

# **АЗЕРБАЙДЖАНСКАЯ РЕСПУБЛИКА**

*На правах рукописи*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АЗЕРБАЙДЖАНА НА АНТИБИОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ**

Специальность: 2415.01 – Молекулярная биология  
2422.01 – Биотехнология (включая  
бионанотехнологии)

Отрасль науки: Биология

Соискатель: **Агаева Айтан Габиль кызы**

### **АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
доктора философии

**Баку – 2022**

Диссертационная работа выполнена во Фраунгоферском центре молекулярной биотехнологии (США) и в международной лаборатории Молекулярной биотехнологии Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор, действительный член НАН Азербайджана  
**Гусейнова Ирада Мамед кызы**  
кандидат биологических наук, профессор  
**Юсубов Видади Мамедага оглы**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Таджикистана  
**Алиев Курбон Алиевич**  
доктор биологических наук, доцент  
**Цыганкова Виктория Анатольевна**  
Доктор медицинских наук, профессор  
**Аллахвердиев Адиль Мухаммедали оглы**

Диссертационный совет BFD 1.25 Высшей Аттестационной Комиссии при Президенте Азербайджанской Республики, действующий на базе Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики

Председатель диссертационного совета: *T. Salimov* доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Азербайджана  
**Шахмурадов Ильхам Эйюб оглы**

Ученый секретарь диссертационного совета: *[Signature]* доктор философии по биологии, доцент  
**Гурбанова Улдуса Ахмед гызы**

Председатель научного семинара: *[Signature]* доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана  
**Азизов Ибрагим Вагаб оглы**



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Начиная с 1928 года – года открытия пеницилина - и по сегодняшний день антибиотики являются основным оружием в борьбе с инфекционными заболеваниями. Однако, в последние годы, число устойчивых к антибиотикам бактерий (метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), устойчивый к карбапенемам *Acinetobacter baumannii* (CRAB), полирезистентный *Pseudomonas aeruginosa* (MDR) и др.) растет, и, к сожалению, многие коммерчески доступные антибиотики постепенно теряют свою эффективность. Для грамотрицательных патогенных микроорганизмов, несущих плазмиду с геном New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1), практически нет выбора для антибиотикотерапии, поскольку ген NDM-1 обладает способностью быстро распространяться между бактериями посредством горизонтального переноса и вызывает устойчивость почти ко всем имеющимся на рынке и находящимся на стадии разработки бета-лактамам антибиотикам<sup>1</sup>.

В то время как число устойчивых к антибиотикам штаммов растет с каждым днем, очень мало новых противомикробных препаратов проходит через фармацевтическую разработку. Это становится серьезной угрозой глобальному здоровью<sup>2</sup>. Следовательно, возникает острая необходимость в поиске и разработке новых безопасных и эффективных антимикробных соединений против бактериальных инфекций. На сегодняшний день возрастает интерес к антимикробным пептидам, которые считаются альтернативой традиционным антибиотикам<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Sabrowski, W. The use of high-affinity polyhistidine binders as masking probes for the selection of an NDM-1 specific aptamer / W.Sabrowski, N.Dreymann, A.Möller [et al.] // Scientific Reports, - 2022. 12, art. 7936, - p.1-11.

<sup>2</sup> Zhang, Z. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes / Z.Zhang, Q.Zhang, T.Wang [et al.] // Nature Communications volume, - 2022. 13, art. 1553, - p. 1-11.

<sup>3</sup> Wei, D. Biosynthesis, bioactivity, biotoxicity and applications of antimicrobial peptides for human health / D.Wei, X.Zhang // Biosafety and Health, - 2022. 4 (2), - p. 118-134.

Большинство противомикробных препаратов получены из натуральных продуктов, продуцентами которых в основном являются прокариоты<sup>4</sup>. 70% коммерчески доступных антибиотиков продуцируются почвенными бактериями, принадлежащими, в основном, к родам *Streptomyces* и *Bacillus*. С другой стороны, предполагается, что по сей день не идентифицированы и не культивировались в лабораторных условиях приблизительно 98% видов микроорганизмов<sup>5</sup>. Это означает, что все известные микробные биомолекулы, полезные для человека в качестве лекарств, биотоплива и т. д., продуцируются только теми 2-мя процентами видов микроорганизмов, которые идентифицированы на сегодняшний день. Так как большинство применяемых антибиотиков были выделены из живых организмов или представляют собой модифицированные соединения, структуры которых получены из натуральных продуктов, очень важно идентифицировать новые бактериальные штаммы, продуцирующие антимикробные препараты<sup>6</sup>.

Одним из важнейших элементов процесса открытия новых штаммов-продуцентов является образец, из которого изолируются бактерии. Вероятная причина невозможности идентифицировать новые антимикробные соединения может заключаться в том, что большая часть микроорганизмов, населяющих обычные исследуемые образцы почв, почти полностью изучена и охарактеризована. Считается, что новые биомолекулы можно идентифицировать из нетрадиционных источников, которые никогда не анализировались. Различные виды бактерий в течение сотен миллионов лет адаптировались и выживали в необычных условиях, формируя специфическую для

---

<sup>4</sup> Ali, S.M. Antimicrobial discovery from natural and unusual sources / S.M.Ali, R.Siddiqui, N.A.Khan // J Pharm Pharmacol., - 2018. 70 (10), - p. 1287-1300.

<sup>5</sup> Srinivasan, R. Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds / R.Srinivasan, A.Kannappan, C.Shi [et al.] // Mar. Drugs, - 2021. 19 (10), art. 530, - p. 1-36.

<sup>6</sup> Krell, T. Antimicrobial resistance: progress and challenges in antibiotic discovery and anti-infective therapy / T.Krell, M.A.Matilla // Microb Biotechnol., - 2022. 15 (1), - p. 70-78.

данных условий микробиоту. Предполагается, что бактерии, населяющие такие почвы, также выработали специфические продукты и механизмы для защиты от микробов-конкурентов.

Учитывая критическую важность разработки новых противомикробных препаратов, в центре внимания данной работы стояло создание коллекции микроорганизмов, включающей новые, ранее не культивированные штаммы бактерий. Для реализации поставленной цели из микробиоты нефтезагрязненных почв Азербайджана были выделены бактерии, которые никогда не анализировались с целью выявления у них способности синтезировать противомикробные препараты. Отсутствие в литературе информации об антимикробной активности штаммов бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв на территории Азербайджана, значительно увеличивает шансы выявить и исследовать новые культуры бактерий с ценными фармацевтическими и промышленными свойствами<sup>7</sup>.

**Объект и предмет исследования.** Объектами исследования служили штаммы бактерий, изолированные из 30 образцов нефтезагрязненных почв, отобранных в 2014 и 2016 годах из разных зон Азербайджана.

**Цель и задачи исследований.** Основная цель исследовательской работы заключалась в обнаружении и идентификации выделенных из нефтезагрязненных почв Азербайджана штаммов бактерий, продуцирующих новые антибактериальные соединения, а также изучении некоторых свойств этих биомолекул. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Выделить бактерии из нефтезагрязненных почв Азербайджана и проанализировать их на наличие антибактериальной активности;
- Идентифицировать активные штаммы методом

---

<sup>7</sup> Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. AZ-130 Strain from Oil-contaminated Soil of Azerbaijan: Isolation, Antibacterial Screening, and Optimization of Cultivation Conditions // Microbiology, - 2021, vol. 90, No. 6, - p. 754–762.

секвенирования гена 16S рРНК и выбрать штаммы для дальнейшей характеристики;

- Определить количество действующих компонентов супернатанта, обуславливающих антимикробную активность;
- Изучить некоторые свойства выбранных биомолекул (приблизительную молекулярную массу, устойчивость при низких значениях рН, способность растворяться в органических растворителях и др.);
- Оптимизировать условия выращивания выбранных штаммов;
- Определить и сравнить кинетику роста устойчивых к метициллину штаммов *S. aureus* в присутствии частично очищенных биомолекул;
- Сравнить активности супернатантов выбранных изолятов и близкородственных видов против штамм-индикаторов для дерепликации выбранных биомолекул;
- Оценить активность супернатантов выбранных изолятов и близкородственных видов друг против друга для дерепликации выбранных молекул;
- Осуществить сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена, обуславливающего антибактериальную активность в выбранном изоляте, и генов известных соединений методом ПЦР с использованием специфических праймеров.

**Методы исследования.** Для решения поставленных задач был использован комплекс микробиологических, биохимических, молекулярных и биотехнологических методов, включая спектрофотометрические, флуоресцентные, хроматографические и электрофоретические.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Микробиота нефтезагрязненных почв Азербайджана может служить хорошим источником бактерий, продуцирующих новые соединения для фармацевтического и промышленного применения;
- Экстракцию биомолекул органическим растворителем с последующей Высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и Матрично-активированной

лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) можно использовать для антибиотической дерепликации;

- Малоизученные представители рода *Bacillus* могут быть хорошими продуцентами новых соединений с антимикробной активностью.

**Научная новизна.** Впервые была создана и проанализирована на антимикробную активность коллекция бактериальных культур, изолированных из нефтезагрязненных почв Азербайджана. Из выделенных культур бактерий штамм AZ-130, обладающий высокой и стабильной активностью в супернатанте, путем секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Bacillus vallismortis*. ВЭЖХ анализ супернатанта AZ-130 показал, что штамм AZ-130 продуцирует одно соединение с антибактериальной активностью, время удерживания (Rt) которого в ВЭЖХ колонке составляет 12,854 мин. Биоактивное соединение AZ-130 подавляет рост и развитие устойчивого к метициллину штамма *S. aureus* при концентрации от 8 мкг/мл до 16 мкг/мл. Соединение, синтезируемое штаммом AZ-130, отличается от соединений, продуцируемых *Bacillus subtilis* по степени активности, структуре и механизму действия. Поиск в базе данных APD3 показал, что на данный момент нет известных антимикробных соединений с молекулярной массой 3319,6 Дальтон, продуцируемых бактериями *B. vallismortis*, а это подтверждает тот факт, что полученная в диссертационной работе биомолекула является новой для науки.

