



УДК [579.264:579.84/85]:552. 32 (282.256.341)

Антагонистическая активность гетеротрофных микроорганизмов из биоплёнок на твёрдых субстратах литоральной зоны озера Байкал

Е. А. Зименс^{1,2}, Е. В. Суханова², Ю. Р. Штыкова²,
В. В. Парфенова², Н. Л. Белькова^{1,2}

¹ Иркутский государственный университет, Иркутск

² Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

E-mail: ekaterinasiemens93@gmail.com

Аннотация. Идентификация гетеротрофных микроорганизмов из биоплёнок, сформированных на пластинах из горных пород, выявила представителей следующих родов: *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Kocuria* sp., *Bacillus* spp. и *Raenibacillus* spp. Показано, что некоторые штаммы способны подавлять рост природных бактерий рода *Bacillus* spp., а также ряд условно-патогенных микроорганизмов, которые могут вызывать различные заболевания у человека. Бактерии рода *Raenibacillus* по сравнению с другими штаммами-антагонистами обладают более широким спектром антимикробной активности. Их изучение представляет несомненный практический интерес в биотехнологии.

Ключевые слова: штаммы-антагонисты, биоплёнки, антагонистическая активность, субстрат, литоральная зона, озеро Байкал.

Введение

Известно, что в природных местообитаниях микроорганизмы преимущественно существуют в ассоциативном состоянии, прикрепляясь к поверхностям, создавая сложные структуры – биоплёнки. Они представляют собой сложные сообщества, развивающиеся на различных поверхностях, включая границы фаз вода – воздух, вода – грунт, вода – геологические субстраты [5].

Антагонистические взаимодействия оказывают влияние, во-первых, на структуру микробного сообщества: состав и разнообразие видов бактерий; во-вторых, на функционирование микробиоценозов и, в целом, на природу и скорость биогеохимической трансформации веществ в водоёме [6].

Одним из эффективных путей получения новых антибактериальных веществ является поиск и культивирование микроорганизмов, продуцирующих метаболиты, способные угнетать рост патогенов. Установлено, что антимикробная активность водных штаммов бактерий не уступает почвенным [7; 8].

В частности, изучение антагонистической активности актиномицетов из оз. Байкал показало, что бактерии родов *Streptomyces* и *Micromonospora* являются сильными антагонистами по отношению к некоторым гетеротрофным микроорганизмам и позволило выявить как узкоспециализированные, так и штаммы с широким спектром антимикробной активности [3].

Зона литорали занимает около 7 % от общей площади оз. Байкал, однако протекающие в ней процессы играют важную роль и оказывают влияние на биоту всего водоёма [4]. Высокая концентрация кислорода, освещённость, температурные условия обуславливают повышенное содержание органических веществ и биомассу организмов, поэтому биогеохимические процессы протекают здесь более интенсивно, нежели в зоне открытого Байкала.

Цель работы – изучение антагонистических взаимоотношений гетеротрофных бактерий, выделенных из биоплёнок оз. Байкал, с другими автотонными и аллохтонными микроорганизмами.

Материалы и методы

Штаммы гетеротрофных микроорганизмов были получены из коллекции культур лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН (табл. 1), изолированные из биопленок, сформированных на пластинах из горных пород, которые выдержаны в течение года в литоральной зоне южной котловины оз. Байкал (пос. Листвянка). Ферментативную активность (протеолитическую, амилолитическую, фосфатазную, липазную, лецитиназную) этих штаммов определяли по методикам, описанным ранее [1]. Идентификацию культур проводили с помощью молекулярно-генетического анализа фрагментов гена 16S рРНК [2]. Полученные последовательности зарегистрированы в банке данных EMBL, где им присвоены следующие номера: HF548398, HF678914, HF678933, HF678934, HF678944–HF678946, HF678977, HF678986, HF947325.

Определение влияния штаммов-антагонистов на природные микроорганизмы. Для эксперимента 100 мкл аликвоты суточной суспензии природных штаммов (см. табл. 1) растирали шпателем по среде R₂A (HiMedia, Индия), затем в агаре стерильным пробочным сверлом (диаметр 6–8 мм) делали лунку, куда вносили 50 мкл суточной суспензии штаммов-антагонистов. Чашки инкубировали в термостате при 22 °С, антимикробную активность учитывали на вторые сутки культивирования по радиусу зоны лизиса (мм).

Определение антимикробной активности штаммов-антагонистов. Для исследования 300 мкл аликвоты суспензии культуральной жидкости тест-культуры растирали шпателем по среде R₂A (HiMedia, Индия), затем в агаре делали лунку стерильным пробочным сверлом (диаметр 6–8 мм), куда вносили 100 мкл суточной суспензии антагонистов. Чашки инкубировали в термостате при 37 °С, антимикробную активность учитывали на первые сутки культивирования по радиусу зоны лизиса тест-культуры (мм).

