

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

AZƏRBAYCANIN NEFTLƏ ÇİRKƏNMIŞ TORPAQLARINDAN AYRILMIŞ BAKTERİYALARIN ANTİBİOTİK AKTİVLİYƏ GÖRƏ TƏDQIQI

İxtisas: 2415.01 – Molekulyar biologiya
2422.01 – Biotexnologiya (o cümlədən
bionanotexnologiyalar)

Elm sahəsi: Biologiya

İddiaçı: **Aytən Qabil qızı Ağayeva**

Fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim edilmiş dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2022

Dissertasiya işi ABŞ Fraunhofer Molekulyar Biotexnologiya Mərkəzində və Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun Molekulyar biotexnologiya beynəlxalq laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbərlər: biologiya elmləri doktoru, professor,
AMEA-nın həqiqi üzvü
İradə Məmməd qızı Hüseynova


biologiya üzrə fəlsəfə doktoru, professor
Vidadi Məmmədağa oğlu Yusibov

Rəsmi
opponentlər: biologiya elmləri doktoru, professor,
Tacikistan MEA-nın müxbir üzvü
Kurbon Əliyeviç Əliyev

biologiya elmləri doktoru, dosent
Viktoriya Anatolievna Tsygankova

tibb elmləri doktoru, professor
Adil Məhəmmədli oğlu Allahverdiyev

Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 1.25 Dissertasiya şurası.

Dissertasiya şurasının sədri: biologiya elmləri doktoru,
AMEA-nın müxbir üzvü

İlham Əyyub oğlu Şahmuradov

Dissertasiya şurasının elmi
katibi: biologiya üzrə fəlsəfə doktoru,
dosent

Ulduz Əhməd qızı Qurbanova

Elmi seminarın sədri: biologiya elmləri doktoru, professor,
AMEA-nın müxbir üzvü

İbrahim Vahab oğlu Əzizov



İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

Mövzunun aktuallığı. 1928-ci ildə penisilinlə kəşf edildiyi tarixdən bu günə qədər antibiotiklər yoluxucu xəstəliklərlə mübarizədə əsas vasitə olmuşlar. Lakin son illərdə antibiotiklərə davamlı bakteriyaların (metisillinə davamlı *Staphylococcus aureus* (MRSA), karbapenəmlərə davamlı *Acinetobacter baumannii* (CRAB), bir çox dərman preparatlarına davamlı *Pseudomonas aeruginosa* (MDR) və s.) sayı artmaqdadır və təəssüf ki, satışda mövcud olan bir çox antibiotiklər tədricən öz effektivliyini itirir. New Delhi metallo-beta-laktamase-1 (NDM-1) geni ilə plazmid daşıyan Qram-mənfi patogenlərə qarşı mübarizədə antibiotik terapiyası üçün praktiki olaraq seçim yoxdur yaxud çox azdır, belə ki, NDM-1 geni üfqi gen transferi yolu ilə bakteriyalar arasında sürətlə ötürülmə qabiliyyətinə malikdir və demək olar ki, satışda və hazırlanma mərhələsində olan bütün beta-laktam antibiotiklərinə qarşı davamlılıq yaradır¹.

Antibiotiklərə davamlı ştamların sayı sürətlə artsa da, əcazılıqda çox az sayda yeni antimikrob maddələr yaradılır. Bu məsələ global sağlamlıq üçün ciddi təhlükəyə çevrilir². Buna görə də bakteriya infeksiyalarına qarşı yeni təhlükəsiz və effektiv antimikrob birləşmələrin axtarışına və hazırlanmasına kəskin ehtiyac yaranır. Son zamanlar ənənəvi antibiotiklərə alternativ sayılan antimikrob peptidlərə maraq artmaqdadır³.

Əksər antimikrob maddələr bir çox hallarda prokariot orqanizmlər tərəfindən sintez olunan təbii məhsullardan əldə edilir⁴. Satışda mövcud olan antibiotiklərin 70%-i, əsasən, *Streptomyces* və *Bacillus*

¹ 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.

² 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.

³ 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.

⁴ 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.

cinsinə aid olan torpaq bakteriyaları tərəfindən sintez olunur. Digər tərəfdən, güman edilir ki, bu günə qədər mikroorqanizm növlərinin təxminən 98%-i müəyyən edilməmiş və laboratoriya şəraitində becərilməmişdir⁵. Bu isə o deməkdir ki, dərman, bioyanacaq və s. kimi insanlar üçün faydalı olan bütün məlum mikrob biomolekulları bu günə qədər identifikasiya edilmiş mikrob növlərinin yalnız yüzdə 2-si tərəfindən sintez edilmişdir. İstifadə olunan antibiotiklərin əksəriyyəti canlı orqanizmlərdən ayrıldıqlarından yaxud strukturları təbii məhsullardan əldə edilən dəyişdirilmiş birləşmələr olduğundan, antibiotik istehsal edən yeni bakteriya ştamlarının müəyyən edilməsi çox vacibdir⁶.

Yeni ştam-produsentlərin aşkarlanması prosesində ən vacib elementlərdən biri bakteriyaların izolyasiya olunduğu nümunədir. Yeni antimikrob birləşmələrin aşkar edilməsinin mümkünsüzlüyünün ehtimal olunan səbəbi tədqiqata cəlb edilən torpaq nümunələrində məskunlaşan mikroorqanizmlərin əksəriyyətinin, demək olar ki, tamamilə öyrənilməsi və identifikasiya edilməsi ola bilər. Belə hesab edilir ki, yeni biomolekullar əvvəllər analiz olunmamış qeyri-ənənəvi mənbələrdən aşkar edilə bilər. Müxtəlif növ bakteriyalar yüz milyon illər ərzində əlverişli olmayan şəraitə uyğunlaşaraq sağ qalmış, nəticədə bu şəraitə uyğun mikrobiota yaranmışdır. Ehtimal olunur ki, belə torpaqlarda yaşayan bakteriyalar da onlarla rəqabətdə olan mikroblardan qorunmaq üçün xüsusi məhsullar və mexanizmlər formalaşdırmışlar.

Yeni antimikrob maddələrin yaradılmasının mühüm əhəmiyyətini nəzərə alaraq, bu işin diqqət mərkəzində yeni, əvvəllər becərilməmiş bakteriya ştamlarının daxil olduğu mikroorqanizmlər kolleksiyasının yaradılması olmuşdur. Bu məqsədlə Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarının mikrobiotasından antimikrob preparatları sintez etmək qabiliyyətinin müəyyən olunması istiqamətində bugünədəl analiz olunmamış bakteriyalar ayrılmışdır. Azərbaycanın neftlə çirklənmiş

⁵ 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.

⁶ 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.

torpaqlarından ayrılmış bakteriya ştamlarının antimikrob fəallığına dair ədəbiyyat məlumatlarının olmaması qiymətli əzcaçılıq və sənaye xüsusiyyətlərinə malik yeni bakteriya ştamlarının aşkarlanması və tədqiqi imkanlarını xeyli artırır⁷.

Tədqiqatın obyektı. Tədqiqat obyektləri 2014 və 2016-cı illərdə Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən toplanmış 30 neftlə çirklənmiş torpaq nümunəsindən ayrılmış bakteriya ştamları olmuşdur.

Tədqiqatın məqsədi və vəzifələri. Tədqiqat işinin əsas məqsədi Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarından yeni antibakterial birləşmələri sintez edən bakteriya ştamlarının aşkar edilməsi və identifikasiyası, həmçinin bu biomolekulların bəzi xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi olmuşdur. Bu məqsədə çatmaq üçün qarşıya aşağıdakı vəzifələr qoyulmuşdur:

- Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarından bakteriyaları ayırmaq və onları antibakterial fəallığa görə analiz etmək;
- 16S rRNA geninin sekvensi əsasında fəal ştamları identifikasiya etmək və gələcək xarakterizə üçün ştamlar seçmək;
- Antimikrob fəallığa malik olan supernatantın fəal komponentlərinin miqdarını müəyyən etmək;
- Seçilmiş biomolekulların bəzi xüsusiyyətlərini (molekul kütləsi, aşağı pH qiymətlərində stabillik, üzvi həlledicilərdə həll olma qabiliyyəti və s.) müəyyən etmək;
- Seçilmiş ştamların böyümə şəraitini optimallaşdırmaq;
- Qismən təmizlənmiş biomolekulların iştirakı ilə metisillinə davamlı *S.aureus* ştamlarının böyümə kinetikasını müəyyənləşdirmək və müqayisə etmək;
- Seçilmiş molekulların dereplikasiyası üçün seçilmiş izolyatların və yaxın əlaqəli növlərin supernatantlarının fəallığını indikator ştamlara qarşı müqayisə etmək;
- Seçilmiş molekulların dereplikasiyası üçün seçilmiş izolyatların və yaxın əlaqəli növlərin supernatantlarının qarşılıqlı fəallığını qiymətləndirmək;

⁷ 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.

