основе которых возможно производство биологических препаратов защиты растений.

Таким образом, нашей целью было исследовать перечень липопептидов, продуцируемых выделенного нами ранее штамма рода *Bacillus* с фунгистатическими свойствами [13].

Объекты и методы исследований. В ходе работы для исследования был взят изолят бактерии рода *Bacillus*, выделенный ранее из почвы прикорневой зоны пшеницы. Его культивировали на картофельно-глюкозном агаре (КГА) в течение 2 суток при 28 °С в термоанэростате. Его фунгистатические свойства были обнаружены при совместном культивировании с фитопатогенным грибом *Fusarium sp.*, рост которого изолят бактерии подавлял.

Для проведения ПЦР-анализа на определение того, какие именно липопептиды продуцирует данный изолят, была выделена ДНК бактерии следующим способом. Была подготовлена суспензия колонии бактерий, разведенной в 0,5 мл ТЕ-буфера. Суспензию подвергали двукратной заморозке и разморозке при -70 °С, а затем центрифугировали 3 мин при 12000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для приготовления ПЦР-смеси. Для ПЦР-анализа использовались маркеры, представленные в табл. 1.

Таблица 1 – Праймерные пары, использованные в работе, и их нуклеотидная последовательность

Праймер	Нуклеотидная последовательность
ITUD1F	5'-GATGCGATCTCCTTGGATGT-3'
ITUD1R	5'-ATCGTCATGTGCTGCTTGAG-3'
SUR3F	5'-ACAGTATGGAGGCATGGTC-3'
SUR3R	5'-TTCCGCCACTTTTTTCAGTTT-3'
FEND1F	5'-TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT-3'
FEND1R	5'-GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC-3'

Условия амплификации для выбранных праймеров были следующие: начальная денатурация – 15 мин при 94 °С, 30 циклов денатурации – 30 с при 94 °С, отжиг – 30 с при 52 °С, синтез – 2 мин при 72 °С, финальный цикл – 10 мин при 72 °С. Результаты ПЦР были визуализированы путем разделения продуктов амплификации в 1 %-й агарозе и ТАЕ-буфере в течение 1 ч при U = 5 В/см.

Для полногеномного секвенирования ДНК изолята была выделена с помощью Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Германия). Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit (ThermoFisher). ДНК-библиотеки подготавливали с использованием DNA Prep. (M) Tagmentation Kit («Illumina Inc», США). Полногеномное секвенирование осуществляли с NovaSeq 6000 («Illumina Inc», США). Качество прочтения оценивали с помощью FastQC v.0.11.9 [14]. Адаптеры удаляли с помощью анализа с Trimmomatic v.0.39 [15]. Геном собирали с помощью SPAdes v.3.15.3 [16] в программе UGENE [17]. Аннотацию генома проводили при помощи NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v.5.3 [18]. Для сборки и анализа прочтения были использованы настройки по умолчанию.

Идентифицировали вид изолята методом dDDH [19] с помощью веб-сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) [20].

После был использован метод tBLASTn, который позволяет выявить предрасположенность к наличию сиквенсов, которые предположительно отвечают за биосинтез фунгистатических липопептидов. Для поиска были использованы референсные аминокислотные последовательности, которые имеются в базе данных NCBI (номера в GenBank: SIR84034.1, SIR84017.1, SIR83997.1, QDK88674.1, QDK88675.1, QDK88676.1, QDF52476.1, QDF52475.1, QDF52474.1).

Обсуждение результатов. В результате ПЦР-анализа с маркерами ITUD1F/R, SUR3F/R, FEND1F/R изолята с фунгистатическими свойствами были получены результаты, представленные на рисунке. Штамм выделенной нами бактерии *Bacillus sp.* Krd-20 сравнивался с другими изолятами, выделенными из почвы, пронумерованные на электрофореграмме значениями от 1 до 6.