Таблица 1

Характеристика штаммов гетеротрофных микроорганизмов,
использованных в работе

Название штамма	Род	Среда	Субстрат
Штаммы-антагонисты			
Ant-1A	<i>Serratia</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-10A	<i>Serratia</i> sp.	PCA	Природный камень
Ant-4A	<i>Pseudomonas</i> sp.	R ₂ A	Уртит
Ant-6A	<i>Pseudomonas</i> sp.	R ₂ A	Гранит
Ant-3A	<i>Kocuria</i> sp.	R ₂ A	Уртит
Ant-2A	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-9A	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-8A	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Полосчатое габбро
Ant-5A	<i>Paenibacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-12A	<i>Paenibacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-7A	<i>Paenibacillus</i> sp.	R ₂ A	Сталь
Природные штаммы			
Ant-1B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-2B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-2C	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-12B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Природный камень
Ant-3B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Полосчатое габбро
Ant-5B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Гранит
Ant-6B	<i>Bacillus</i> sp.	R ₂ A	Гранит

Спектр антимикробной активности метаболитов штаммов-антагонистов при культивировании в жидкой питательной среде NSY (г/л: питательный бульон-1; дрожжевой экстракт-1; соевый пептон-1) определяли по отношению к тест-культурам из коллекции лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН: *Escherichia coli* K12 F⁺ Str^k ВКПМ (KS-507) В-3254, *E. coli* M17-02 ВКПМ В-8208, *Pseudomonas aeruginosa* ФГУН ГИСК им. Л. А.Тарасевича Роспотребнадзора, *Bacillus subtilis* ВКПМ, *B. subtilis* DSM, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 35667, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Тест-культуры инкубировали в мясопептонном бульоне (Биотехновация, Россия).

Штаммы-антагонисты культивировали в колбах объёмом 50 мл на орбитальном шейкере (130 об/мин, 27 °С) в течение 12 сут. Определение антимикробной активности метаболитов проводили ежедневно на твёрдой среде РПА:10 по методике, описанной выше.

Результаты и обсуждение

Из коллекции гетеротрофных микроорганизмов было отобрано 11 культур, изолированных с различных субстратов: природный камень (6 штаммов), уртит (2), габбро (1), гранит (1) и сталь (1) (см. табл. 1). Сравнительный и филогенетический анализ их нуклеотидных последовательно-

стей показал, что разнообразие представлено тремя филами и пятью родами: фила Proteobacteria (*Pseudomonas* spp., *Serratia* spp.); фила Actinobacteria (*Kocuria* sp.); фила Firmicutes (*Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp.).

Результаты тестирования показали, что только один штамм *Pseudomonas* sp. Ant-6A обладает потенциальной липолитической активностью. Анализ гетеротрофных микроорганизмов на наличие фосфатазной активности за сутки показал её присутствие у трёх штаммов: *Serratia* spp. Ant-1A и Ant-10A, *Pseudomonas* sp. Ant-6A. Определено, что 5 из 11 штаммов продуцируют лецитиназный фермент. Протеолитическая активность на казеине обнаружена у 7 штаммов. Протеолиз желатины наблюдается у 4 штаммов: *Pseudomonas* spp. Ant-4A и Ant-6A, *Bacillus* spp. Ant-2A и Ant-9A. Большинство штаммов (9) обладают амилолитической активностью. Штаммы *Bacillus* Ant-2A и Ant-9A, *Pseudomonas* Ant-4A и Ant-6A характеризуются множественной ферментативной активностью.

Определение влияния антагонистов на природные штаммы, изолированные из биоплёнок оз. Байкал, показало, что все представители рода *Paenibacillus* spp. (Ant-5A, Ant-7A, Ant-12A) и *Serratia* sp. Ant-1A способны угнетать рост некоторых видов *Bacillus* spp. (табл. 2).

Таблица 2

Влияние штаммов-антагонистов на природные штаммы рода *Bacillus*

Штаммы-антагонисты	Природные штаммы	Радиус зоны лизиса на 2 сутки, мм
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-5A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-5B	3,5
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-7A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-2B	2
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-12A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-12B	3
<i>Bacillus</i> sp. Ant-2A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-2B	—
<i>Bacillus</i> sp. Ant-2A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-2C	—
<i>Bacillus</i> sp. Ant-8A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-2B	—
<i>Serratia</i> sp. Ant-10A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-12B	—
<i>Pseudomonas</i> sp. Ant-6A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-6B	—
<i>Kocuria</i> sp. Ant-3A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-3B	—
<i>Serratia</i> sp. Ant-1A	<i>Bacillus</i> sp. Ant-1B	3

Определение спектра антимикробной активности метаболитов для проанализированных штаммов показало, что они являются антагонистами по отношению к микроорганизмам, которые могут вызывать заболевания у человека: *E. coli* K12, *E. coli* M17-02, *B. subtilis* ВКПМ, *B. subtilis* DSM, *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus*, но ни один из исследуемых штаммов не подавляет *Ps. aeruginosa*.