- Spesifik praymerlərdən istifadə etməklə seçilmiş izolyatda antibakterial aktivliyə cavabdeh olan genin və məlum birləşmələrin genlərinin nukleotid ardıcılığının PZR üsulu ilə müqayisəli təhlilini aparmaq.

Tədqiqat üsulları. Qarşıya qoyulan vəzifələrin həlli üçün mikrobioloji, biokimyəvi, molekulyar və biotexnologiya metodlarının kompleksi, o cümlədən spektrofotometriya, flüoresensiya, xromatoqrafiya və elektroforez üsullardan istifadə edilmişdir.

Müdafiəyə çıxarılan əsas müddəalar:

- Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarının mikrobiotası qiymətli farmakoloji və sənaye əhəmiyyətli yeni biomolekulların əldə edilməsi üçün zəngin mənbə kimi istifadə oluna bilər;
- Biomolekulların üzvi həlledicilərlə ekstraksiyası, növbəti Yüksək Effektivli Maye Xromatoqrafiyası (YEMX) və Matrislə fəallaşan lazer desorbsiya/ionlaşdırılma (MALDI) metodların istifadəsi antibiotiklərin dereplikasiyası üçün tətbiq edilə bilər;
- *Bacillus* cinsinin az öyrənilmiş nümayəndələri antimikrob fəallığa malik yeni birləşmələr üçün yaxşı prodüsent ola bilərlər.

İşin elmi yeniliyi. İlk dəfə olaraq, Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarından ayrılmış ştamlar əsasında bakteriya kolleksiyası yaradılmış və antimikrob fəallıqları analiz edilmişdir. Ayrılmış bakteriya kulturalarından supernatantda yüksək və stabil fəallığa malik olan AZ-130 ştamı 16S rRNT geninin sekvensi əsasında *Bacillus vallismortis* kimi identifikasiya edilmişdir. AZ-130 ştamının supernatantının YEMX analizi təsdiq etmişdir ki, bu ştam antibakterial fəallığa malik və YEMX sütununda saxlama müddəti (Rt) 12,854 dəqiqə təşkil edən bir birləşmə sintez edir. AZ-130 bioaktiv birləşmə 8 µq/mL-dən 16 µq/mL-ə qədər qatılıqlarda metisillinə davamlı *S. aureus* ştamının böyüməsini və inkişafını inhibə edir. AZ-130 ştamının sintez etdiyi birləşmə *B. subtilis* tərəfindən sintez edilən maddələrdən fəallığına, quruluşuna və təsir mexanizminə görə fərqlənir. APD3 Verilənlər Bazasında aparılan axtarışlar göstərmişdir ki, hazırda *B. vallismortis* bakteriyası tərəfindən sintez olunan molekul kütləsi 3319,6 Dalton olan məlum antimikrob birləşmə yoxdur, bu da dissertasiyada əldə edilən preparatın ümumilikdə elm üçün yeni

olduğunu təsdiqləyir.

İşin elmi və praktiki əhəmiyyəti. Təqdim olunan işdə əldə edilmiş elmi tədqiqatların nəticələri gələcəkdə yeni antimikrob birləşmələrin uğurlu kəşfi və onların dereplikasiyası üçün istifadə oluna bilər. Tədqiqat zamanı əldə edilən nəticələr ilk dəfə göstərmişdir ki, antimikrob aktivliyə malik ştamların mövcudluğu üçün qeyri-ənənəvi və az analiz edilmiş torpaqlar, məsələn, neftlə çirklənmiş torpaqlar, antimikrob birləşmələr sintez edən bakteriyaların yaxşı mənbəyi kimi istifadə edilə bilər. Ədəbiyyatda *B.vallismortis* bakteriyasının molekulyar kütləsi 3319,6 Dalton olan hər hansı antibakterial birləşmələr sintez etməsi barədə məlumatın olmaması, həmçinin AZ-130 biomolekulunun Qram-müsbət bakteriyalara, xüsusilə *S.aureus*-a qarşı yüksək fəallığı AZ-130 biomolekulunu yeni antimikrob maddəsinə namizəd olmağa böyük ümid verir.

İşin aprobasiyası. Dissertasiya işinin əsas elmi nəticələri beynəlxalq və respublika konfranslarında, o cümlədən: “New Technologies, New Vaccines (NTNV)” beynəlxalq elmi konfransında (ABŞ, Wilmington, 2016), “One Health: Problems & Solutions” 2-ci beynəlxalq elmi konfransında (Bakı, 2019), Azərbaycanın Ümummilli lideri Heydər Əliyevin anadan olmasının 96-cı ildönümünə həsr olunmuş “Kimya və kimya texnologiyasının nailiyyətləri” mövzusunda 1-ci tələbə elmi konfransında (Bakı, 2019), “Koronavirus pandemiyası: elmi tədqiqatdan sağlam gələcəyin təminatına doğru” mövzusunda beynəlxalq onlayn konfransda (Bakı, 2020), Dokuz Eylül Universiteti və Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası arasında elm üzrə birinci beynəlxalq ikitərəfli onlayn seminarda (2021), Kənd Təsərrüfatı üzrə AGRO beynəlxalq konfransında (Gəncə, 2022), 3-cü Qarabağ beynəlxalq tətbiqi elmlər konqresində “Şuşa ili-2022” (Bakı, 2022), “Şuşa və ətraf ərazilərin biomüxtəlifliyi, torpaq və su ehtiyatları: gələcəyə baxış” mövzusunda beynəlxalq konfransda (Şuşa və Bakı, 2022) təqdim və məruzə edilmişdir.

Nəşrlər. Dissertasiya işinin materialları əsasında 15 elmi əsər dərc edilmişdir ki, onlardan 7-si respublika və beynəlxalq jurnallarda dərc edilmiş məqalə, 8-i isə tezisdır.

Dissertasiya işinin aparıldığı müəssisənin adı. Dissertasiya işi ABŞ Fraunhofer Molekulyar Biotexnologiya Mərkəzində və

Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun Molekulyar biotexnologiya beynəlxalq laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Dissertasiyanın struktur bölmələrinin ayrılıqda həcmi qeyd olunmaqla ümumi həcmi. Dissertasiya işi 194 səhifəlik kompüterdə yazılmış mətnə (240459 işarə) təqdim olunmaqla, 17 cədvəl, 47 şəkil, 1 qrafik, 1 diaqram və əlavədən ibarətdir. Dissertasiya giriş, altı fəsil, yekun, nəticə, ixtisarların siyahısı və 272 adda ədəbiyyat siyahısından ibarətdir ki, bunların 80%-i son 15 ilin, 62%-i isə son 10 ilin nəşrləridir. Dissertasiya işinin strukturunda cədvəllər, şəkillər, qrafiklər, diaqramlar, əlavələr (25 səhifə, 32104 işarə), istinadlar (30 səhifə, 47229 işarə) və ixtisarların siyahısı (2 səhifə, 1878 işarə) istisna olmaqla işarələrin sayı 170008-dir: giriş - 6 səhifə (9869 işarə), I fəsil - 36 səhifə (59094 işarə), II fəsil - 28 səhifə (42073 işarə), III fəsil - 12 səhifə (17467 işarə), IV fəsil - 5 səhifə (6527 işarə), V fəsil - 3 səhifə (3916 işarə), VI fəsil - 8 səhifə (14034 işarə), yekun - 6 səhifə (10275 işarə), nəticələr - 2 səhifə (2289 işarə).

İŞİN ƏSAS MƏZMUNU

I FƏSİL. ƏDƏBİYYAT İCMALI

Bu fəsildə təbii məhsullar, onların yeni bioaktiv birləşmələrin mənbəyi kimi istifadəsi, təbii məhsullar əsasında dərman preparatların hazırlanması, antibiotiklər və onların təsnifatı, bakterial patogenlər, ikincil metabolitlərin produsenti kimi *Bacillus* cinsi və antimikrob peptidlər (AMP) haqqında məlumat verilmişdir. Antibiotiklərin və AMP-lərin təsir mexanizmləri də təsvir edilmişdir.

II FƏSİL. TƏDQIQATIN OBYEKTİ VƏ METODLARI

Tədqiqat obyektləri 2014 və 2016-cı illərdə Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən toplanmış 30 neftlə çirklənmiş torpaq nümunələrindən ayrılıqda 578 bakteriya ştamı olmuşdur.

Bakteriyaların izolyasiyası Standart ardıcıl durulaşdırma üsulu ilə

aparılmışdır⁸. Kolleksiyanın bütün şamları üç variantda -80°C-də 15%-li qliserində saxlanılmışdır.

Bakterial kulturaların və supernatantların (SN) dörd şərti indikator ştamına (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* DC0 və *E. coli* DC2), eləcə də altı *B. subtilis* ştamına (beşi məlum antibiotiklərə davamlı və bir nəzarət ştamı) və dörd *E. coli* ştamına (üçü məlum antibiotiklərə davamlı və bir nəzarət ştamı) qarşı skrininqi böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə həyata keçirilmişdir⁷.

