

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 579.264

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВ ОРЕНБУРГСКОГО РЕГИОНА

**Емельянова Анастасия Алексеевна**, магистрант, направление подготовки 06.04.01 Биология, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: emelka1711@mail.ru

**Давыдова Ольга Константиновна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии и микробиологии, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: okdavydova@yahoo.com

**Алехина Гелена Петровна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биологии и почвоведения, Оренбургский государственный университет, Оренбург  
e-mail: gelena2009@gmail.com

***Аннотация.** Бактерии рода *Bacillus* являются активными продуцентами различных биологически активных веществ, оказывающих различные действия на живые организмы. Среди таких веществ существуют ростостимулирующие препараты, антибиотические средства, ингибиторы и активаторы роста различных микроорганизмов и др.*

*Целью данного исследования было определение биологической активности природных культур бактерий рода *Bacillus*, выделенных из черноземных почв Оренбургского региона, включающее экспериментальную оценку антагонистической активности исследуемых культур по отношению друг к другу, а также к представителям бактерий других родов как грамотрицательным, так и грамположительным.*

*Практическим применением полученных результатов является оценка пригодности данных культур к использованию в различных практических целях как антагониста и продуцента биологически активных веществ.*

***Ключевые слова:** почвенная микробиология, *Bacillus*, антагонизм, биологически активные вещества, антимикробные вещества, почвенная микрофлора.*

***Для цитирования:** Емельянова А. А., Давыдова О. К., Алехина Г. П. Определение биологической активности природных культур бактерий рода *Bacillus*, выделенных из черноземных почв Оренбургского региона // Шаг в науку. – 2021. – № 4. – С. 30–33.*

### DETERMINATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NATURAL CROPS OF BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* ISOLATED FROM THE BLACK EARTH SOILS OF THE ORENBURG REGION

**Emelyanova Anastasia Alekseevna**, postgraduate student, training program 06.04.01 Biology, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: emelka1711@mail.ru

**Davydova Olga Konstantinovna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of Department of Biochemistry and Microbiology, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: okdavydova@yahoo.com

**Alekhina Gelena Petrovna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor of Department of Biology and Soil Science, Orenburg State University, Orenburg  
e-mail: gelena2009@gmail.com

**Abstract.** Bacteria of the genus *Bacillus* are active producers of various biologically active substances that have various effects on living organisms. Among such substances there are growth-stimulating drugs, antibiotic agents, inhibitors and activators of the growth of various microorganisms, etc.

The purpose of this study was to determine the biological activity of natural cultures of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from chernozem soils of the Orenburg region, including an experimental assessment of the antagonistic activity of the studied cultures in relation to each other, as well as to representatives of bacteria of other genera, both gram-negative and gram-positive.

The practical application of the results obtained is to assess the suitability of these crops for use for various practical purposes as an antagonist and producer of biologically active substances.

**Key words:** soil microbiology, *Bacillus*, antagonism, biologically active substances, antimicrobial substances, soil microflora.

**Cite as:** Emelyanova, A. A., Davydova, O. K., Alekhina, G. P. (2021) [Determination of the biological activity of natural crops of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the black earth soils of the Orenburg region]. *Shag v nauku* [Step into science]. Vol. 4, pp. 30–33.

Бациллы – это одна из наиболее распространенных групп почвенных бактерий, являющихся почвенными сапрофитами. Бактерии выделяют в окружающую среду различные биологически активные вещества, воздействуя на патогенную и условно-патогенную микрофлору почвы, тем самым «управляя здоровьем растений» [5].

Вещества, продуцируемые представителями рода *Bacillus*, обладают широким спектром антимикробной активности против патогенных микробов. Антимикробные вещества бацилл можно синтезировать как рибосомно, так и нерибосомно, и их можно классифицировать по способу биосинтеза, структуре и молекулярной массе [1]. Точный механизм их действия пока не ясен; однако известно, что они убивают бактерии, разрушая клеточную стенку бактериальной клетки. Антимикробные вещества, полученные из бактерий рода *Bacillus*, имеют потенциал в фармацевтической промышленности, а также в пищевом и сельскохозяйственном секторах [7].