Эксперимент по определению антимикробной активности суспензии суточных культур исследуемых штаммов показал, что только один из 11 проанализированных штаммов *Paenibacillus* sp. Ant-7A не проявил антимикробной активности (табл. 3). Штаммы *Serratia* sp. Ant-1A, *Kocuria* sp. Ant-3A, *Pseudomonas* sp. Ant-6A, *Bacillus* sp. Ant-9A, по-видимому, являются узкоспециализированными, так как подавляют рост только одной

тест-культуры. Все остальные штаммы проявили широкий спектр антагонистической активности (табл. 3).

Таблица 3

Антимикробная активность изолированных из биоплёнок суточных штаммов-антагонистов в отношении тест-культур (радиус зоны лизиса, мм)

Штаммы-антагонисты	Тест- культуры								
	<i>E.coli</i> K12	<i>E.coli</i> M17-02	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i> ВКПМ	<i>B. subtilis</i> DSM	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-7A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. Ant-1A	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i> sp. Ant-3A	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. Ant-6A	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. Ant-9A	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. Ant-8A	-	-	-	-	2	1	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. Ant-4A	5	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp. Ant-10A	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Bacillus</i> spp. Ant-2A	2	-	-	-	1	1	-	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-5A	1,5	1	1	-	1	3	-	-	3
<i>Paenibacillus</i> sp. Ant-12A	3	5	1	1	2	1	-	-	6

В эксперимент по определению спектра антимикробной активности взяли шесть штаммов-антагонистов, которые были определены как узко-специализированные (*Serratia* sp. Ant-1A, *Kocuria* sp. Ant-3A, *Pseudomonas* sp. Ant-4A, *Bacillus* sp. Ant-9A) и штаммы с широким спектром действия метаболитов (*Paenibacillus* spp. Ant-5A и Ant-12A), которые угнетали рост сразу нескольких тест-культур.

Штаммы с широким спектром действия метаболитов *Paenibacillus* spp. Ant-5A и Ant-12A подтвердили свои антагонистические свойства, проявив антимикробную активность к 5 и 6 тест-культурам из 9 соответственно. Данные культуры показали максимальные зоны лизиса (15–17 мм) на четвёртые сутки культивирования для *S. aureus*. Дополнительно штамм *Paenibacillus* sp. Ant-12A является более активным, он уже на первые сутки культивирования угнетает рост тест-культуры *E. coli* K12 (9 мм), *E. faecium* – на четвёртые сутки (9 мм), *E. coli* M17-02 – на пятые (15 мм).

Предварительно охарактеризованные как узкоспециализированные, штаммы *Bacillus* sp. Ant-9A, *Serratia* sp. Ant-1A и *Kocuria* sp. Ant-3A показали в данном эксперименте множественную антимикробную активность.

Штамм *Bacillus* sp. Ant-9A проявил максимальную антагонистическую активность к тест-культуре *B. subtilis* ВКПМ на первые сутки культивирования (5 мм), к тест-культуре *S. aureus* – на шестые (13 мм). Антагонист *Serratia* sp. Ant-1A подавлял рост четырёх тест-культур, максимальную зону лизиса (5–6 мм) наблюдали на первые сутки в отношении *S. aureus* и

E. coli M17-02, а также на вторые сутки в отношении *B. subtilis* ВКПМ. *Kocuria* sp. Ant-3А проявил антимикробную активность (4 мм) к тест-культурам *B. subtilis* DSM и *B. subtilis* ВКПМ на первые и вторые сутки соответственно. Только *Pseudomonas* sp. Ant-4А подавлял рост единственной тест-культуры *E. faecium* на четвёртые сутки культивирования, при этом зона лизиса составила 4 мм.

В зависимости от видовой принадлежности антагониста необходимо учитывать продолжительность его культивирования для получения определённых метаболитов. Так, например, штаммы *Serratia* sp. Ant-1А и *Kocuria* sp. Ant-3А показали максимальную антагонистическую активность на первые-третьи сутки культивирования, остальные штаммы на четвёртые-шестые сутки.

Кроме того, при длительном культивировании следует учитывать способность антагонистов продуцировать метаболиты, подавляющие рост разных тест-культур.

Таким образом, бактерии рода *Paenibacillus* spp., выделенные из биоплёнок оз. Байкал, обладают широким спектром антимикробной активности и могут представлять практический интерес как продуценты разных биологически активных веществ.