Maraq doğuran izolyatlar Charles River Laboratoriyasında 16S rRNA gen ardıcılığının müəyyən edilməsi əsasında identifikasiya edilmişdir.

Fərqli inkubasiya vaxtlarında (14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 və 34 saat) toplanmış SN-ın böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə analizi vasitəsilə izolyatın bioaktiv birləşməni supernatanta ifraz etməyə başladığı böyümə əyrisində vaxt nöqtəsi müəyyən edilmişdir. Optik sıxlıq (OS) də müvafiq vaxt nöqtələrində ölçülmüşdür.

Aşağı pH vahidlərində biomolekulların sabitliyi SN-lara trifluoroasetik turşunun (TFA) (TFA-nın son qatılığı - 0,1%) əlavə olunması ilə müəyyən edilmişdir. Əldə olunmuş material sentrifugalandırdıqdan sonra 0,22 µm PES membranı vasitəsilə filtrasiya edilmiş və böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə fəallığa görə analiz edilmişdir. Nəzarət – TB mühiti.

Antibakterial fəallığa malik izolyatların SN-ları tərkibində 0,1% TFA olan 40% asetonitril (ACN) ilə ekstraksiya edilmişdir. TSB nəzarət olaraq ekstraksiya edilmişdir. SN-ların üzvi həll olan fazası yeni sınaq şüşəsinə keçirilmiş və FreeZone 4.5 Liter - 105°C Benchtop Freeze Dryer istifadə edərək liofilizasiya edilmişdir. Çöküntü 90 µl steril tək natrium fosfat buferində (PBS) həll edilmiş və antibakterial fəallığa görə analiz edilmişdir. Liofilizasiya edilmiş üzvi həll olan faza, tərkibində 0,1% TFA (w/v) olan 150 µl 95% H₂O/5% ACN məhlulunda resuspenziya edildikdən sonra sentrifuqa edilmiş, SN toplanaraq təmizlənmiş və müvafiq protokola uyğun olaraq⁷ YEMX vasitəsilə analiz edilmişdir. Bütün fəal YEMX fraksiyaları birləşdirilmiş, liofilizasiya və

⁸ 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.

resuspenziya edildikdən sonra yenidən YEMX vasitəsilə analiz edilmişdir. Toplanmış fraksiyalar və sütuna yüklənmiş material böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə təhlil edilmişdir. YEMX fəal fraksiyaları liofilizasiya edilmiş, distillə H₂O-da resuspenziya edilmiş və Delaver Universitetinin Kimya Fakültəsinə MALDI analizinə göndərilmişdir.

Produsentlərin böyümə şəraitinin optimallaşdırılması üçün dörd fərqli temperaturda (18°C, 25°C, 32°C və 37°C) dörd müxtəlif mühit növü (TSB, TB, TSB + 2% qlükoza və TB + 2% qlükoza) sınaqdan keçirilmişdir. SN-lar 1-ci, 2-ci və 3/5-ci günlərdə toplanaraq təmizlənmiş və böyümənin inhibə edilməsi və mikrodurulaşdırma metodları ilə təhlil edilmişdir⁷.

Produsentlərin SN-kı antibakterial komponentlərin miqdarı SN-ın YEMX analizi vasitəsilə aşkar edilmişdir. Nəzarət – TB mühiti⁷.

Bioaktiv birləşmənin təqribi molekul kütləsi 3K MWCO Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices filtr konsentratorlarından istifadə etməklə SN-ın 10 qat qatılaşdırılması yolu ilə müəyyən edilmişdir⁹.

Metisillinə davamlı *S. aureus* ChH-11 ştamının böyümə kinetikasi qismən təmizlənmiş AZ-130 biomolekulunun və metisillinin 16 µg/ml-dən 1 µg/ml-ə qədər olan qatılıq diapazonunda müəyyən edilmişdir. Təcrübə Molecular Devices Spectra MaxPlus aparatından istifadə etməklə 96-yuvalı planşetdə üç təkrarda aparılmışdır¹⁰.

AZ-130 və *B. subtilis* bakteriyalarının müqayisəli analizi üçün bu ştamların böyümə kinetikasi əvvəlcə dörd müxtəlif qida mühitində (TSB, TB, TSB+NaCl, MB) 96-yuvalı planşetdə Molecular Devices Spectra MaxPlus aparatından istifadə etməklə müəyyən edilmişdir. Təcrübə üç dəfə təkrarlanmışdır. AZ-130 və *B. subtilis* kulturaları və onların SN-ları böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə *S.aureus* ATCC 29213, *E. faecium* və *E.coli* (ATCC 25922, DC0) qarşı fəallığa görə analiz edilmişdir. AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının SN-ları AZ-130 və *B.*

⁹ 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

¹⁰ 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

subtilis ştamlarının özlərinə, həmçinin *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 qarşı mikrodurulaşdırma və böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə analiz edilmişdir.

Bakteriya DNT-si Qiagen DNeasy Plant Mini Kitdən (kat. № 69104) istifadə edərək ayrılmışdır. AZ-130 və *B. subtilis*-in subtilin geninin (*spaS*) selektiv amplifikasiyası iki genom spesifik *spaS*-*seqR* və *spaS*-*seqF* praymerlərindən istifadə edərək 50 µL reaksiya qarışığında aparılmışdır. *B. subtilis*-in genomu (Genbank: U09819.1) praymerlərin dizayn edilməsi üçün şablon kimi istifadə edilmişdir. DNT məhsullarının ayrılması üfüqi elektroforezdən istifadə etməklə 1,5% aqaroza gəlində aparılmışdır. Amplifikasiya olunmuş fraqmentlərin ölçüləri GeneRuler TM 1 kb Plus DNA Ladder markeri ilə müqayisə edilərək müəyyən edilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

III FƏSİL. BAKTERİYA KOLLEKSİYASININ YARADILMASI, ONUN ANTİBAKTERIAL SKRİNİNQİ VƏ PERSPEKTİVLİ ŞTAMLARIN SEÇİLMƏSİ

3.1. Bakteriya kolleksiyasının yaradılması və onun antibakterial fəallığa görə skrininqi

Bakteriya kolleksiyasının yaradılması

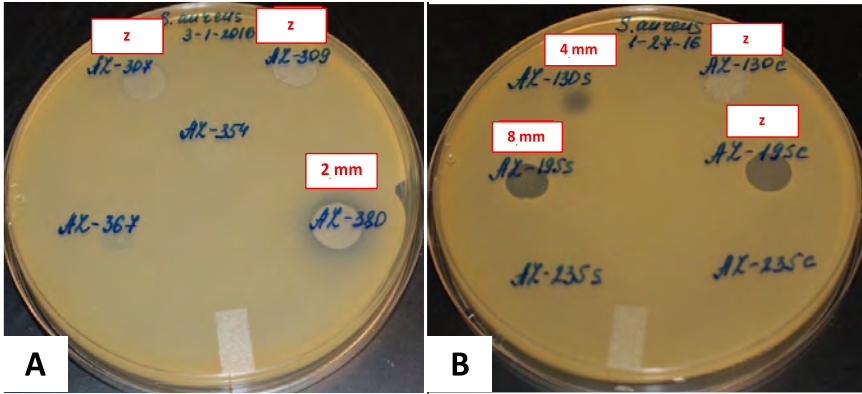
30 neftlə çirklənmiş torpaq nümunəsindən morfoloji xüsusiyyətlərinə görə fərqlənən 578 aerob bakteriya kulturası ayrılmışdır. Qliserin ehtiyatında saxlanılan 2 ştam (AZ-69 və AZ-237) böyüməmişdir.

Kultura və supernatantların antibakterial skrininqi

Tədqiq edilmiş 576 bakteriyadan 62-i ən azı bir indikator orqanizmə qarşı antibakterial fəallıq göstərmiş və “maraq doğuran izolyatlar” kimi müəyyən edilmişdir (Şəkil 1A). 14 ştam supernatantda qram-müsbət şərti indikator ştamlarına qarşı fəallıq nümayiş etdirmişdir (Şəkil 1B). Onlar "ən perspektivli izolyatlar" kimi müəyyən edilmiş və yeni biomolekulların potensial produsentləri kimi nəzərə alınmışdır.

İzolyatların müəyyən antibiotiklərə davamlı olan *B. subtilis* və *E. coli* ştamlarına qarşı skriningi

"Ən perspektivli izolyatlar" siyahısından məlum antibiotiklər sintez edən ştamları çıxarmaq üçün seçilmiş bakteriyaların SN-ları müəyyən antibiotiklərə davamlılığı təmin edən plazmidləri daşıyan *B. subtilis* və *E. coli* ştamlarına qarşı skrining edilmişdir.



Şəkil 1. *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı antibakterial skrining. A - kulturalar; B -supernatantlar.

Qeyd: z - zəif fəallıq.