**Научная и практическая значимость работы.** Результаты научных исследований, полученные в данной работе, можно в будущем использовать для успешного обнаружения новых антимикробных соединений и их дерепликации. Полученные в ходе экспериментов результаты впервые показали, что нетрадиционные и малопроанализированные на наличие штаммов с антимикробной активностью почвы, такие как нефтезагрязненные, могут служить хорошим источником бактерий, продуцирующих антимикробные соединения. Отсутствие в литературе информации о том, что бактерия *B. vallismortis* продуцирует какие-либо антибактериальные

соединения с молекулярным весом 3319,6 Дальтон, а также, высокая активность биомолекулы AZ-130 против грамположительных бактерий, особенно против *S. aureus*, является перспективным и многообещающим свойством для рассмотрения ее в качестве кандидата на новое противомикробное средство.

**Апробация результатов работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены и докладывались на международных и республиканских конференциях: на международной научной конференции “New Technologies, New Vaccines (NTNV)” (США, Вилмингтон, 2016), на 2-ой международной научной конференции “One Health: Problems & Solutions” (Баку, 2019), на 1-ой Республиканской студенческой научной конференции «Успехи химии и химической технологии», посвященной 96-летию со дня рождения общенационального лидера Азербайджана Гейдара Алиева (Баку, 2019), на международной онлайн конференции на тему “Пандемия коронавируса: от научных исследований к здоровому будущему” (Баку, 2020), на первом международном двустороннем онлайн семинаре по науке между университетом Докуз Эйлюль и Национальной академией наук Азербайджана (Онлайн, 2021), на Международной конференции по сельскому хозяйству AGRO (Гянджа, 2022), на 3-ем Карабахском Международном конгрессе прикладных наук «Год Шуши-2022» (Баку, 2022), на международной конференции «Биоразнообразие, почвенные и водные ресурсы Шуши и прилегающих территорий: взгляд в будущее» (Шуша и Баку, 2022).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликованы 15 научных трудов, из которых 7 – статьи, опубликованные в республиканских и международных журналах, и 8 тезисов.

**Название учреждения, где выполнена диссертационная работа.** Диссертационная работа выполнена во Фраунгоферском центре молекулярной биотехнологии (США) и в международной лаборатории Молекулярной биотехнологии Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и



Образования Азербайджанской Республики.

**Общий объем диссертации с учетом количества знаков структурных разделов в отдельности.** Диссертационная работа изложена на 194 страницах машинописного текста (240459 знаков), содержит 17 таблиц, 47 рисунков, 1 график, 1 схему и 1 приложение. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы из 272 наименований, 80% из которых публикации последних 15 лет и 62% – последних 10 лет. В структуре диссертационной работы число знаков без учета таблиц, рисунков, графиков, схем, приложений (25 страниц, 32104 знаков), списка литературы (30 страниц, 47229 знаков) и списка сокращений (2 страницы, 1878 знаков) составляет 170008: введение – 6 страниц (9869 знаков), I глава – 36 страницы (59094 знаков), II глава – 28 страниц (42073 знаков), III глава – 12 страниц (17467 знаков), IV глава – 5 страниц (6527 знаков), V глава – 3 страниц (3916 знаков), VI глава – 8 страниц (14034 знаков), заключение – 6 страниц (10275 знаков), выводы – 2 страницы (2289 знаков).

## **ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В этом разделе приведена информация о натуральных продуктах, их использовании в качестве источника новых биоактивных соединений, разработке лекарственных препаратов на основе натуральных продуктов, антибиотиках и их классификации, бактериальных патогенах, роде *Bacillus* как продуцента вторичных метаболитов и антимикробных пептидов (АМП). Также описаны механизмы действия антибиотиков и АМП.

## **ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Объектами исследования служили 578 штаммов бактерий, изолированных из 30 образцов нефтезагрязненных почв, отобранных в 2014 и 2016 годах из разных зон на территории Азербайджана.

Изоляцию бактерий осуществляли по методу стандартного серийного разведения<sup>8</sup>. Все штаммы коллекции хранили в трех экземплярах при -80°C в 15% глицерине.

Скрининг бактериальных культур и супернатантов (СН) против четырех условно-патогенных штаммов – индикаторов (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* DC0 и *E. coli* DC2), а также против шести штаммов *B. subtilis* (1 контрольный штамм и 5 штаммов, устойчивых к известным антибиотикам) и четырех штаммов *E. coli* (1 контрольный штамм и 3 штамма, устойчивых к известным антибиотикам) проводили методом подавления роста<sup>7</sup>.

Идентификацию представляющих интерес изолятов проводили методом секвенирования гена 16S рРНК в лаборатории Charles River.

Момент времени на кривой роста, в котором изолят начинает секретировать биоактивное соединение в СН, был определен путем анализа СН, собранных в разное время инкубации (14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 и 34 ч) методом подавления роста. Также в соответствующие моменты времени была измерена оптическая плотность (ОП).

Устойчивость биомолекул при низких рН определяли путем добавления к СН трифторуксусной кислоты (ТФА) (конечная концентрация ТФА - 0,1%). Полученный материал центрифугировали с последующей фильтрацией через 0,22 мкм PES мембрану и анализировали на наличие активности методом подавления роста. Контроль - ТВ среда.

Обладающие антибактериальной активностью СН изолятов экстрагировались 40% ацетонитрилом (ACN), содержащим 0,1% ТФА. TSB был экстрагирован в качестве контроля. Органически растворимую фазу СН переносили в новые пробирки и лиофилизировали. Осадок растворяли в 90 мкл стерильного однократного натрий-фосфатного буфера (PBS) и анализировали на наличие антибактериальной активности. Лиофилизированную

---

<sup>8</sup> Prabha, S. Assessment of the impact of textile effluents on microbial diversity in Tirupur district, Tamil Nadu / S.Prabha, A.Gogoi, P.Mazumder [et al.] // Applied Water Science, - 2011, 7, - p. 2267–2277.

органически растворимую фазу ресуспендировали в 150 мкл 95% H<sub>2</sub>O/5% ACN растворе, содержащем 0,1% TFA (w/v), центрифугировали, СН собирали и отфильтровывали, затем анализировали посредством ВЭЖХ, следуя протоколу<sup>7</sup>. Все активные ВЭЖК фракции были объединены, лиофилизированы, ресуспендированы и снова проанализированы методом ВЭЖХ. Собранные фракции и загруженный в колонку материал анализировали методом подавления роста. Активные фракции ВЭЖХ были лиофилизированы, ресуспендированы в сверхчистой H<sub>2</sub>O и отправлены на МАЛДИ анализ в химический факультет Университета Делавэра.

Для оптимизации условий культивирования продуцентов были протестированы четыре различных типа сред (TSB, ТВ, TSB + 2% глюкозы и ТВ + 2% глюкозы) при четырех различных температурах (18°C, 25°C, 32°C и 37°C). СН собирали и очищали в 1-й, 2-й и 3-й/5-й дни и анализировали методом подавления роста и микроразведения в бульоне<sup>7</sup>.

Количество антибактериальных компонентов в СН продуцентов было детектировано посредством ВЭЖХ анализа СН. Контроль - ТВ среда<sup>7</sup>.

Пороговое значение молекулярной массы биоактивного соединения определяли путем 10-кратного концентрирования СН, используя центробежные фильтрующие концентраторы 3K MWCO Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices<sup>9</sup>.

Кинетику роста устойчивого к метициллину штамма *S. aureus* ChH-11 определяли в присутствии частично очищенной биомолекулы AZ-130 и метициллина в диапазоне концентрации от 16 мкг/мл до 1 мкг/мл. Эксперимент осуществлен трижды в 96-ячеечной планшете с использованием аппарата Molecular Devices Spectra MaxPlus<sup>10</sup>.

---

<sup>9</sup> Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. Study of the molecular mass of AZ-130 biomolecule and its stability at low pH // Journal of Life Sciences and Biomedicine, - 2022, vol. 4 (77), No 1, - p. 40-45

<sup>10</sup> Aghayeva A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. Influence of the AZ-130 biomolecule on the growth kinetics of the methicillin-resistant *S. aureus* strain // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, - 2022, vol. 6, No.1, - p. 12-15

Для сравнительного анализа бактерий AZ-130 и *B. subtilis*, вначале определяли кинетику роста данных штаммов в четырех различных питательных средах (TSB, TB, TSB+NaCl, MB) в 96-ячеечной планшете с использованием аппарата Molecular Devices Spectra MaxPlus. Эксперимент повторяли трижды. Культуры AZ-130 и *B. subtilis* и их СН были проанализированы на наличие активности против *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecium* и *E. coli* (ATCC 25922, DC0) методом подавления роста. СН штамма AZ-130 и *B. subtilis* были проанализированы на антимикробную активность против самих бактерий AZ-130 и *B. subtilis*, а также против *Lactococcus lactis subsp. Lactis* ATCC 11454 методом микроразведения в бульоне и подавления роста.