В последние годы набирает актуальность создание биопрепаратов на основе биологически активных штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделяемых из различных природных источников, преимущественно – из почв. Антагонистическая активность и возможность спорообразования бацилл – важное свойство, обуславливающее интерес к данным микроорганизмам при создании микробных препаратов [3].

Таким образом, в качестве объектов исследования использовались 7 различных по культуральным свойствам, выделенных из черноземной почвы Оренбургского региона культур бактерий рода *Bacillus*.

Основным методом, применяемым при выделении бактерий рода *Bacillus* из почвы, является метод прогрева почвенной суспензии до 100 °С в течение 1,0–1,5 часов. При таком прогреве все вегетативные формы микроорганизмов погибают и выживают лишь споровые формы, к которым как раз и относятся бациллы [4]. При этом используются

разведения от 10<sup>5</sup> до 10<sup>8</sup>, что необходимо для количественного учета выделенных культур. Далее 0,1 мл необходимого почвенного разведения засеивается на плотную питательную среду методом «газона» и инкубируется при оптимальных условиях – 24 часа при температуре 37 °С [2].

Подтверждение принадлежности выделенных культур к роду *Bacillus* производится путем определения тинкториальных свойств микроорганизмов. При окраске по Граму клетки бактерий отличаются палочковидной формой и окрашиваются в фиолетовый цвет, таким образом, являясь грамположительными. При окраске эндоспор методом Шеффера-Фултона в образце наблюдаются палочковидные вегетативные клетки, окрашенные в красный цвет, и круглые или овальные эндоспоры, окрашенные в зеленый цвет [2].

Для определения антагонистической активности выделенных культур использовался метод «пятен». Методика данного метода заключалась в посевах культуры-антагониста небольшими колониями – «пятнами» с последующим культивированием в термостате в течение 48 часов при температуре 37 °С. Затем культуры убивались парами хлороформа в течение 1 часа. Поверх выросших убитых колоний заливалась 0,6 %-ная плотная питательная среда с заранее разведенной тест-культурой. Чашки инкубировались в термостате в течение 24 часов при температуре 37 °С. Результатом антагонистической активности являлась зона подавления тест-культуры вокруг колонии каждой из культур.

Антагонистическая активность выделенных культур относительно друг друга выявила наиболее чувствительные и наиболее активные культуры (таблица 1).

Таким образом, в результате перекрестного антагонизма культура В7 показала себя как наиболее антагонистически активная, подавив практически все культуры, за исключением культуры В3. Культура В6, напротив, показала себя как наиболее чувствительная, т. к. подавлялась всеми кроме культуры В6.

Также важно отметить, что культура В7, которая, как было сказано выше, является наиболее антагонистически активной, выступая в качестве

тест-культуры, оказалась абсолютно не чувствительной, а культура В6 – совершенно не обладала антагонистической активностью.

Таблица 1. Результаты определения антагонистической активности выделенных культур относительно друг друга

Культура-антагонист	Тест-культура						
	В1	В3	В4	В6	В7	В8	В9
В1	–	+	–	+	–	+	–
В3	–	–	–	+	–	–	–
В4	–	+	–	+	–	+	–
В6	–	–	–	–	–	–	–
В7	+	–	+	+	–	+	+
В8	–	–	–	–	–	–	–
В9	–	–	–	+	–	–	–

Примечание: знаком «+» обозначено наличие зоны подавления роста тест-культуры культурой-антагонистом, знаком «–» обозначено отсутствие зоны подавления роста тест-культуры культурой-антагонистом

Диаметр зоны подавления роста варьируется для каждого микроорганизма. Причем зависимости ди-

аметра зоны подавления роста от диаметра колонии культуры-антагониста не наблюдается (рисунок 1).