AZ-279, AZ-302, AZ-380, AZ-402, AZ-411, AZ-437, AZ-463, AZ-469 və AZ-477 ştamlarının SN-ları *B. subtilis*-in nəzarət və bütün antibiotiklərə davamlı ştamlarına qarşı fəal olmuşdur. Bu ştamlar tərəfindən sintez edilən antimikrob maddələr qram-müsbət indikator ştamlarına qarşı yüksək fəallığa malikdir və çox güman ki, sınaqdan keçirilmiş məlum antibiotiklərdən fərqli fəaliyyət mexanizminə malikdir. Qram-mənfi ştamlara qarşı heç bir aktivlik aşkarlanmamışdır. 14 ştamin hamısı yeni antimikrob birləşmələrin mənbələrin alınması üçün namizəd ola bilər.

3.2. Ştamların 16S rDNT identifikasiyası

Kultura və SN-da yüksək fəallığa malik olan izolyatlar 16S rRNT geninin ardıcılığının müəyyən edilməsi üçün Charles River laboratoriyasına göndərilmişdir. 12 növə aid 28 bakteriya ştamı identifikasiya edilmiş və onların əsasında antimikrob birləşmələrin

produsentləri kolleksiyası yaradılmışdır.

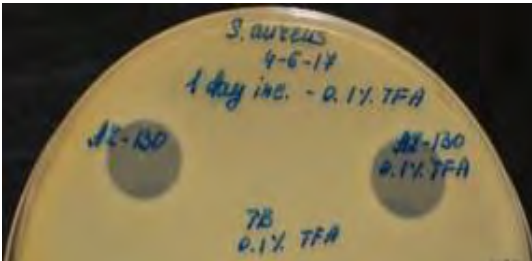
Seçilmiş izolyatların 16S rDNT identifikasiyasından sonra, ayrılmış ştamların hansı məlum antimikrob molekulaları sintez etdiyini öyrənmək üçün ədəbiyyatda və APD3 Verilənlər Bazasında axtarış aparılmışdır. Nəticələrə əsasən AZ-130 (*B. vallismortis*), AZ-195 (*B. salsus*, 0,09%) və AZ-279 (*B. mojavensis* / *B. subtilis*) ştamları xüsusiyyətlərinin daha dərin öyrənilməsi üçün seçilmişdir.

3.3. Produsentin bioloji fəal birləşməni supernatanta ifraz etməyə başladığı minimum inkubasiya müddəti

Hər üç ştamın OS-i zamanla artmışdır. Yalnız AZ-130 ştamı 20 saatdan başlayaraq və bütün müşahidə olunan dövr ərzində SN-da yüksək və davamlı fəallıq göstərmişdir ki, bu da sonrakı təcrübələr üçün çox vacibdir, belə ki, bu ştamın böyüməsini və biomolekulun yüksək miqdarda sekresiyasını təmin etmək digər iki ştamla müqayisədə daha asandır.

3.4. Aşağı pH-da supernatantların sabitliyi

AZ-130 ştamının SN-ının aşağı pH qiymətlərində sabitlik dərəcəsinin analizi göstərmişdir ki, TFA əlavə edilməzdən əvvəl və sonra AZ-130 biomolekulunun *S. aureus*-a qarşı fəallığı hər iki halda 12 mm təşkil edərək dəyişmişdir (Şəkil 2). AZ-195 ştamının SN (fəallıq-9 mm/natamam) və AZ-279 ştamının SN (10 mm) TFA əlavə edildikdən sonra fəallıqda dəyişiklik müşahidə olunmamışdır. Nəzarət variantlarında (TB və TB+0,1% TFA) heç bir fəallıq müşahidə edilməmişdir. Seçilmiş ştamlar tərəfindən sintez olunan biofəal molekullar pH-ın aşağı qiymətlərində stabildirlər.

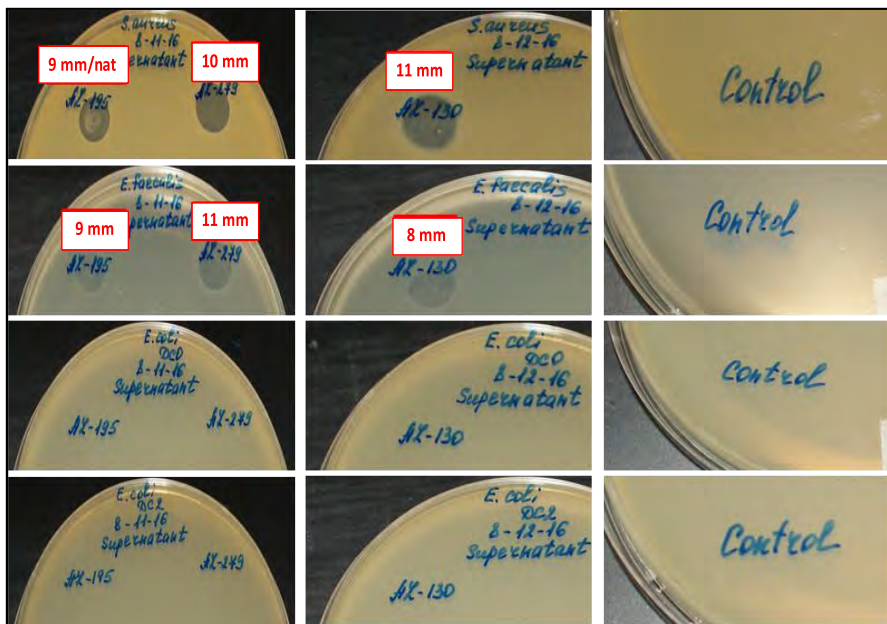


Şəkil 2. Aşağı pH dəyərində AZ-130 ştamının supernatantının sabitliyi.

3.5. Biomolekulların üzvi həlledici ilə ekstraksiyası, növbəti YEMX və MALDI analizləri

Tərkibində 0,1% trifloroasetik turşusu olan 40% asetonitril ilə biomolekulların ekstraksiyası

İlkin olaraq, AZ-130, AZ-195 və AZ-279 ştamlarının SN-ları indikator ştamlarına qarşı antibakterial fəallığa görə analiz edilmişdir. AZ-130 ştamının SN-ı *S. aureus*-a qarşı 11 mm və *E. faecalis*-ə qarşı 8 mm, AZ-195 ştamının SN-ı - *S. aureus*-a qarşı 9 mm/natamam və *E. faecalis*-ə qarşı 9 mm, AZ-279 ştamının SN-ı isə *S. aureus*-a qarşı 10 mm və *E. faecalis*-ə qarşı 11 mm fəallıq göstərmişdir. Nəzarət variantı heç bir fəallığa malik olmamışdır. *E. coli*-yə qarşı heç bir fəallıq müşahidə edilməmişdir (Şəkil 3).

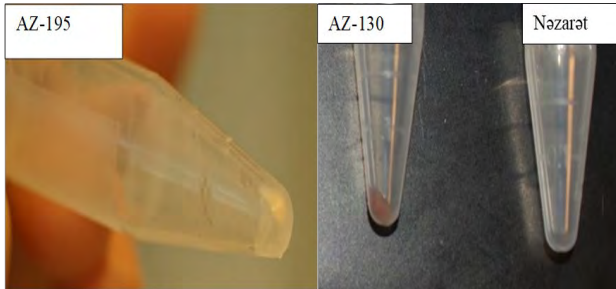


Şəkil 3. *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis*, *E. coli* (DC0 və DC2)-yə qarşı nəzarət variantının və AZ-130, AZ-195, AZ-279 ştamlarının supernatantlarının antimikrob fəallığı.

Qeyd: nat - natamam inhibə.

AZ-130, AZ-195 və AZ-279 ştamlarının SN-ları 40% ACN/0,1% TFA ilə ekstraksiya edilmişdir. Ştamların hər biri üçün 5x900 µl SN ekstraksiya edilmişdir. TSB nəzarət olaraq ekstraksiya edilmişdir.

Üzvi həlledicinin əlavə edilməsi bəzi komponentlərin çökməsinə səbəb olmuşdur (Şəkil 4). Nəzarətdə çöküntünün olmaması onu göstərmişdir ki, məhz inkubasiya zamanı produsent tərəfindən ifraz olunan komponentlər çöküblər.