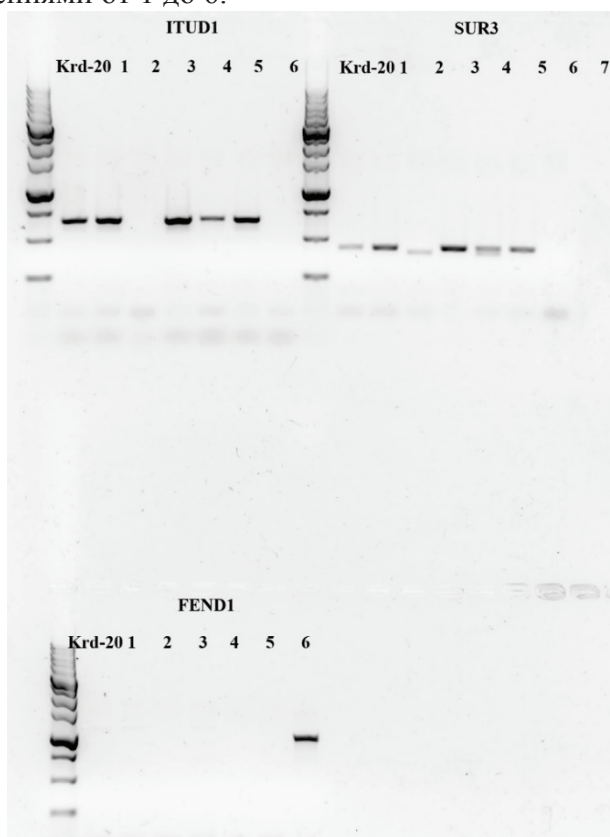


Рис. 1. Результаты ПЦР с маркерами ITUD1F/R, SUR3F/R, FEND1F/R на обнаружение генов, кодирующих синтез итурина, сурфактина и фенгицина: 1, 2, 3, 4, 5, 6 – другие почвенные изоляты, изученные на предмет наличия фунгистатических генов

Данная электрофореграмма свидетельствует о том, что исследуемый нами изолят обладает генами, кодирующими продуцирование итурина и сурфактина, однако не обладает геном, кодирующим синтез фенгицина, в отличие от изолята №6.

В результате секвенирования и сборки генома было получено 3 298 088 парноконцевых ридов с покрытием 40.0x. Размеры парных концов составили <151 bp. Было получено также 47 контигов, длина которых составила 3 939 663 п.н. Значение N50 равнялось 286 045, процент содержания GC составил 46,4 %. Число протеин-кодирующих генов составило 3866, РНК – 81. Из 3866 ДНК-последовательностей 3797 (98,22 %) предполагаются быть протеин-кодирующими.

Согласно веб-сервису Type (Strain) Genome Server (TYGS) изучаемый штамм был идентифицирован как *Bacillus velezensis*.

Таким образом, проект генома был депонирован в NCBI GenBank под номерами BioSample SAMN25352221, BioProject PRJNA801484, GenBank GCA_021892375.1 и SRA SRR19880915.

С помощью NCBI tBLASTn в геноме исследуемого штамма был осуществлен поиск нуклеотидных последовательностей, отвечающих за продуцирование липопептидов – итурина, сурфактина и фенгицина. Результат выравнивания генома бактерии на референсные последовательности представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты поиска алгоритмом tBLASTn, демонстрирующие наличие фунгистатических генов у штамма *B. velezensis* Krd-20

Ген	Номер гена в GenBank	Покрытие	Идентичность
iturin family lipopeptide synthetase A	SIR84034.1	100 %	97,94 %
iturin family lipopeptide synthetase B	SIR84017.1	100 %	94,46 %
iturin family lipopeptide synthetase C	SIR83997.1	100 %	68,11 %
surfactin synthetase SrfAA	QDK88674.1	99 %	96,46 %
surfactin synthetase SrfAB	QDK88675.1	100 %	96,04 %
surfactin synthetase SrfAC	QDK88676.1	100 %	93,43 %
fengycin biosynthesis protein, FenA	QDF52476.1	100 %	95,70 %
fengycin biosynthesis protein, FenB	QDF52475.1	100 %	95,67 %
fengycin biosynthesis protein, FenC	QDF52474.1	100 %	96,47 %

Исходя из приведенной таблицы с результатами, установлено, что у представленного штамма в геноме есть последовательности, схожие с теми, что отвечают за продуцирование фунгистатических липопептидов всех трех групп – итурина, сурфактина и фенгицина. В колонке «покрытие» представлено, насколько длина референсной последовательности совпадает с длиной сиквенса, найденного в геноме исследуемого штамма. В колонке «идентичность» указаны проценты того, насколько нуклеотиды в этих последовательностях между собой совпадают. Значение покрытия всех генов достигает 100 % за исключением сурфактин синтетазы А (99 %). Значения идентичности не максимальны, однако тоже составляют большой процент за исключением итурин синтетазы С (68,11 %). Остальные значения варьируют между 93,43 % (сурфактин синтетаза С) и 97,94 % (итурин синтетаза А).

Таким образом, если сравнивать результаты tBLASTn с результатами ПЦР-анализа, то оба метода указывают на то, что в геноме *B. velezensis* Krd-20 присутствуют гены, которые отвечают за продуцирование сурфактина и итурина. В случае с фенгицином, согласно tBLASTn ген его продуцирования в геноме бактерии предполагается, однако на электрофореграмме соответствующей ДНК-полосы не было. Это может предполагать наличие изменений в структуре нуклеотидной последовательности, которые привели к тому, что праймер FEND1 при ПЦР-анализе не сработал.