Выводы

1. Идентификация гетеротрофов, выделенных из биоплёнок, сформированных на пластинах из горных пород оз. Байкал, показала, что они относятся к пяти родам: *Serratia* spp. Ant-1А и Ant-10А, *Kocuria* sp. Ant-3А, *Bacillus* spp. Ant-2А, Ant-8А и Ant-9А, *Pseudomonas* spp. Ant-4А и Ant-6А, *Paenibacillus* spp. Ant-5А, Ant-7А и Ant-12А.

2. Анализ штаммов-антагонистов на наличие ферментов показал, что они преимущественно вырабатывают амилазу. Штаммы *Bacillus* spp. Ant-2А и Ant-9А, *Pseudomonas* spp. Ant-4А и Ant-6А проявили множественную ферментативную активность.

3. Определение спектра антимикробной активности метаболитов позволило установить наиболее активные штаммы: *Paenibacillus* spp. (Ant-5А, Ant-12А) и *Bacillus* sp. Ant-9А, которые проявили максимальную активность в отношении следующих тест-культур: *S. aureus*, *E. coli* M17-02, *E. coli* K12 и *E. faecium*.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы «VI.55.1.3 Структура, динамика формирования и метаболический потенциал сообщества микроорганизмов и фагов в биопленках пресноводных водоемов», номер гос. рег. 01201353443.

Список литературы

1. Биоразнообразие и активность микробного сообщества горячего источника Котельниковский (оз. Байкал) / Н. Л. Белькова [и др.] // Изв. РАН. Сер. Биология. – 2005. – Т. 32, № 6. – С. 664–671.

2. Изучение видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Байкал / В. В. Парфенова [и др.] // Биология внутрен. вод. – 2006. – № 1. – С. 8–15.
3. Теркина И. А. Антагонистическая активность актиномицетов озера Байкал / И. А. Теркина, В. В. Парфенова, Т. С. Ан // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 195–199.
4. Фиалков В. А. Течения прибрежной зоны озера Байкал / В. А. Фиалков. – Новосибирск : Наука, 1983. – 193 с.
5. Flemming H. C. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures / H. C. Flemming // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol.59. – P. 629–640.
6. Long R. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria / R. Long, F. Azam // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, N 11. – P. 4975–4983.
7. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms / F. Sponga [et al.] // J. Biotechnol. – 1999. – Vol. 70. – P. 65–69.
8. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile* / N. S. Webster [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, N 1. – P. 434–444.

Antagonistic Activity of Heterotrophic Microorganisms Isolated from the Biofilms on Hard Substrates of Littoral Zone of Lake Baikal

E. A. Zimens^{1,2}, E. V. Sukhanova², Y. R. Shtykova², V. V. Parfenova²,
N. L. Bel'kova^{1,2}

¹ *Irkutsk State University, Irkutsk*

² *Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

Abstract. Identification of heterotrophic microorganisms from the biofilms formed on the plates subsurface rock developed representatives of the genera *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Kocuria* sp., *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. It was demonstrated that some strains able to inhibit the growth of natural bacteria of the genus *Bacillus* spp., as well a number of opportunistic pathogenic microorganisms that can cause various diseases in humans. Of particular interest are bacteria of the genus *Paenibacillus*, which possess a broad spectrum of antimicrobial activity, as compared to other strains antagonists. It is obvious that their study is of practical interest in biotechnology.

Keywords: antagonistic strains, biofilms, antagonistic activity, substrates, littoral zone, lake Baikal.

Зименс Екатерина Андреевна
студент

Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

Zimens Ekaterina Andreevna
Student

Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033

тел.: (3952)42–54–15
e-mail: ekaterinasiemens93@gmail.com

Суханова Елена Викторовна
кандидат биологических наук
научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–54–15
e-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Штыкова Юлия Рафиковна
кандидат биологических наук
младший научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952) 42–54–15
e-mail: tulupova@lin.irk.ru

Парфенова Валентина Владимировна
кандидат биологических наук, доцент
заведующая лабораторией
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952)42–54–15
e-mail: parf@lin.irk.ru

Белькова Наталья Леонидовна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел.: (3952)42–54–15
e-mail: belkovan@mail.ru,
belkova@lin.irk.ru

tel.: (3952)42–54–15
e-mail: ekaterinasiemens93@gmail.com

Sukhanova Elena Victorovna
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–54–15
e-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Shtykova Yuliya Rafikovna
Candidate of Sciences (Biology)
Junior Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–54–15
e-mail: tulupova@lin.irk.ru

Parfenova Valentina Vladimirovna
Candidate of Sciences (Biology)
Associate Professor, Head of Laboratory
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952)42–54–15
e-mail: parf@lin.irk.ru

Bel'kova Natalia Leonidovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952)42–54–15
e-mail: belkovan@mail.ru,
belkova@lin.irk.ru