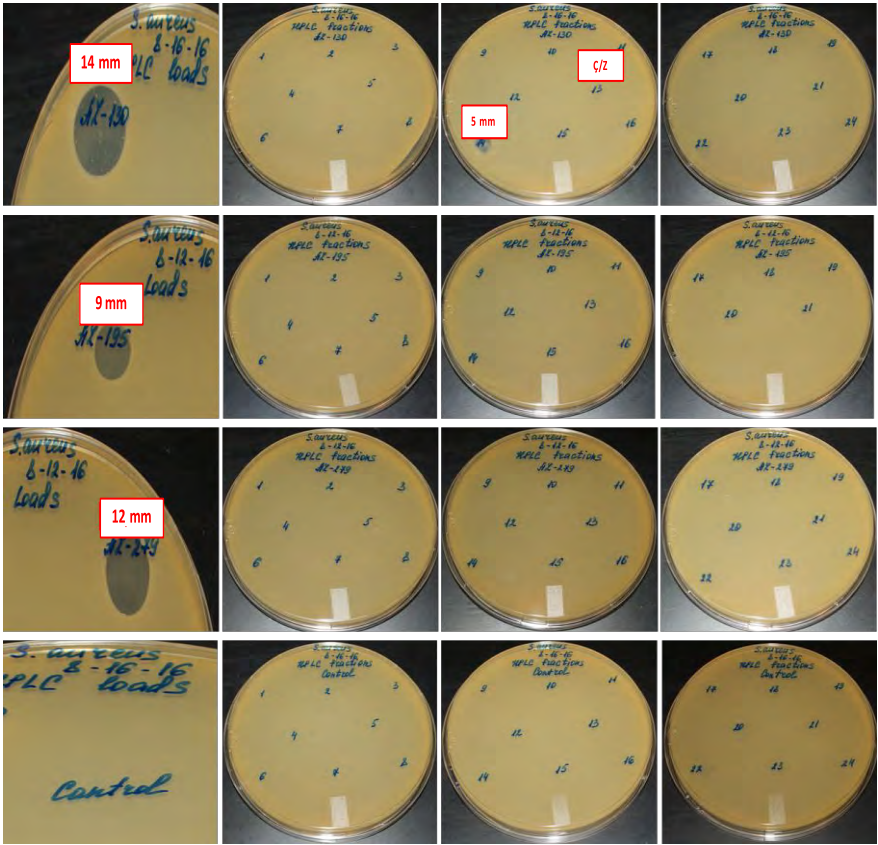


Şəkil 4. Nəzarət və AZ-130, AZ-195 ştamlarının SN-larına 40% ACN/0,1% TFA əlavə edildikdən sonra əldə edilən çöküntü.

Çöküntülər 90 µl 1xPBS-də həll edildikdən sonra antibakterial fəallığa görə analiz edilmişdir. Çöküntüdə heç bir fəallıq müşahidə edilməmişdir, yəni bizi maraqlandıran molekullar üzvi həll olan fazada qalmışdır. Buna görə də üzvi həlledicilər vasitəsilə fəal biomolekulu produsentin inkubasiya zamanı ifraz etdiyi SN-ın bəzi komponentlərindən qismən təmizləmək mümkündür.

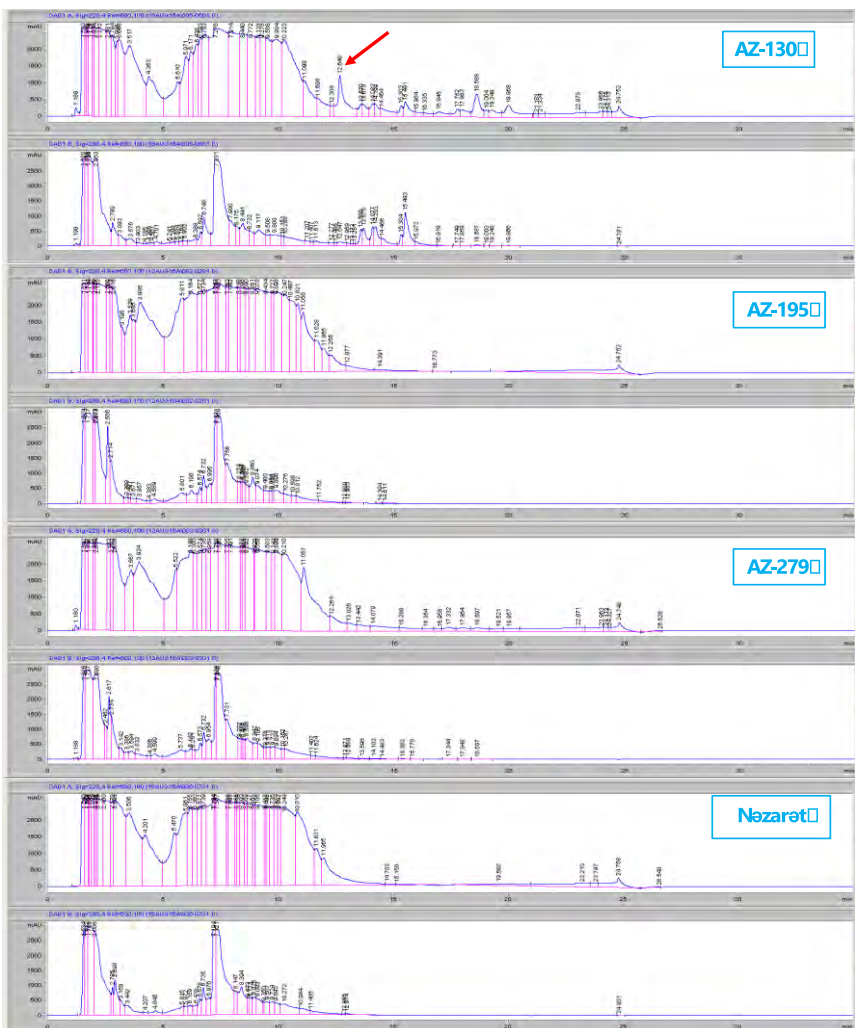
AZ-130 ştamının supernatantının üzvi həll olan fazasının YEMX analizi

Liofilizasiyadan sonra üzvi həll olan faza resuspenziya edilmiş və YEMX vasitəsilə analiz edilmişdir. YEMX sütununa yüklənmiş bütün materiallar, nəzarət istisna olmaqla, *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı fəallığa malik idilər: AZ-130 - 14 mm, AZ-195 - 9 mm və AZ-279 - 12 mm. AZ-130 ştamının SN-ının üzvi həll olan fazasından toplanmış yalnız iki YEMX fraksiya *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı fəallıq göstərmişdir: fraksiya 13 - çox zəif və fraksiya 14 - 5 mm. Nəzarət variantının yüklənmiş materialında və toplanmış fraksiyalarında fəallıq müşahidə edilməmişdir (Şəkil 5).



Şəkil 5. Nəzarət və AZ-130, AZ-195, AZ-279 ştamlarının supernatantlarının üzvi həll olan fazalarının YEMX sütununa yüklənmiş materiallarının və toplanmış fraksiyalarının *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı antibakterial fəallığı. *Qeyd: ç/z – çox zəif fəallıq.*

AZ-130 xromatoqramında saxlama müddəti 12,648 dəq olan pik 13-cü fəal fraksiyaya uyğundur, bu pikin davamı 14-cü fraksiyada da müşahidə olunur (Şəkil 6). Nəticə etibarlı ilə hündürlüyü 1200 mAU və saxlama müddəti (Rt) 12,648 dəqiqə təşkil edən pik AZ-130 biomolekuluna uyğundur. AZ-130 və nəzarət variantının xromatoqramlarını müqayisə edərək deyə bilərik ki, AZ-130 fəal biomolekulu bizi maraqlandıran pikdən əvvəl və sonra müşahidə olunan mühitin bir çox komponentlərindən qismən təmizlənmişdir.



Şəkil 6. Nəzərət və AZ-130, AZ-195, AZ-279 ştamlarının supernatantlarının üzvi həll olan fazalarının YEMX xromatoqramları.

Bütün fəallıq üzvi həll olan fazada qalır, bu mərhələdə SN-la müqayisədə fəallıq bir neçə mm artır, bu da təhlil edilən materialların həcmi ilə birbaşa bağlıdır. Belə ki, ilkin SN-ın ümumi həcmi 900 μl , liofilizasiyadan sonra yenidən resuspenziya edilmiş üzvi həll olan fazanın həcmi isə 150 μl (6 dəfə qatılşdırılmış) təşkil etmişdir. Supernatantda müşahidə olunan yüksək fəallıq toplanmış

fraksiyalarda zəifləyir ki, bu da analiz edilən materialların həcmliyi ilə əlaqədardır: yüklənmiş materialın həcmi 100 µl, 13 və 14 fəal fraksiyaların ümumi həcmi isə 2 ml idi, yəni fəallıq təxminən 20 dəfə durulaşır.

Analiz edilən üç molekuldan yalnız AZ-130 ştamı tərəfindən ifraz olunan biomolekul YEMX sütununa birləşir və yuyulur. Əldə olunan nəticələri nəzərə alaraq növbəti mərhələdə biz yalnız AZ-130 biomolekulu ilə işləməyə davam etdik.