Бактериальную ДНК выделяли используя мини-набор Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (кат. № 69104). Селективную амплификацию гена субтилина (*spaS*) AZ-130 и *B. subtilis* проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл с использованием двух геном-специфических праймеров *spaS*-seqR и *spaS*-seqF. В качестве матрицы для дизайна праймеров использовали геном *B. subtilis* (Genbank: U09819.1). Разделение продуктов ДНК проводили в 1,5% агарозном геле с помощью горизонтального электрофореза. Размеры ампликонов определяли по сравнению с маркером GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ГЛАВА III. СОЗДАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ, ЕЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ И ВЫБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ

#### 3.1. Создание бактериальной коллекции и ее скрининг на антибактериальную активность

##### Создание бактериальной коллекции

Из 30 образцов нефтезагрязненных почв было выделено 578 аэробных бактериальных культур, которые отличались по своим морфологическим характеристикам. 2 штамма (AZ-69 и AZ-237)

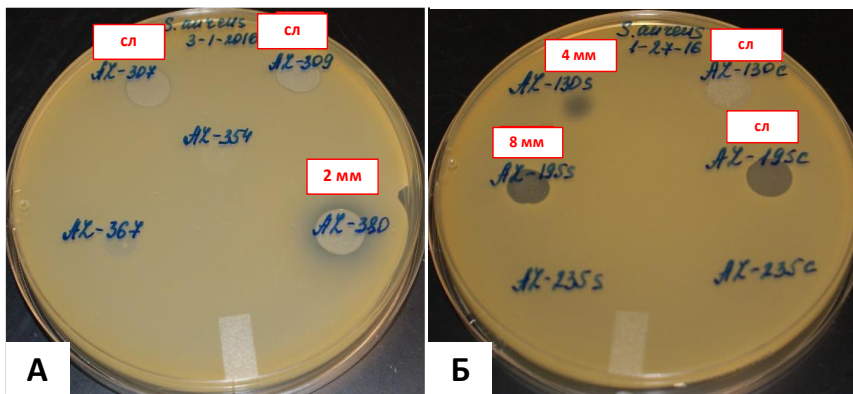
из глицеринового стока не выросли.

### Антибактериальный скрининг культур и супернатантов

Из 576 проанализированных бактерий (Рис. 1А) 62 изолята обладали антибактериальной активностью по крайней мере против одного организма-индикатора и были идентифицированы как «изоляты, представляющие интерес». 14 штаммов обладали активностью против грамположительных штаммов-индикаторов в СН (Рис. 1Б). Они были идентифицированы как «наиболее перспективные изоляты» и рассматривались как потенциальный продуцент новых биомолекул.

### Скрининг изолятов против штаммов *B. subtilis* и *E. coli*, обладающих устойчивостью к определенным антибиотикам

Для исключения из списка «наиболее перспективных изолятов» штаммов, продуцирующих известные антибиотики, был осуществлен скрининг СН выбранных бактерий против штаммов *B. subtilis* и *E. coli*, несущих плазмиды, обеспечивающие устойчивость к определенным антибиотикам.



**Рисунок 1.** Антибактериальный скрининг против *S. aureus* ATCC 29213: А - культуры; Б - супернатанты.

Примечание: сл - слабая активность.

СН штаммов AZ-279, AZ-302, AZ-380, AZ-402, AZ-411, AZ-

437, AZ-463, AZ-469 и AZ-477 проявляли активность против контроля и всех устойчивых к антибиотикам штаммов *B. subtilis*. Антибактериальные препараты, продуцируемые этими штаммами, обладают высокой активностью против грамположительных штаммов-индикаторов и, скорее всего, механизм их активности отличается от известных протестированных антибиотиков. Мы не обнаружили никакой активности против грамотрицательных штаммов. Все 14 штаммов могут быть кандидатами на источники получения новых антимикробных соединений.

### **3.2. 16S рДНК идентификация штаммов**

Изоляты с высокой активностью в культуре и СН были отправлены в лабораторию Charles River для секвенирования гена 16S рДНК. Были идентифицированы 28 штаммов бактерий, принадлежащих к 12 видам и на их основе создана коллекция продуцентов антимикробных соединений.

После 16S рДНК идентификации выбранных изолятов был осуществлен литературный поиск и поиск в базе данных APD3, чтобы узнать, какие известные антимикробные молекулы продуцируют изолированные нами штаммы. На основании результатов, штаммы AZ-130 (*B. vallismortis*), AZ-195 (*B. salsus*, 0,09%) и AZ-279 (*B. mojaviensis* / *B. subtilis*) были выбраны для дальнейшей характеристики.

### **3.3. Минимальное время инкубации, при котором продуцент начинает секретировать биоактивное соединение в супернатант**

ОП всех трех штаммов увеличивалась с течением времени. Только штамм AZ-130 показал высокую и стойкую активность в СН начиная с 20 часов и в течение всего наблюдаемого периода, что очень важно для дальнейших экспериментов, так как рост данного штамма и секрецию биомолекулы в больших количествах легче масштабировать, чем для остальных двух штаммов.

### 3.4. Устойчивость супернатантов при низких значениях рН

Анализ степени устойчивости СН к низким значениям рН показал, что активность биомолекулы AZ-130 против *S. aureus* до и после добавления TFA не меняется, составляя 12 мм в обоих случаях (Рис. 2). В СН штаммов AZ-195 (активность - 9 мм/неполная) и AZ-279 (10 мм) изменений в активности после добавления TFA также не наблюдалось. Активность в контрольных вариантах (ТВ и ТВ+0,1% TFA) отсутствовала. Биоактивные молекулы, продуцируемые выбранными нами штаммами устойчивы при низких значениях рН.

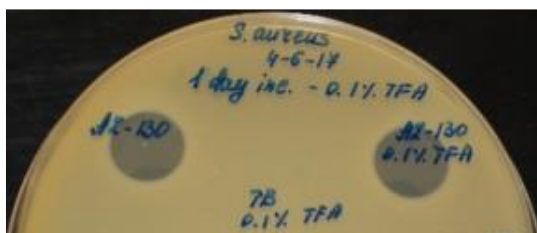


Рисунок 2. Устойчивость супернатанта штамма AZ-130 при низких значениях рН.

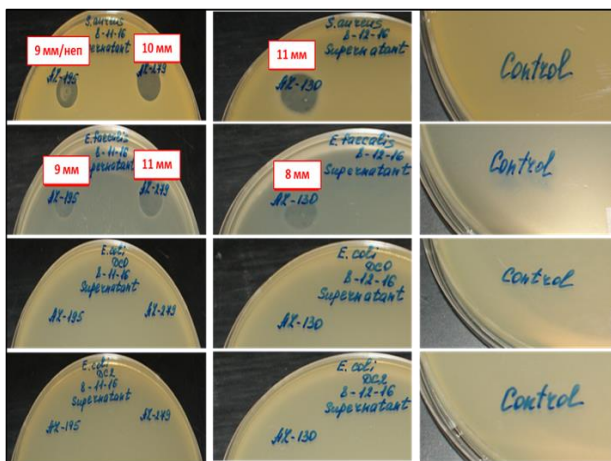
### 3.5. Экстракция биомолекул органическим растворителем с последующей ВЭЖХ и МАЛДИ

#### Экстракция биомолекул 40% ацетонитрилом, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты

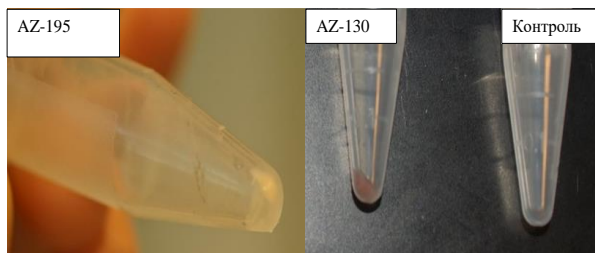
Вначале СН штаммов AZ-130, AZ-195 и AZ-279 анализировались на антибактериальную активность против штаммов-индикаторов. СН штамма AZ-130 обладал активностью, равной 11 мм против *S. aureus* и 8 мм против *E. faecalis*, активность СН штамма AZ-195 составляла 9 мм/неполная против *S. aureus* и 9 мм против *E. faecalis*, для СН штамма AZ-279 отмечена активность 10 мм против *S. aureus* и 11 мм против *E. faecalis*. Контрольный вариант активностью не обладал. Мы не обнаружили активности против *E. coli* (Рис. 3).

СН штаммов AZ-130, AZ-195 и AZ-279 экстрагировались 40% АСН/0,1% TFA. Для каждого из штаммов экстрагировали 5x900 мкл СН. TSB был экстрагирован в качестве контроля.

Добавление органического растворителя способствовало осаждению некоторых компонентов (Рис. 4). Отсутствие осадка в контроле свидетельствовало о том, что осаждались именно те компоненты, которые секретировались продуцентом за время инкубации.



**Рисунок 3.** Антибактериальная активность контрольного варианта и супернатантов штаммов AZ-130, AZ-195 и AZ-279 против *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis*, *E. coli* (DC0 и DC2).  
Примечание: неп – неполное ингибирование.