### Индикаторная культура В6

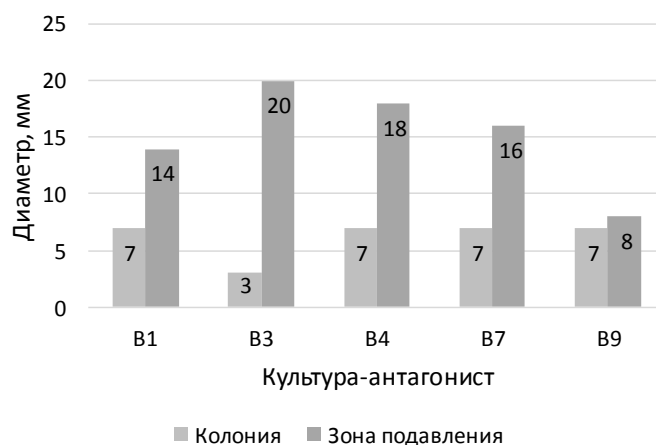


Рисунок 1. Диаграмма зависимости зоны подавления роста тест-культуры от диаметра колонии культуры-антагониста на примере эксперимента с культурой В6 в качестве тест-культуры

Также производилась оценка антагонистической активности выделенных культур относительно представителей других родов. В качестве тест-культур использовались грамположительные микроорганизмы *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, а также грамотрицательные микроорганизмы *Pseudomonas aeruginosa* и бактерии рода *Klebsiella*.

Для оценки антагонистической активности в данном случае использовался метод перпендикулярных штрихов. Методика заключалась в том, что культура-антагонист засеивалась на плотную

питательную среду в виде прямого штриха и инкубировалась в термостате в течение 48 часов при температуре 37 °С. Далее к выросшей в виде штриха колонии перпендикулярно вплотную, но не касаясь колонии, подсеивалась тест-культура и выращивалась при оптимальной температуре 37 °С в течение 24 часов. Если последняя растет вплотную к штриху культуры-антагониста, значит антагонизм не наблюдается. Если же рост тест-культуры начинается на некотором расстоянии, значит антагонист подавил ее рост.

В результате данного опыта наблюдался антагонизм некоторых исследуемых культур по отношению к представителям грамположительной флоры *S. aureus* и *S. epidermidis* (таблица 2).

Таблица 2. Результаты определения антагонистической активности выделенных культур относительно представителей других родов

Культура-антагонист	Тест-культура			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>S. epidermidis</i>
B1	–	+	–	+
B4	–	+	–	+
B8	–	+	–	+
B9	–	+	–	+

П р и м е ч а н и е: знаком «+» обозначено наличие зоны подавления роста тест-культуры культурой-антагонистом, знаком «–» обозначено отсутствие зоны подавления роста тест-культуры культурой-антагонистом

Таким образом, в результате проведенного исследования была выявлена биологическая активность выделенных из черноземных почв бактерий рода *Bacillus*. Многие из выделенных культур являются активными продуцентами различных биологически активных веществ.

Практическим применением полученных результатов является возможность использования данных культур в различных биопрепаратах как антагонистов или продуцентов биологически активных веществ.

#### Литература

1. Круглов Ю. В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – С. 46–59.
2. Ленгер Й. Современная микробиология. Прокариоты: в 3 т. – Москва: Мир, 2005. – Т. 2. – 654 с.
3. Орлова Т. Н., Иркитова А. Н., Гребенщикова А. В. Антагонистическая активность *Bacillus subtilis* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2018. – № 5. – С. 141–145.
4. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
5. Штерншис М. В. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. – Новосибирск: Издательство Сибирского отделения Российской академии наук, 2016. – 284 с.
6. Amin M. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties // Avicenna J. Clin. Microb. Infec. – 2015. – № 2. – Pp. 1–4.
7. Sumi C. D. et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. // *Can J Microbiol.* – 2015. – Vol. 61 (2). – Pp. 93–103.

Статья поступила в редакцию: 16.05.2021; принята в печать: 08.11.2021.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.