AZ-130 ştamının supernatantlarının üzvi həll olan fazalarının YEMX analizi

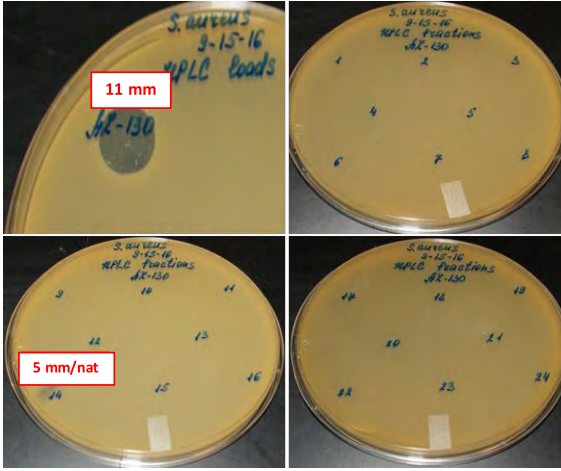
İlkin olaraq, hər bir ştam üçün 5 supernatant olan sınaq şüşəsi ekstraksiya edilmişdir. Yuxarıda yalnız bir sınaq şüşəsindən əldə edilmiş nəticələr təsvir edilmişdir. Digər 4 sınaq şüşəsinin tərkibi (yalnız AZ-130 ştamının SN-in üzvi həll olan fazası) yenidən YEMX vasitəsilə analiz edilmişdir.

YEMX sütununa yüklənmiş bütün materiallar *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı fəallıq göstərmişdir: birinci YEMX-də 15 mm, ikincidə - 13 mm, üçüncüdə - 14 mm və dördüncüdə - 14 mm. İlk iki YEMX-də yalnız fraksiya 13 çox zəif fəallıq göstərmişdir, digər ikisində isə 13 və 14-cü fraksiyalar *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı müvafiq olaraq zəif və çox zəif fəallıq göstərmişdir.

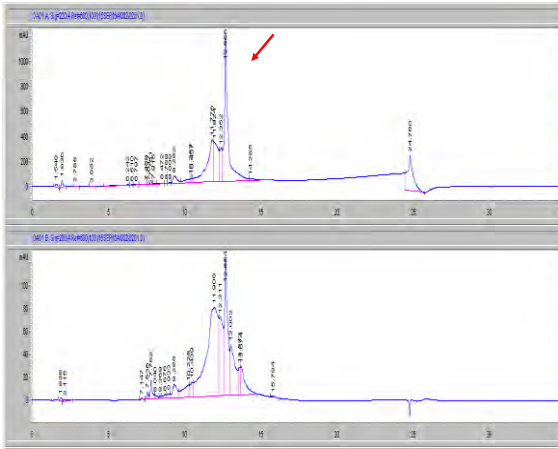
Alınan nəticələr əvvəlki təcrübələrdə əldə edilən nəticələrə oxşardır: sütuna yüklənmiş materialın yüksək fəallığı, aktiv fraksiyaların olması və saxlama müddəti ~12,66 dəqiqə ilə AZ-130 birləşməsinə uyğun gələn YEMX piki. Fəallığın zəifləməsi liofilizasiya edilmiş materialın toz şəklində -80°C-də saxlanması ilə bağlı ola bilər. Son iki təcrübənin nəticələrinə əsasən, AZ-130 biomolekulunun 8 fəal və qismən təmizlənmiş fraksiyası əldə edilmişdir.

Səkkiz birləşdirilmiş fəal fraksiyaların YEMX analizi

Beş YEMX-dən alınmış bütün fəal səkkiz fraksiyalar birləşdirilmiş, liofilizasiya edilmiş, resuspenziya edilmiş və YEMX vasitəsilə yenidən analiz edilmişdir (Şəkil 7, Şəkil 8).



Şəkil 7. AZ-130 ştamının supernatantının üzvi həll olan fazasının beş YEMX-dən alınmış və birləşdirilmiş 13 və 14-cü fəal fraksiyalarının YEMX sütununa yüklənmiş materialının və toplanmış fraksiyalarının *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı antibakterial fəallığı. *Qeyd: nat - natamam inhibə.*

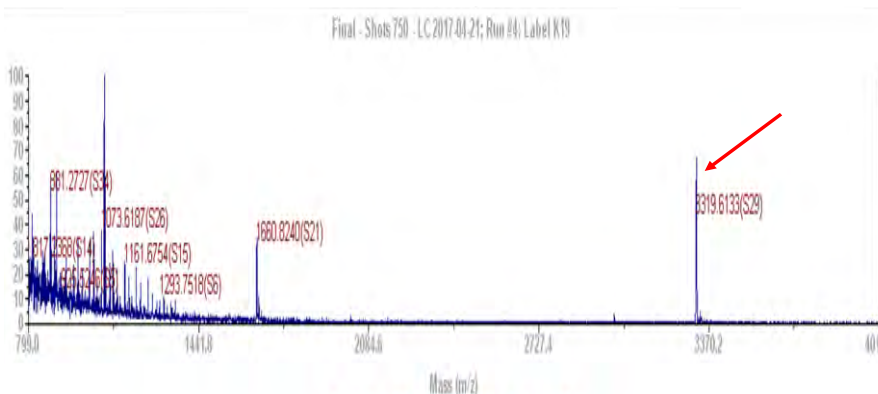


Şəkil 8. Səkkiz birləşdirilmiş fraksiyaların xromatoqramı. Səkkiz fəal YEMX

Sütuna yüklənmiş material *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı 11 mm fəallığa malik olmuşdur. Saxlama müddəti 12,666 dəqiqə olan pikə düşən 14-cü fraksiya 5 mm/natamam fəallıq göstərmişdir. Xromatoqramda ilkin SN-də müşahidə olunan piklərin çoxu yoxdur. Bu qismən təmizlənmiş material (fraksiya 14) liofilizasiya edilmiş, distillə H₂O-da resuspenziya edilmiş və AZ-130 molekulunun strukturu haqqında qismən məlumat əldə etmək üçün MALDI analizinə göndərilmişdir.

Fəal YEMX fraksiyasının MALDI analizi

AZ-130 biomolekulunun molekül kütləsi 3319,6 Da ola bilər (Şəkil 9). Bundan sonra biz yalnız AZ-130 birləşməsinə diqqət yetirdik, çünki ədəbiyyatda molekül kütləsi 3319,6 Da olan *B.vallismortis* ştamı tərəfindən sintez edilən antibakterial biomolekul haqqında məlumat yoxdur.



Şəkil 9. Fəal YEMX 14 fraksiyasının MALDI analizi.

IV FƏSİL. ANTİMİKROB BİRLƏŞMƏLƏRİNİN DAHA YÜKSƏK MİQDARDA SİNTEZİ ÜÇÜN PRODUSENTLƏRİN BÖYÜMƏ ŞƏRAİTİNİN OPTİMALLAŞDIRILMASI

4.1. Böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə supernatantların analizi

AZ-130 ştamı 32°C və 37°C temperaturda kultivasiya edildikdə yüksək miqdarda antimikrob birləşmə sintez edir. 18°C temperaturda becərilmiş AZ-130 kulturalarından toplanmış SN-da fəallıq aşkar edilməmişdir. 25°C-də becərilmiş kulturalardan toplanmış SN-da isə zəif fəallıq aşkar edilmişdir, lakin bu fəallıq 32°C və 37°C-də yetişdirilmiş kulturalardan toplanmış SN-dan aşağı olmuşdur (cədvəl 1). 32°C və 37°C-də kultivasiya edilmiş kulturalardan toplanmış aktiv SN-larda antibakterial birləşmələrin konsentrasiyasını müqayisə etmək üçün onlar mikrodurulaşdırma metodu ilə analiz edilmişdir.

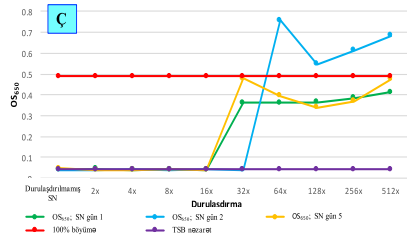
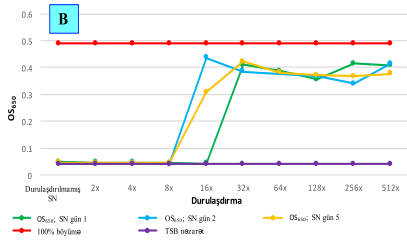
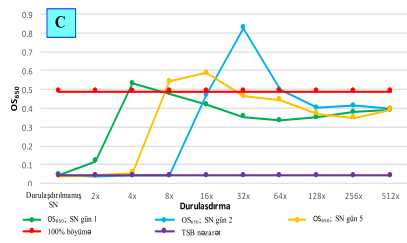
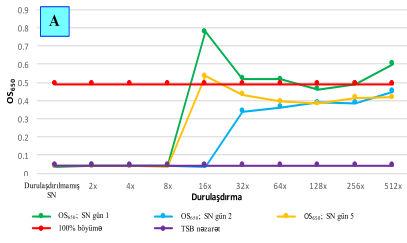
AZ-130 ştamının supernatantlarının fəallığının *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı böyümənin inhibə edilməsi metodu ilə aparılmış müqayisəli analizi