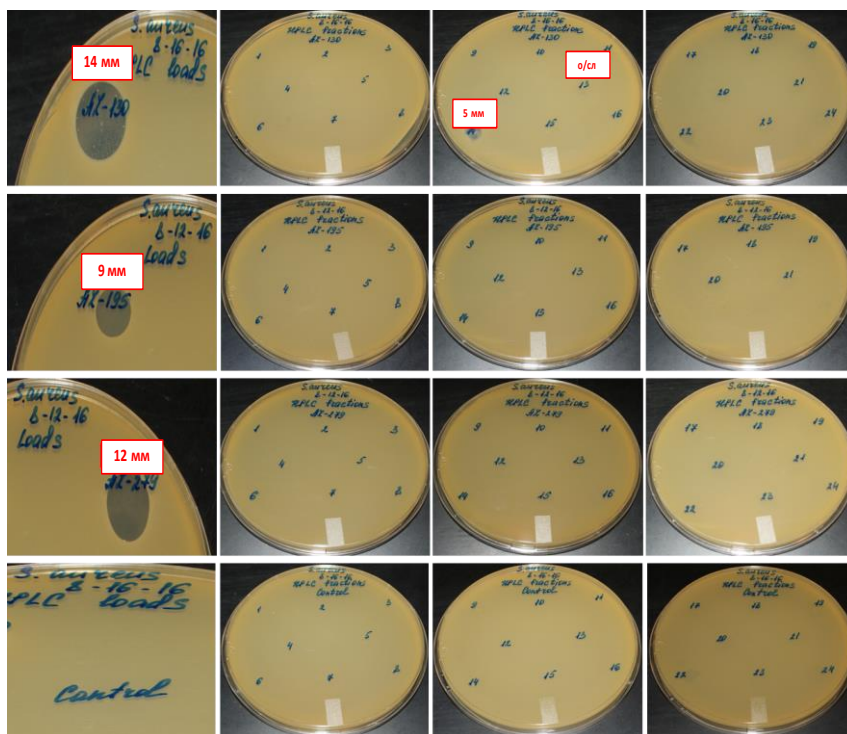
**Рисунок 4.** Осадки, полученные после добавления 40% АСН/0,1% ТФА к контролю и супернатантам штаммов AZ-130 и AZ-195.

Осадки растворяли в 90 мкл 1xPBS и анализировали на наличие антибактериальной активности. В осадке активность отсутствовала, то есть интересующие нас молекулы оставались в органически растворимой фазе. Следовательно, посредством органических растворителей можно частично очистить активную биомолекулу от некоторых компонентов СН, которые продуцент секретирует за время инкубации.



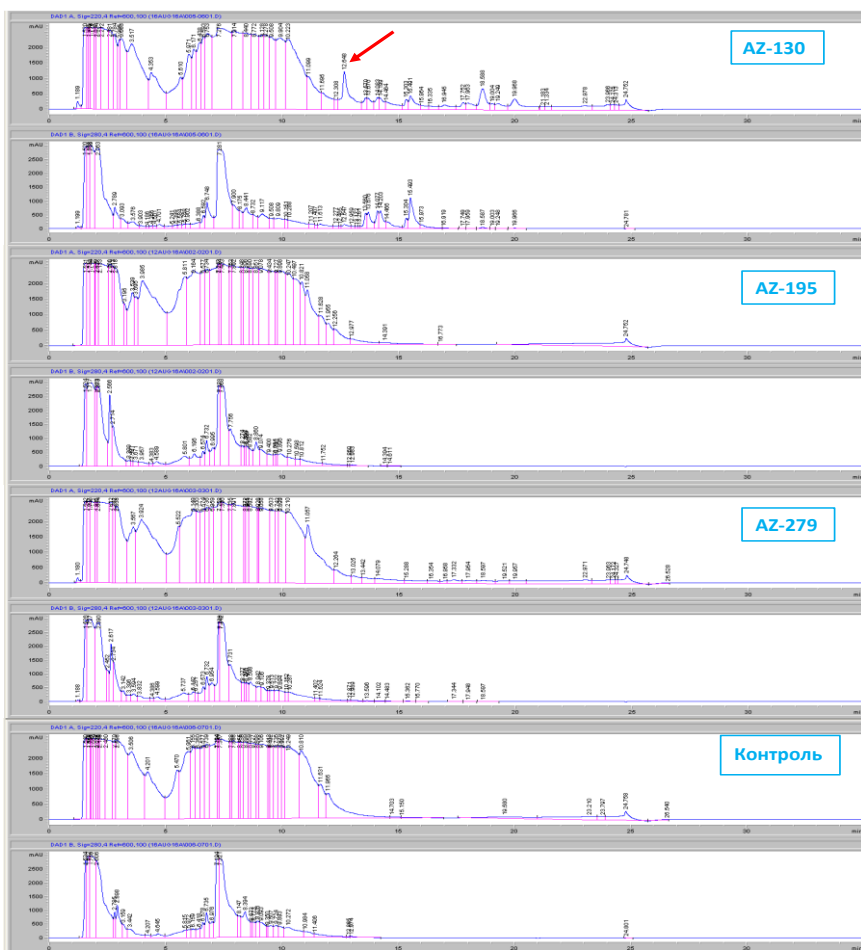
## ВЭЖХ анализ органически растворимой фазы супернатанта штамма AZ-130

Органически растворимую фазу после лиофилизации растворили и проанализировали посредством ВЭЖХ. Все загруженные в ВЭЖХ колонку материалы, кроме контрольного варианта, обладали активностью против *S. aureus* ATCC 29213: AZ-130 - 14 мм, AZ-195 - 9 мм и AZ-279 - 12 мм. Только две ВЭЖХ фракции, собранные из органически растворимой фазы СН штамма AZ-130 обладали активностью против *S. aureus* ATCC 29213: фракция 13 - очень слабая и фракция 14 - 5 мм. В загруженном материале и собранных фракциях контроля активность отсутствовала (Рис. 5).



**Рисунок 5.** Антибактериальная активность загруженных в ВЭЖХ колонку материалов и собранных фракций органически растворимых фаз контроля и супернатантов штаммов AZ-130, AZ-195, AZ-279 против *S. aureus* ATCC 29213. Примечание: о/сл – очень слабая активность.

Пик на хроматограмме AZ-130 со временем удерживания 12,648 мин соответствует активной фракции 13, продолжение этого пика также наблюдается во фракции 14 (Рис. 6). Следовательно, пик высотой 1200 mAU и со временем удерживания (Rt) 12,648 мин соответствует биомолекуле AZ-130. Сравнивая хроматограммы AZ-130 и контроля, можно сказать, что мы частично очистили активную биомолекулу AZ-130 от многих компонентов среды, наблюдаемых до и после интересующего нас пика.



**Рисунок 6.** ВЭЖХ хроматограммы органически растворимых фаз контроля и супернатантов штаммов AZ-130, AZ-195, AZ-279.

Вся активность остается в органически растворимой фазе, в которой по сравнению с СН активность увеличивается на несколько мм, что непосредственно связано с объемами анализируемых материалов. Так, общий объем начального СН был равен 900 мкл, а объем ресуспендированной после лиофилизации органически растворимой фазы – 150 мкл (концентрирован в 6 раз). Высокая активность, наблюдаемая в СН, ослабевает в собранных фракциях, что также связано с объемами анализируемых материалов: объем загруженного материала был равен 100 мкл, а общий объем активных фракций 13 и 14 – 2 мл, что означает, что активность разбавляется приблизительно в 20 раз.

Из проанализированных трех молекул только биомолекула, секретируемая штаммом AZ-130, связывается к ВЭЖХ колонке и элюируется. Учитывая полученные результаты, на следующем этапе мы продолжили работу только с биомолекулой AZ-130.

### **ВЭЖХ анализ органически растворимых фаз супернатантов штамма AZ-130**

Изначально для каждого штамма были экстрагированы 5 пробирок с СН. Выше представлены результаты анализа только одной пробирки. Содержимое остальных 4-х пробирок (только органически растворимых фаз СН штамма AZ-130) были вновь проанализированы методом ВЭЖХ.

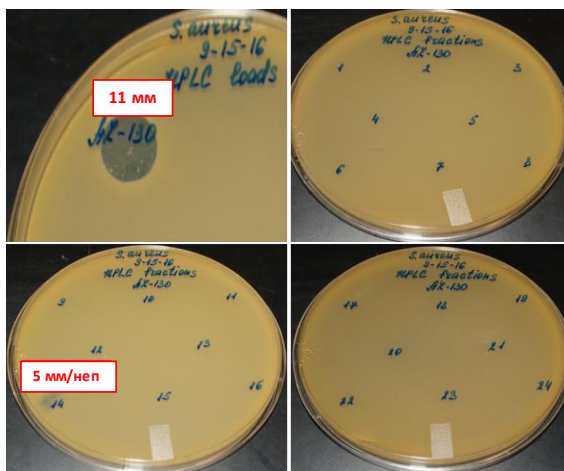
Все загруженные в ВЭЖХ колонку материалы обладали активностью против *S. aureus* ATCC 29213: при первой ВЭЖХ – 15 мм, при второй – 13 мм, при третьей – 14 мм и при четвертой – 14 мм. В первых двух ВЭЖХ только фракция 13 показала очень слабую активность против *S. aureus* ATCC 29213, в двух остальных - фракции 13 и 14 показали соответственно слабую и очень слабую активность.

Полученные результаты аналогичны результатам предыдущего эксперимента: высокая активность загруженного в колонку материала, наличие активных фракций и ВЭЖХ пик со временем удерживания ~12,66 мин, соответствующий соединению AZ-130. Ослабление активности может быть связано с хранением лиофилизированного материала в виде порошка при -80°C. По

результатам двух последних экспериментов мы получили 8 активных и частично очищенных фракций биомолекулы AZ-130.

### ВЭЖХ анализ восьми объединенных активных фракций

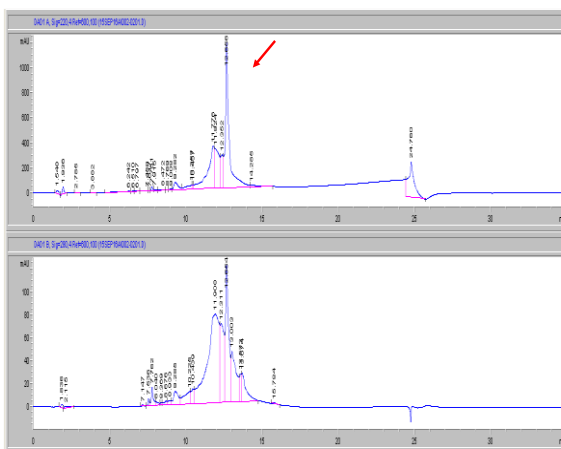
Все активные восемь фракций, полученные в результате пяти ВЭЖХ, были объединены, лиофилизированы, ресуспендированы и снова проанализированы методом ВЭЖХ (Рис. 7, Рис. 8).