Выводы. В ходе работы был исследован изолят бактерии рода *Bacillus*, проявивший ранее фунгистатические свойства при совместном культивировании с патогенными микроорганизмами. При проверке маркерами ITUD1F/R, SUR3F/R, FEND1F/R с помощью метода ПЦР было обнаружено, что у исследуемого изолята имеются гены, кодирующие синтез фунгистатических липопептидов сурфактина и итурина, в то время как ДНК-полоса, кодирующая синтез фенгицина, не проявилась. В результате полногеномного секвенирования и сборки генома было получено 3 298 088 прочтений с покрытием 40.0x. Идентификация образца с помощью веб-сервиса Type (Strain) Genome Server (TYGS) показала, что данный изолят относится к виду *Bacillus velezensis*.

Как результат работы штамм *Bacillus velezensis* Krd-20 был загружен в базу данных NCBI GenBank под номерами BioSample SAMN25352221, BioProject PRJNA801484, GenBank GCA_021892375.1 и SRA SRR19880915.

С помощью веб-сервиса NCBI tBLASTn геном бактерии выравнивали на референсные последовательности, кодирующие синтез фунгистатических липопептидов. Результат показал высокие проценты идентичности (от 68,11 % до 97,94 %), что говорит о том, что в геноме *Bacillus velezensis* Krd-20 есть последовательности, схожие с референсными, и соответственно штамм способен к продуцированию липопептидов всех трех групп. В случае с итурином и сурфактином, результаты ПЦР и tBLASTn совпадают. Однако то, что полоса не проявилась при проверке маркером FEND1F/R, можно объяснить мутациями, в том числе заменой некоторых нуклеотидов, которые и могли повлиять на результат ПЦР.

Литература

1. Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // International journal of environmental research and public health. 2011. Vol. 8. №. 5. P. 1402-1419.
2. Shuping D.S.S. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review // African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 2017. Vol. 14. №. 4. P. 120-127.
3. Ghorbanpour M. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases // Biological Control. 2018. Vol. 117. P. 147-157.

4. Lucas J.A. The evolution of fungicide resistance // *Advances in applied microbiology*. 2015. Vol. 90. P. 29-92.
5. Pushpanathan M., Gunasekaran P., Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties // *International journal of peptides*. 2013. Vol. 2013. 675391.
6. Ambrosini R. de Souza, Passaglia L.M.P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity // *Plant Soil*. 2016. Vol. 400. P. 193-207.
7. Falardeau J., Wise C., Novitsky L, Avis T.J. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens // *J Chem Ecol*. 2013. Vol. 39. P. 869-878.
8. Kumar A., Rabha J., Jha D.K. Antagonistic activity of lipopeptide-biosurfactant producing *Bacillus subtilis* AKP, against *Colletotrichum capsici*, the causal organism of anthracnose disease of chilli // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021. Vol. 36. 102133.
9. Yang H., Li X., Li X., Yu H., Shen Z. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC // *Anal Bioanal Chem*. 2015. Vol. 407. P. 2529–2542.
10. Ben Ayed H., Hmidet N., Béchet M., Chollet M., Chataigné G., Leclère V., Jacques P, Nasri M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21 // *Process Biochem*. 2014. Vol. 49. P. 1699–1707.
11. Zhang L., Sun C. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation // *Applied and environmental microbiology*. 2018. Vol. 84. №. 18. e00445-18.
12. Gong A.D., Li H.P., Yuan Q.S., Song X.S., Yao W., He W.J., Zhang J.B., Liao Y.C. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum* // *PLoS One*. 2015. Vol. 10. P. 0116871.
13. Kopyltsov S.V., Gneush A.N. *Bacillus subtilis* for biological protection of *Taxus baccata* L. in landscape gardens // *E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. 2021. Vol. 285. P. 02002.
14. Babraham Bioinformatics – FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 17.05.2022).
15. Bolger A.M, Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30. №. 15. P. 2114-2120.
16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comp. Biol*. 2012. Vol. 19. Is. 5. P. 455-477.
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. № 8. P. 1166-1167.
18. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // *Nucleic acids research*. 2016. Vol. 44. №. 14. P. 6614-6624.
19. Auch A. F., von Jan M., Klenk H.P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // *Stand Genomic Sci*. 2010. Vol. 28. №2(1). P. 117-34.
20. Meier-Kolthoff J. P. Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy // *Nature communications*. 2019. Vol. 10. №. 1. 2182.