Temperatur	Mühit	Böyümənin inhibə zonası (BİZ), mm		
		SN 1-ci gün 1	SN 2-ci gün	SN 3-cü/5-ci gün
18°C	TSB	-	-	-
	TB	-	-	-
	TSB+2 % qlükoza	-	-	-
	TB +2 % qlükoza	-	-	-
25°C	TSB	-	6 /nat	-
	TB	z	9	z
	TSB + 2% qlükoza	-	-	-
	TB + 2% qlükoza	-	-	-
32°C	TSB	8	11	4
	TB	12	11	7
	TSB + 2% qlükoza	-	z	-
	TB + 2% qlükoza	4	8	7
37°C	TSB	11	12	10
	TB	11	11	5/nat
	TSB + 2% qlükoza	-	11	7
	TB + 2% qlükoza	10	12	10

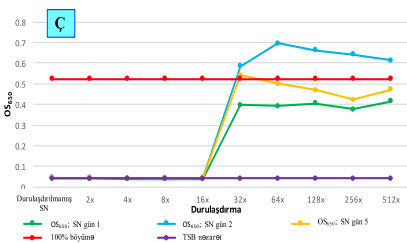
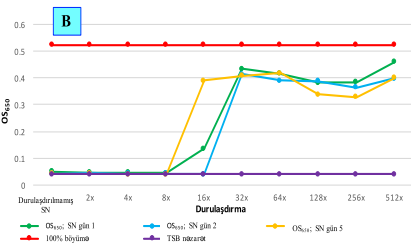
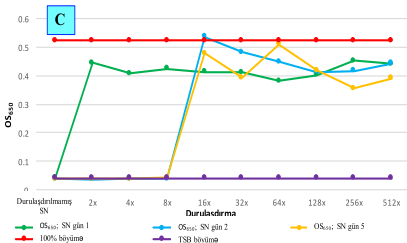
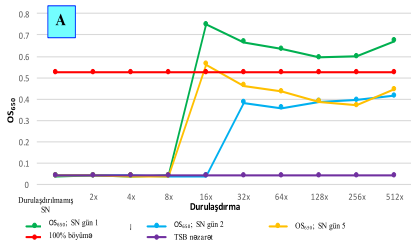
Cədvəl üçün qeydlər: mənfəi işarəsi "-" fəallıq yoxdur; z - zəif fəallıq, nat - natamam inhibə.

4.2. Supernatantların mikrodurulaşdırma metodu ilə analizi

32°C-də becərilmiş AZ-130 ştamı tərəfindən AZ-130 birləşməsinin ən yüksək sintezi sınaqdan keçirilmiş dörd mühitdən üçündə 2-ci gündə müşahidə edilir. TSB + 2% qlükoza mühitindən toplanan SN 8 dəfə, TSB-dən - 16 dəfə və TB + 2% qlükozadan isə 32 dəfə durulaşdırdıqdan sonra aktivdir. TB mühitindən 1-ci gündə toplanmış SN öz maksimum fəallığını 16 dəfə durulaşdırmadan sonra göstərir (Şəkil 10).



Şəkil 10. *S. aureus* ATCC 29213-ün 32°C-də becərilmiş və müxtəlif mühitlərdən təmizlənmiş AZ-130 ştamının supernatantının iştirakı ilə böyümə kinetikası: A) TSB mühitindən; B) TB mühitindən; C) TSB + 2% qlükoza mühitindən; Ç) TB + 2% qlükoza mühitindən.



Şəkil 11. *S. aureus* ATCC 29213-ün 37°C-də becərilmiş və müxtəlif mühitlərdən təmizlənmiş AZ-130 ştamının supernatantının iştirakı ilə böyümə kinetikası: A) TSB mühitindən; B) TB mühitindən; C) TSB + 2% qlükoza mühitindən; Ç) TB + 2% qlükoza mühitindən.

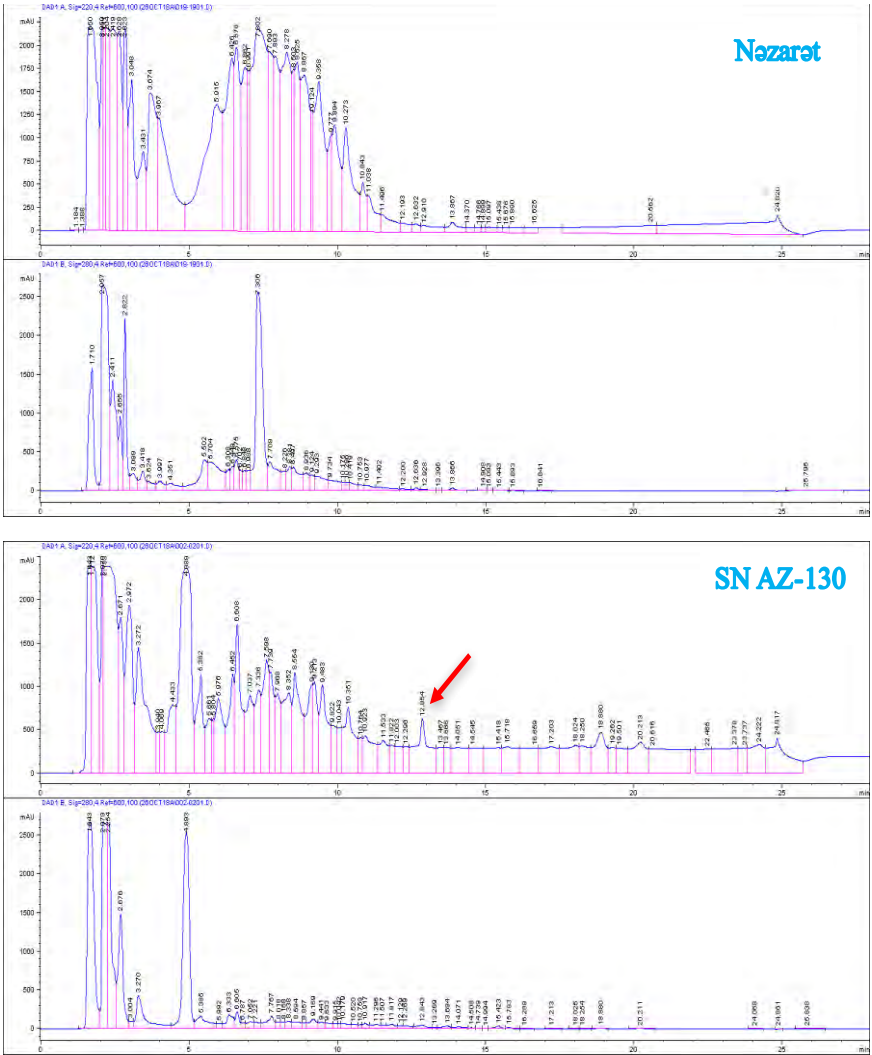
TB + 2% qlükoza (37°C) mühitindən alınmış 16 dəfə durulaşdırılmış supernatantın fəallığı hətta beş günlük inkubasiyadan sonra da stabildir. 37°C-də TB və TSB mühitindən toplanmış AZ-130 ştamının supernatantları maksimum fəallığı 16 dəfə durulaşmadan sonra 2-ci gündə, TSB + 2% qlükoza mühitindən təmizlənmiş supernatantlar isə 2 və 5-ci günlərdə maksimum fəallığı 8 dəfə durulaşmadan sonra göstərmişlər (Şəkil 11).

OS 650 nm-də oxunması ilə əldə edilən nəticələr vizual olaraq təsdiqlənmiş və yuvalarda flüoressensiyanın 560 nm həyəcan və 590 nm emissiyada ölçülmüş nəticələri ilə tamamilə üst-üstə düşür. AZ-130 TB + 2% qlükoza mühitində 32°C-də 2 gün ərzində becərildikdə ən yüksək miqdarda antibakterial birləşmə sintez edir; SN-da inhibitor vahidlərin sayı tədqiq edilən digər şəraitlərdən ən azı iki dəfə çoxdur. Müşahidə olunan fəallıq yüksək və stabildir, çünki AZ-130 biomolekulu hətta 5 günlük inkubasiyadan sonra da fəallığını itirmir.

V FƏSİL. AZ-130 ŞTAMININ SUPERNATANTININ VƏ QİSMƏN TƏMİZLƏNMİŞ BİOMOLEKULUNUN XÜSUSİYYƏTLƏRİNİN ÖYRƏNİLMƏSİ

5.1. AZ-130 ştamının supernatantında antibakterial komponentlərin miqdarı

AZ-130 ştamının SN-nın (BİZ=10 mm) YEMX metodu vasitəsilə analizi nəticəsində *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı müvafiq olaraq zəif və 4 mm fəallığa malik iki aktiv 13 və 14-ü fraksiya aşkar edilmişdir. Nəzarət variantının yüklənmiş materialında və toplanmış fraksiyalarında fəallıq aşkar edilməmişdir. AZ-130-un xromatoqramında saxlama müddəti 12,854 dəq olan pik 13-cü fraksiyaya uyğun olmuşdur və bu pikin davamı 14-cü fraksiyada da müşahidə edilmişdir (Şəkil 12). Bütün digər fraksiyalarda fəallığın olmaması onu göstərmişdir ki, AZ-130 ştamı antibakterial fəallığa malik və YEMX sütununda saxlanma müddəti 12,854 dəqiqə təşkil edən bir birləşmə sintez edir.