**Рисунок 7.**

Антибактериальная активность против *S. aureus* ATCC 29213 загруженного в ВЭЖХ колонку материала и собранных фракций объединенных фракций 13, 14 из пяти ВЭЖХ органически растворимых фаз супернатантов штамма AZ-130.

Примечание: неп – неполное ингибирование.



**Рисунок 8.** ВЭЖХ

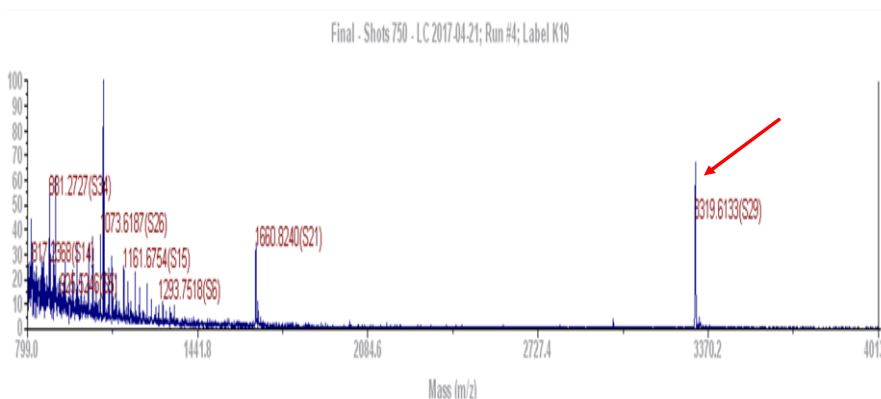
хроматограмма восьми объединенных активных фракций.

Загруженный в колонку материал обладал активностью в 11 мм против *S. aureus* ATCC 29213. Фракция 14, которая

приходится на пик со временем удерживания 12,666 мин, показывала 5 мм/несовершенную активность. На хроматограмме отсутствуют многие пики, которые наблюдались в начальном СН. Этот частично очищенный материал (фракция 14) был лиофилизирован, ресуспендирован в сверхчистой H<sub>2</sub>O и отправлен на МАЛДИ анализ для получения частичной информации о строении биомолекулы AZ-130.

### **МАЛДИ анализ активной ВЭЖХ фракции**

Молекулярная масса биомолекулы AZ-130 может быть равна 3319,6 Да (Рис. 9). После этого, мы сфокусировались только на соединении AZ-130, так как в литературе нет данных про антибактериальную биомолекулу, продуцируемую бактерией *V. vallismortis* с молекулярной массой 3319,6 Да.



**Рисунок 9.** МАЛДИ анализ активной ВЭЖХ фракции 14.

## **ГЛАВА IV. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ БОЛЕЕ ВЫСОКОЙ ПРОДУКЦИИ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

### **4.1. Анализ супернатантов методом подавления роста**

Штамм AZ-130 производит наибольшее количество антимикробного соединения при культивировании в условиях 32°C и 37°C. В СН, собранных из культур AZ-130, выращенных

при 18°C антимикробная активность не отмечалась. Некоторая активность наблюдалась в СН, полученных из культур, выращенных при 25°C, но она не была настолько выраженной, как в СН, собранных из культур, выращенных при 32°C и 37°C (таблица 1).

Чтобы иметь возможность сравнить концентрацию антибактериальных единиц в активных СН, собранных из культур, выращенных при 32°C и 37°C, они были проанализированы методом микроразбавления в бульоне.

Таблица 1

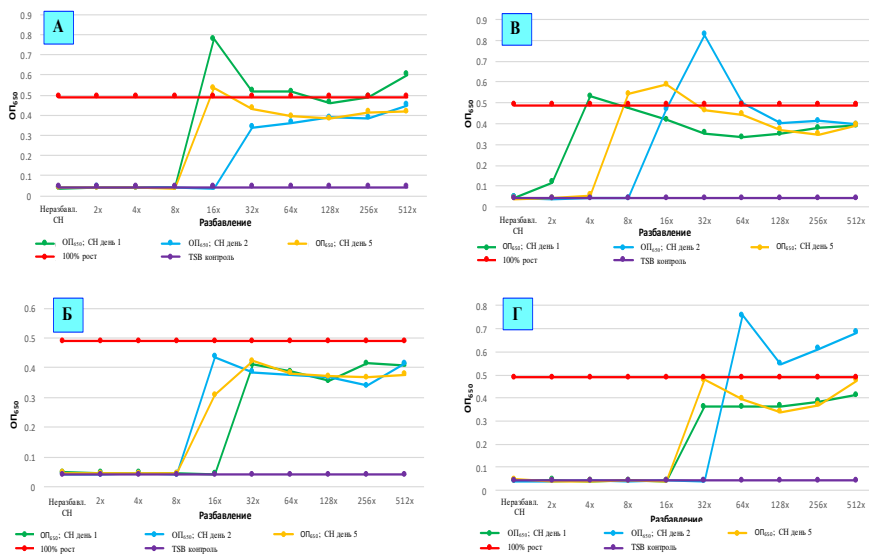
Сравнительный анализ активности супернатантов штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, проведенный с использованием метода подавления роста

Температура	Среда	Зона подавления роста (ЗПР), мм		
		СН в день 1	СН в день 2	СН в день 3/день 5
18°C	TSB	-	-	-
	TB	-	-	-
	TSB+2 % глюкоза	-	-	-
	TB +2 % глюкоза	-	-	-
25°C	TSB	-	6 /неполн	-
	TB	сл	9	сл
	TSB + 2% глюкоза	-	-	-
	TB + 2% глюкоза	-	-	-
32°C	TSB	8	11	4
	TB	12	11	7
	TSB + 2% глюкоза	-	сл	-
	TB + 2% глюкоза	4	8	7
37°C	TSB	11	12	10
	TB	11	11	5/неполн
	TSB + 2% глюкоза	-	11	7
	TB + 2% глюкоза	10	12	10

Примечания к таблице: «-» означает отсутствие активности; сл – слабая активность; неполн – неполное ингибирование.

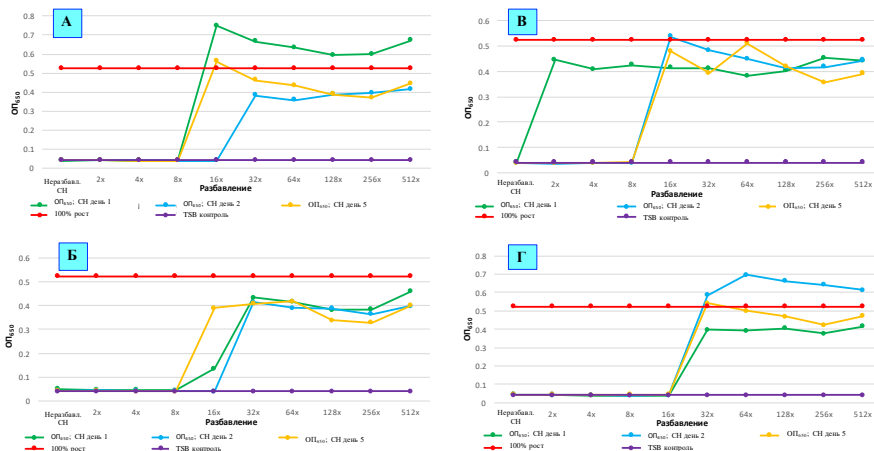
## 4.2. Анализ супернатантов методом микроразведения в бульоне

Наибольшая продукция соединения AZ-130 штаммом AZ-130, выращенным при 32°C, в трех из четырех протестированных сред наблюдается на 2-й день. СН, собранный из среды TSB + 2% глюкозы активен после 8-кратного, среды TSB - после 16-кратного и среды ТВ + 2% глюкозы после 32-кратного разведения. СН, собранный из среды ТВ, показывает свою максимальную активность при 16-кратном разведении в день 1 (Рис. 10).



**Рисунок 10.** Кинетика роста *S. aureus* ATCC 29213 в присутствии супернатанта штамма AZ-130, выращенного при 32°C и очищенного от: А) среды TSB; Б) среды ТВ; В) среды TSB + 2% глюкозы; Г) среды ТВ + 2% глюкозы.

Активность разведенного в 16 раз СН, полученного из среды ТВ + 2% глюкозы (37°C), стабильна даже после пяти дней инкубации. СН штамма AZ-130, полученные из сред ТВ и TSB, показали максимальную 16-кратную активность на 2-й день инкубации при 37°C; СН, собранные из среды TSB + 2% глюкозы, показали максимальную 8-кратную активность на 2 и 5 дни (Рис. 11).



**Рисунок 11.** Кинетика роста *S. aureus* ATCC 29213 в присутствии супернатанта штамма AZ-130, выращенного при 37°C и очищенного от: А) среды TSB; Б) среды TB; В) среды TSB + 2% глюкозы; Г) среды TB + 2% глюкозы.

Результаты, полученные при считывании ОП при 650 нм были визуально подтверждены и полностью совпали с результатами измерения флуоресценции в ячейках при возбуждении 560 нм и эмиссии 590 нм. Штамм AZ-130 производит наибольшее количество антибактериального соединения, когда растет в среде TB + 2% глюкозы при 32°C в течение двух дней; число ингибирующих единиц в СН как минимум в два раза выше по сравнению со всеми другими исследуемыми условиями. Наблюдаемая активность высокая и стабильная, поскольку биомолекула AZ-130 не теряет активности даже после 5 дней инкубации.

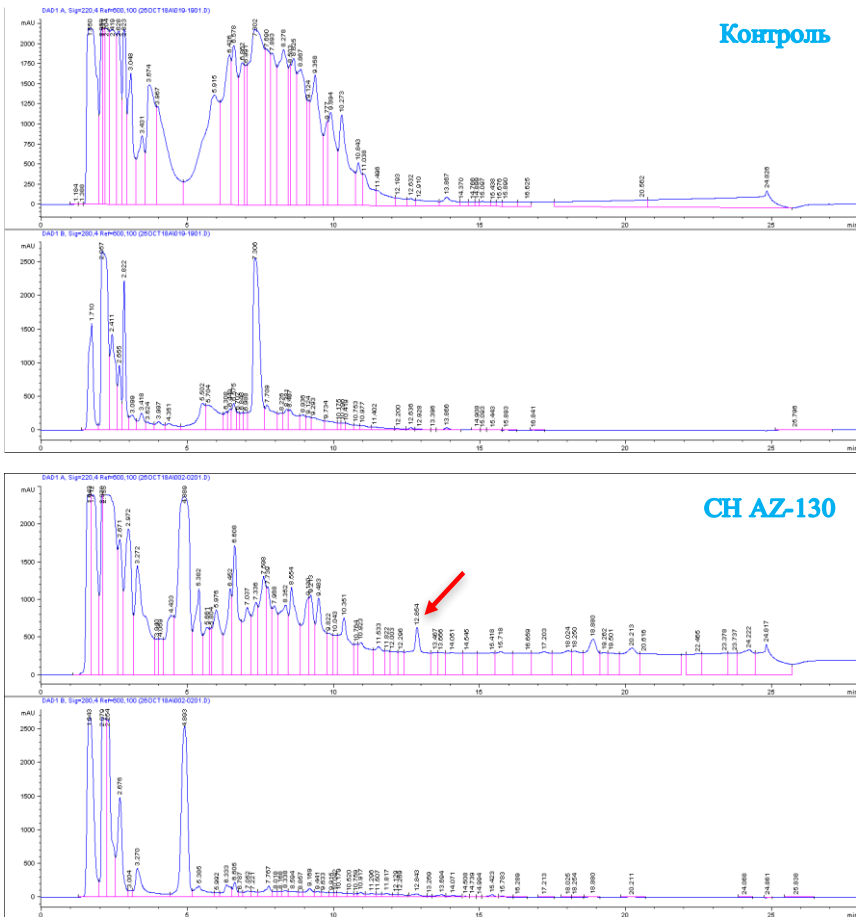
## ГЛАВА V. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ СУПЕРНАТАНТА И ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОЙ БИМОЛЕКУЛЫ ШТАММА AZ-130

### 5.1. Количество антибактериальных компонентов в супернатанте штамма AZ-130

ВЭЖХ анализ СН штамма AZ-130 (ЗПР=10мм) выявил две активные фракции - 13 и 14, обладающие соответственно слабой



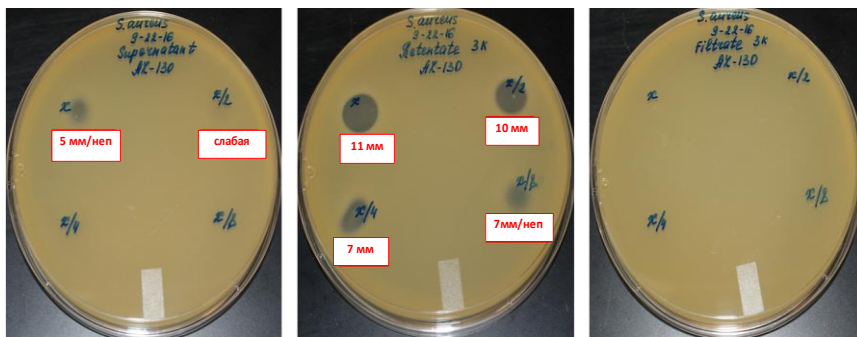
и 4 мм активностью против *S. aureus* ATCC 29213. В загруженном материале и собранных фракциях контроля активность отсутствовала. Пик на хроматограмме AZ-130 со временем удерживания 12,854 мин соответствовал фракции 13, продолжение этого пика также наблюдалось во фракции 14 (Рис. 12). Отсутствие активности во всех остальных фракциях свидетельствует о том, что штамм AZ-130 продуцирует одно соединение с антибактериальной активностью, время удерживания которого в ВЭЖК колонке составляет 12,854 мин.



**Рисунок 12.** ВЭЖХ хроматограммы супернатанта штамма AZ-130 и контроля.

## 5.2. Пороговое значение молекулярной массы соединения AZ-130

Активность неразбавленного СН штамма AZ-130 против *S. aureus* ATCC 29213, равная 5 мм/неполная, после 10-тикратного концентрирования увеличилась до 11 мм. 4-хкратно и 8-кратно разбавленный СН не обладал активностью, в то время как, 4-хкратно и 8-кратно разбавленный концентрат показывал, соответственно, 7 мм и 7 мм/неполную активность. Активность в фильтрате отсутствовала, что свидетельствовало о том, что молекулярная масса антимикробного соединения AZ-130, больше 3000 Да (Рис. 13). Таким образом, результаты МАЛДИ анализа были подтверждены.



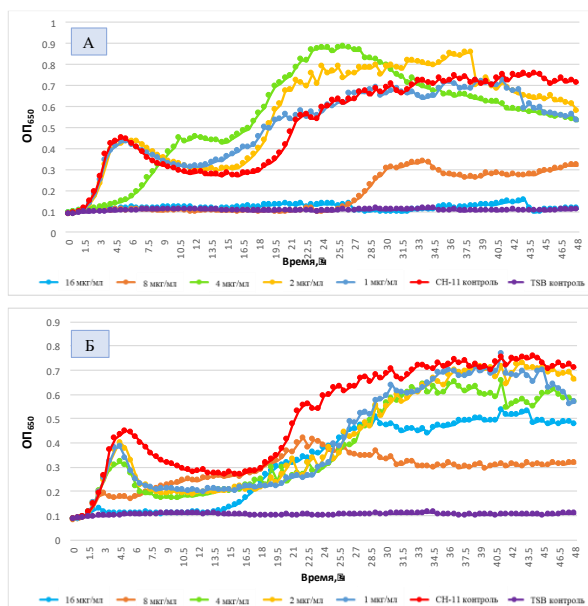
**Рисунок 13.** Антибактериальная активность супернатанта, ретендата и фильтрата в различных разведениях против *S. aureus* ATCC 29213.  
*Примечание:* неп – неполное ингибирование.

## 5.3. Кинетика роста *S. aureus* в присутствии частично очищенной биомолекулы AZ-130

Было установлено, что штамм *S. aureus* ChH-11 устойчив к метициллину. Метициллин способствует снижению роста этого штамма при концентрации 8 мкг/мл, однако полностью рост не подавляет. При концентрации метицилина 16 мкг/мл наблюдается полное ингибирование роста штамма-индикатора в течение первых 14 часов, после чего ОП начинает увеличиваться.

Концентрации биомолекулы AZ-130, равные 1 мкг/мл и 2 мкг/мл не оказывают никакого влияния на рост штамма ChH-11. При концентрации 4 мкг/мл наблюдается некоторое подавление

роста в течении первых 3 часов, после чего начинается рост штамма ChH-11(Рис. 14). Концентрации биомолекулы AZ-130, равные 8 мкг/мл и 16 мкг/мл, полностью подавляют рост штамма ChH-11 в первый день инкубации, однако при концентрации AZ-130, равной 8 мкг/мл, начиная с 25 часов наблюдается рост штамма ChH-11 до ОП 0,3. Биомолекула AZ-130 при концентрации 16 мкг/мл полностью ингибирует рост и развитие штамма ChH-11 в течение всего времени инкубации.



**Рисунок 14.** Кинетика роста устойчивого к метицилину штамма ChH-11 (*S. aureus*) в присутствии частично очищенной биомолекулы AZ-130 (А) и метицилина (Б).

## ГЛАВА VI. СРАВНЕНИЕ ШТАММОВ AZ-130 И *B. SUBTILIS*, А ТАКЖЕ ПРОДУЦИРУЕМЫХ ЭТИМИ ШТАММАМИ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Установлено, что бактерия *B. vallismortis*, к которой относится штамм AZ-130, очень схожа с *B. subtilis*<sup>11</sup>,

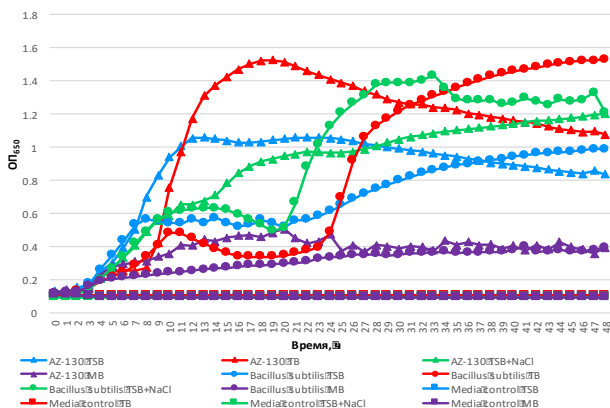
<sup>11</sup> Earl, A.M. Whole-Genome Sequences of *Bacillus subtilis* and Close Relatives / A.M.Earl, M.Eppinger, W.F.Fricke [et al.] // Journal of Bacteriology, - 2012, 2012 Volume 194 Number 9, - p. 2378 –2379.

производящей достаточно много различных противомикробных препаратов.

Кроме того, молекулярная масса субтилина, продуцируемого бактерией *B. subtilis* составляет 3321 Да<sup>12</sup>, а частично очищенное соединение AZ-130 имеет молекулярную массу 3319,6 Да, что по значению очень близко к субтилину. Поэтому, целью проведения экспериментов, представленных в данной главе, было сравнение бактерий AZ-130 и *B. subtilis* и продуцируемых ими антибактериальных биомолекул.

### 6.1. Кинетика роста штаммов AZ-130 и *B. subtilis*

Наблюдения показали, что штаммы AZ-130 и *B. subtilis* отличаются друг от друга по кинетике роста. Так, ОП штамма AZ-130 в трех из четырех исследуемых средах увеличивается до определенной величины, после чего начинает падать; в среде TSB + NaCl ОП увеличивается в течение всего наблюдаемого периода. Рост *B. subtilis* происходит по другой схеме; вначале ОП увеличивается, затем начинает падать, снова увеличивается и снова уменьшается, за исключением среды MB, в которой наблюдается линейное увеличение ОП до величины, равной 0,3 (Рис. 15). Рост в контрольных вариантах отсутствует.



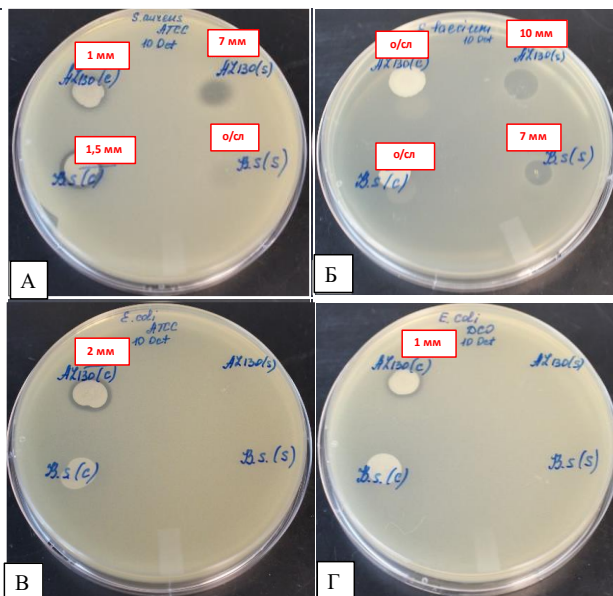
**Рисунок 15.** Кинетика роста штаммов AZ-130 и *B. subtilis* в четырех различных средах.

<sup>12</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Subtilin>.

С точки зрения роста штаммов среди исследуемых сред наилучшей является среда ТВ. Согласно измерениям ОП, бактерия AZ-130 лучше растет в среде ТВ, где она достигает наивысшего значения ОП = 1,53 в течение 48 ч инкубации. Этот показатель примерно в пять раз лучше по сравнению со средой МВ.

## 6.2. Сравнительный анализ активности культур AZ-130 и *B. subtilis*, а также их супернатантов против различных патогенов

Штамм AZ-130 проявлял активность равную 1 мм в культуре против *S. aureus* ATCC 29213 и очень слабую против *E. faecium*, в то время как активность *B. subtilis* в культуре против тех же самых штаммов составляла 1,5 мм и очень слабая, соответственно. Штамм AZ-130, в отличие от *B. subtilis*, в культуре обладал активностью против обоих исследуемых штаммов *E. coli* (2 мм против *E. coli* ATCC 25922 и 1 мм против *E. coli* DC0) (Рис. 16).

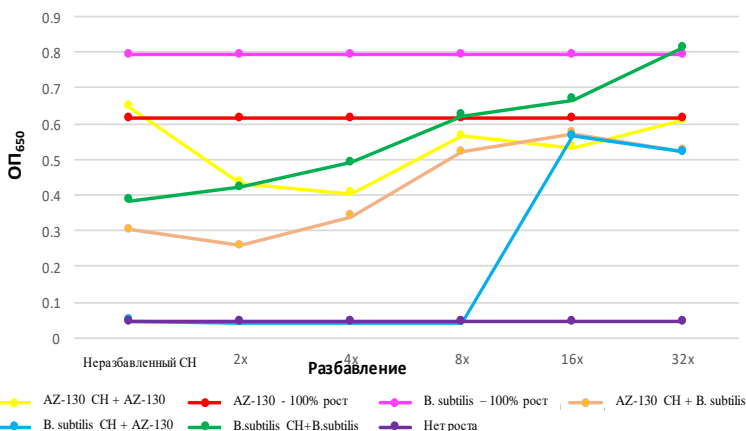


**Рисунок 16.** Антибактериальная активность культур AZ-130 и *B. subtilis* и их супернатантов против: А) *S. aureus* ATCC 29213; Б) *E. faecium*; В) *E. coli* ATCC 25922; Г) *E. coli* DC0  
Примечание: о/сл – очень слабая активность.

СН штамма AZ-130 обладал активностью, равной 7 мм и 10 мм против *S. aureus* ATCC 29213 и *E. faecium*, соответственно, в то время как СН бактерии *B. subtilis* проявлял очень слабую активность против *S. aureus* ATCC 29213 и активность в 7 мм против *E. faecium*. Учитывая, что инокуляция и рост обоих штаммов проходили в одинаковых условиях, можно утверждать, что активность штамма AZ-130 была значительно выше.

### 6.3. Перекрестный анализ активности супернатантов AZ-130 и *B. subtilis*

СН *B. subtilis* показал активность в 9 мм против штамма AZ-130, в то время как СН штамма AZ-130 не обладал никакой активностью против *B. subtilis*. Анализ СН методом микроразведения в бульоне подтвердил, что СН *B. subtilis*, причем даже при 8-кратном разбавлении, полностью ингибирует рост штамма AZ-130, однако в СН штамма AZ-130 нет никакой активности против *B. subtilis* (Рис. 17).



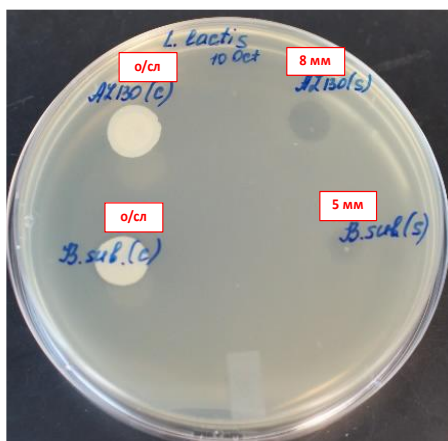
**Рисунок 17.** Перекрестный анализ на ингибирующую активность супернатантов штаммов AZ-130 и *B. subtilis* с использованием метода микроразведения в бульоне.

Учитывая, что продуценты обладают устойчивостью к антимикробным соединениям, которые они сами секретируют, подавление роста штамма AZ-130 СН *B. subtilis* указывает на

возможные различия в структуре и механизмах действия антибактериальных веществ, секретируемых штаммами AZ-130 и *B. subtilis*.

#### 6.4. Сравнительный анализ активности супернатантов AZ-130 и *B. subtilis* против *Lactococcus lactis*

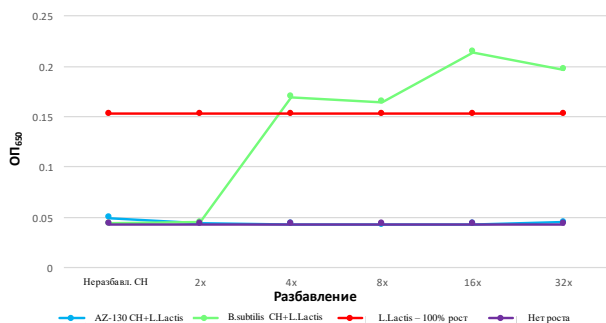
Известно, что субтилин ингибирует рост и развитие *L. lactis*<sup>13</sup>. Для определения сходства в механизме активности антимикробного соединения, продуцируемого штаммом AZ-130 с субтилином, СН штамма AZ-130 и *B. subtilis* были проанализированы на наличие активности против *L. lactis*. Штамм AZ-130 и *B. subtilis* показали очень слабую активность в культуре против *L. lactis*, в то время как активность СН этих же бактерий была достаточно высокой: 8 мм – штамм AZ-130 и 5 мм – *B. subtilis* (Рис. 18). Анализ собранных СН методом микроразведения в бульоне, осуществленный с целью сравнения количества ингибирующих единиц, показал, что активность СН штамма AZ-130 против *L. lactis* в 16 раз выше по сравнению с СН *B. subtilis* (Рис. 19).



**Рисунок 18.** Антибактериальная активность культур AZ-130 и *B. subtilis* и их супернатантов против *L. lactis*.

*Примечание:* o/сл – очень слабая активность.

<sup>13</sup> Qin, Y. Characterization of Subtilin L-Q11, a Novel Class I Bacteriocin Synthesized by *Bacillus subtilis* L-Q11 Isolated From Orchard Soil / Y.Qin, Y.Wang, Y.He [et al.] // Front. Microbiol., - 2019, 10, art. 484.

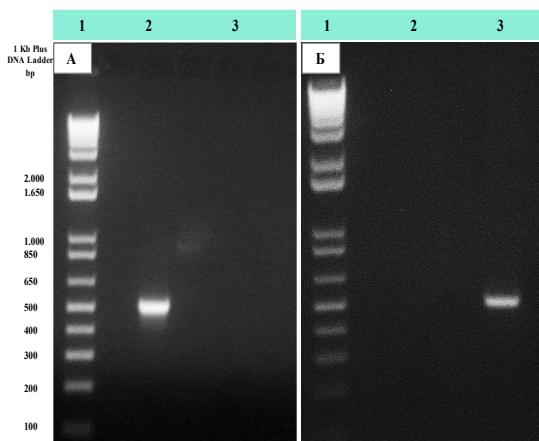


**Рисунок 19.**

Ингибирующая активность супернатантов штаммов AZ-130 и *B. subtilis* против *L. lactis* с использованием метода микроразведения в бульоне

## 6.5. ПЦР анализ гена субтилина *sraS*

ПЦР анализ с использованием специфических *sraS*-seqR и *sraS*-seqF праймеров, разработанных для выявления различий между антибактериальным соединением, продуцируемым штаммом AZ-130 и субтилином на молекулярном уровне, выявил наличие в ДНК *B. subtilis* фрагмента размером более 500 п.н., но не привел к амплификации AZ-130. Это указывает на то, что ген субтилина в AZ-130 штамме отсутствует, и этот штамм продуцирует соединение, отличное от субтилина (Рис. 20).



**Рисунок 20.**

Электрофоретическое разделение фрагментов ПЦР. Ожидаемый размер ампликона ~521 п.н. А) Лунка 1 - GeneRuller TM 1 kb Plus DNA Ladder, лунка 2 - ПЦР продукт *B. subtilis*, лунка 3 - ПЦР продукт AZ-130. Б) Лунка 1 - GeneRuller TM 1 kb Plus DNA Ladder, лунка 2 - ПЦР продукт AZ-130, лунка 3 - ПЦР продукт *B. subtilis*.

Сходство биомолекулы AZ-130 с субтилином в молекулярной массе (больше 3300 Да) и наличие активности против *L. lactis* указывает на возможность того, что это



антимикробное соединение относится к одному классу (подобен субтилину), но ПЦР анализ показал, что в AZ-130 ген субтилина отсутствует.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые из микробиоты нефтезагрязненных почв Азербайджана выделены обладающие антибактериальной активностью и принадлежащие к 12 видам 28 штаммов бактерий. На их основе была создана специфическая коллекция под названием «продуценты антибиотиков» [1, 2, 3, 5, 6].
2. Впервые выявлена антибактериальная активность бактерий, принадлежащих к виду *Bacillus vallismortis*. Показано, что штамм AZ-130 бактерии *B. vallismortis* обладает высокой активностью в супернатанте против грамположительных условно-патогенных бактерий и продуцирует одно соединение с антибактериальной активностью, время удерживания (Rt) которого в ВЭЖХ колонке составляет 12,648 мин [8, 10, 12].
3. Биомолекула AZ-130 стабильна при низких значениях pH и растворяется в органическом растворителе. Приблизительная молекулярная масса биоактивной молекулы AZ-130 равна 3319,6 Да. На данный момент нет известных антибактериальных соединений с такой молекулярной массой, продуцируемых бактерией *B. vallismortis* [11, 12].
4. Выявлено, что штамм AZ-130 бактерии *B. vallismortis* производит наибольшее количество антибактериальных соединений в условиях роста в среде ТВ + 2% глюкозы при 32°C в течение 2 дней. Наблюдаемая активность высокая и стабильная, поскольку биомолекула AZ-130 не теряет активности даже после 5 дней инкубации [4, 10].
5. Показано, что частично очищенное антибактериальное соединение AZ-130 при концентрации от 8 мкг/мл до 16 мкг/мл подавляет рост и развитие устойчивого к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* [14].
6. Установлено, что супернатант штамма AZ-130 обладает высокой активностью в отношении бактерии *Lactobacillus*

*lactis*. Сходство в молекулярной массе биомолекулы AZ-130 с субтилином, продуцируемым *Bacillus subtilis* (больше 3300 Да), и наличие активности против *L. lactis* указывает на возможность того, что это антимикробное соединение относится к тому же классу, что и субтилин, однако оно в 16 раз активнее субтилина [15].

7. Выявлено, что супернатант *Bacillus subtilis* полностью ингибирует рост штамма AZ-130, в то время как в супернатанте штамма AZ-130 не обнаружено активности против бактерии *B. subtilis*. Подавление роста штамма AZ-130 супернатантом *B. subtilis* указывает на возможные различия в структуре и механизмах действия антибактериальных веществ, секретируемых этими штаммами [10, 7].
8. ПЦР анализ с использованием специфических праймеров *sraS-seqR* и *sraS-seqF*, разработанных для амплификации гена субтилина *sraS*, подтвердил отсутствие данного гена в штамме AZ-130. Штамм AZ-130 продуцирует соединение, отличное от субтилина, что свидетельствует о том, что полученная биомолекула является новой для науки [13].

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Aghayeva, A.G. Microbial Mining for the Identification of Novel Biomolecules / A.G.Aghayeva, S.P.Krasucki, A.Flammersfeld [et al.] // New Technologies, New Vaccines (NTNV), - Wilmington, DE, USA: - March 20-23, - 2016, - p. 55.
2. Aghayeva, A.G., Yusibov, V.M., Huseynova, I.M. Microbial mining for the identification of novel antimicrobial compounds // 1st Republic Students Scientific Conference on "Advances in Chemistry and Chemical Engineering" dedicated to the 96th anniversary of the national leader of Azerbaijan, Heydar Aliyev, - Baku: - April 15-19, - 2019, - p. 101-102.
3. Aghayeva, A.G., Yusibov, V.M., Huseynova, I.M. Bacterial isolation and screening for the identification of novel antimicrobial compounds // 2nd International Conference on "One Health: Problems & Solutions", - Baku: - May 24-25, - 2019, - p. 97-98.
4. Aghayeva, A.G. Optimization of culture conditions for higher

- production of antimicrobial compounds by AZ-130 bacterial strain isolated from soil of Azerbaijan // Journal of Life Sciences and Biomedicine, ANAS, - 2019. 74(1), - p. 69-76.
5. Агаева, А.Г. Создание бактериальной коллекции на основе штаммов, изолированных из почв Азербайджана и их скрининг на наличие новых антибактериальных биомолекул // Journal of Life Sciences and Biomedicine, ANAS, - 2019. 74(2), - p. 13-19.
  6. Ağayeva, A.Q., Yusibov, V.M., Hüseynova, İ.M. Azərbaycan torpaqlarından ayrılmış bakteriya şamm kolleksiyasının yaradılması və onların yeni biomolekullar üçün skrininqi // Koronavirus pandemiyası: elmi tədqiqatlardan sağlam gələcəyin təminatına doğru” mövzusunda beynəlxalq onlayn konfrans, - Bakı: - 04-05 avqust, - 2020, - s. 76-77.
  7. Агаева, А.Г., Гусейнова, И.М., Стритфилд, С.Дж. Скрининг бактерий с антибактериальной активностью против *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* штаммов, несущих плазмиды обеспечивающие устойчивость к известным антибиотикам // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики: Серия «Естественные и Технические науки», - 2021. 2021(7), - p. 7-11.
  8. Aghayeva, A.G. Antibacterial properties of AZ-130 strain isolated from oil contaminated soil sample in Azerbaijan // First International Bilateral Workshop on Science Between Dokuz Eylul University and Azerbaijan National Academy of Sciences, - Zoom: - 19 November, - 2021, - p. 7.
  9. Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. Growth kinetics of AZ-130 strain isolated from oil-polluted soil sample of Azerbaijan for antimicrobial production // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, - 2021. 5, - p. 7-10.
  10. Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. AZ-130 Strain from Oil-contaminated Soil of Azerbaijan: Isolation, Antibacterial Screening, and Optimization of Cultivation Conditions // Microbiology, - 2021. 90(6), - p. 754–762. DOI: 10.1134/S0026261721060035.

Агаева, А.Г., Стритфилд, С.Дж., Гусейнова И.М. Штамм AZ-130 из нефтезагрязненной почвы Азербайджана: изоляция, антибактериальный скрининг и оптимизация условий культивирования // Микробиология, - 2021. 90(6), - с. 718–727. DOI: 10.31857/S0026365621060033.

11. Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. Study of the molecular mass of AZ-130 biomolecule and its stability at low pH // Journal of Life Sciences and Biomedicine, - 2022. 77(1), - p. 40-45.
12. Aghayeva, A.G., Yusibov, V.M., Huseynova, I.M. Organic extraction of biomolecule produced by the AZ-130 strain // AGRO International Conference on Agriculture, - online and face-to-face participation, - June 04-06, 2022, - p. 451.
13. Aghayeva, A.G. Study of the presence of the subtilin gene in the AZ-130 strain // Karabakh III. International Congress of Applied Sciences "Year of Shusha - 2022", - Karabagh/Azerbaijan online and face-to-face participation, - Baku: - June 7-10, - 2022, proceeding book volume 2, - p. 3.
14. Aghayeva, A.G., Streatfield, S.J., Huseynova, I.M. Influence of the AZ-130 biomolecule on the growth kinetics of the methicillin-resistant *S. aureus* strain // Transactions of the Institute of Molecular Biology & Biotechnologies, ANAS, - 2022. 6(1), - p. 12-15.
15. Ağayeva, A., Yusibov, V. AZ-130 birləşməsinin *Lactococcus lactis* bakteriyasına qarşı aktivliyinin tədqiqi // “Şuşa və ətraf ərazilərin biomüxtəlifliyi, torpaq və su ehtiyatları: gələcəyə baxış” mövzusunda beynəlxalq konfrans (hibrid formatda), - Bakı: - 22-23 sentyabr, - 2022, - s. 97.

Защита диссертации состоится 2 ноября 2022-го года в 11:30 на заседании Диссертационного совета BFD 1.25, действующего на базе Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики.

Адрес: AZ1073, г. Баку, Ул. Иззята Набиева, 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики.

Электронная версия диссертации и автореферата размещена на официальном сайте Института молекулярной биологии и биотехнологий Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики (<https://www.imbb.az/>).

Автореферат разослан по соответствующим адресам 1 октября 2022-го года.

Подписано в печать: 29.09.2022

Формат бумаги: А5

Объём: 37998

Тираж: 70