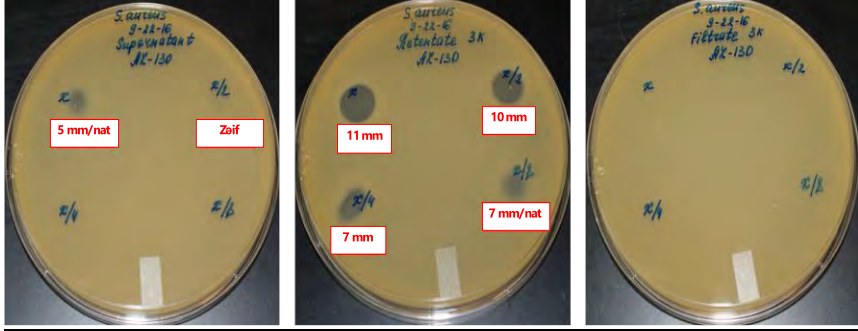


Şəkil 12. AZ-130 ştamının supernatantının və nəzarət variantının YEMX xromatoqramları.

5.2. AZ-130 birləşməsinin təqribi molekül kütləsinin təyini

Durulaşdırılmamış SN-ın *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı 5 mm/natamam fəallığı 10 qat qatılaşdırıldıqdan sonra 11 mm-ə qədər artmışdır. 4 qat və 8 qat durulaşdırılmış SN fəallıq göstərməmiş, 4 qat və 8 qat durulaşdırılmış konsentrat isə, müvafiq olaraq, 7 mm və 7

mm/natamam fəallıq göstərmişdir. Filtratda heç bir fəallıq aşkar edilməmişdir ki, bu da AZ-130 antimikrob birləşməsinin molekül kütləsinin 3000 Da-dan çox olduğunu göstərir (Şəkil 13). Bu göstərici MALDI analizinin nəticələrini təsdiqləyir.



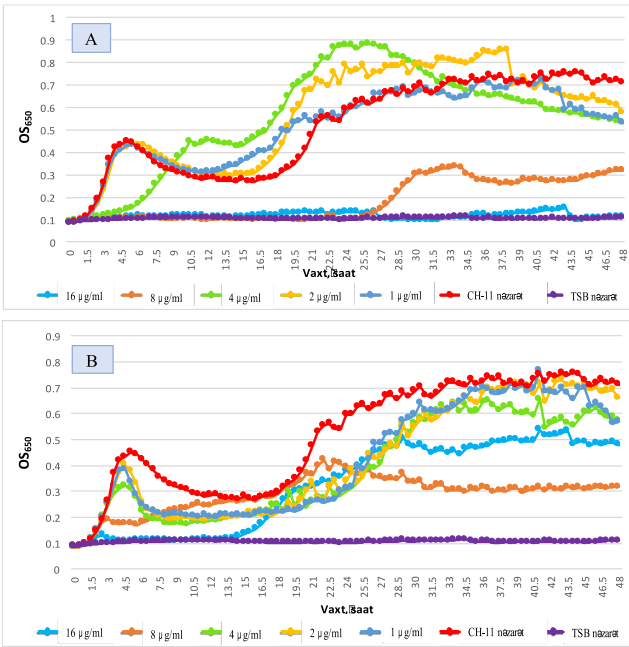
Şəkil 13. Supernatant, retenat və filtratın *S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı müxtəlif durulaşmalarda antibakterial fəallığı.

Qeyd: z - zəif fəallıq, nat - natamam inhibə.

5.3. Qismən təmizlənmiş AZ-130 biomolekul olan mühitdə *S. aureus*-un böyümə kinetikasi

Müəyyən edilmişdir ki, *S. aureus* ChH-11 ştamı metisillinə davamlıdır. Metisillin 8 µg/ml qatılıqda bu ştamın böyüməsini inhibə edir, lakin tamamilə dayandırmır. Metisillinin qatılığı 16 µg/ml olduqda, ilk 14 saat ərzində indikator ştamının böyüməsinin tam inhibə edilməsi müşahidə olunur, bundan sonra isə OS artmağa başlayır.

AZ-130 biomolekulunun 1 µg/ml və 2 µg/ml qatılıqları ChH-11 ştamının böyüməsinə təsir göstərmir; 4 µg/ml qatılıqda isə ilk 3 saat ərzində böyümənin bir qədər ləngiməsi müşahidə olunur, bundan sonra ChH-11 ştamı böyüməyə başlayır (Şəkil 14). AZ-130 biomolekulunun 8 µg/ml və 16 µg/ml-ə bərabər qatılıqları inkubasiyanın ilk günündə ChH-11 ştamının böyüməsini tamamilə inhibə edir, lakin 25 saatdan başlayaraq ChH-11 ştamının OS 0,3 vahidə qədər artımı müşahidə olunur. AZ-130 biomolekulu 16 µg/ml qatılıqda bütün inkubasiya zamanı ChH-11 ştamının böyüməsini və inkişafını tamamilə inhibə edir.



Şəkil 14. AZ-130 biomolekul (A) və metisillin (B) olan mühitdə metisillinə davamlı ChH-11 (*S. aureus*) ştamının böyümə kinetikasi.

VI FƏSİL. AZ-130, *B. SUBTILIS* ŞTAMLARININ VƏ BU ŞTAMLARIN SİNTEZ ETDİYİ ANTİMİKROB BİRLƏŞMƏLƏRİN MÜQAYİSƏSİ

Müəyyən edilmişdir ki, AZ-130 ştamının aid olduğu *B. vallismortis* bakteriyası çoxsaylı müxtəlif antimikrob maddələr sintez edən *B. subtilis* ilə çox oxşardır¹¹.

Bundan əlavə, *B. subtilis* bakteriyasının sintez etdiyi subtilinin molekul kütləsi 3321 Da təşkil edir¹², qismən təmizlənmiş AZ-130 birləşməsinin molekul kütləsi isə 3319,6 Da təşkil edir ki, bu da qiymətinə görə subtilinə çox yaxındır. Buna görə də bu fəsildə təqdim olunan təcrübələrin məqsədi AZ-130 və *B. subtilis* bakteriyalarını və onların sintez etdikləri antibakterial molekulları müqayisə etmək olmuşdur.

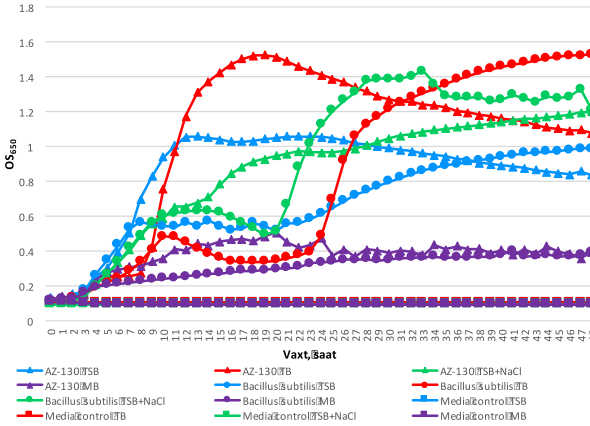
¹¹ Earl, A.M. Whole-Genome Sequences of *Bacillus subtilis* and Close Relatives / A.M.Earl, M.Eppinger, W.F.Fricke [et al.] // Journal of Bacteriology, - 2012, 2012 Volume 194 Number 9, - p. 2378 –2379.

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

6.1. AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının böyümə kinetikasi

Müşahidələr göstərmişdir ki, AZ-130 və *B. subtilis* ştamları böyümə kinetikasına görə bir-birindən fərqlənir. Belə ki, öyrənilən dörd mühitdən üçündə AZ-130 ştamının OS müəyyən həddə qədər artır, sonra isə azalmağa başlayır; TSB + NaCl mühitində OS bütün müşahidə olunan dövr ərzində artır. *B. subtilis*-in böyüməsi fərqli sxemdə baş verir; əvvəlcə OS artır, sonra düşməyə başlayır, yenidən artır və yenidən azalır. OS = 0,3 dəyərində qədər xətti artımının müşahidə edildiyi MB mühiti istisna olmaqla (Şəkil 15). Nəzarət variantlarında böyümə aşkar edilməmişdir.

Tədqiq olunan mühitlər arasında ştamların böyüməsi baxımından TB mühiti ən optimaldır. OS ölçmələrinə əsasən, AZ-130 bakteriyası TB mühitində yaxşı inkişaf edir, belə ki, 48 saat ərzində inkubasiyadan sonra OS ən yüksək qiymətə (1,53) çatır. Bu göstərici MB mühitindən təxminən beş dəfə yuxarıdır.



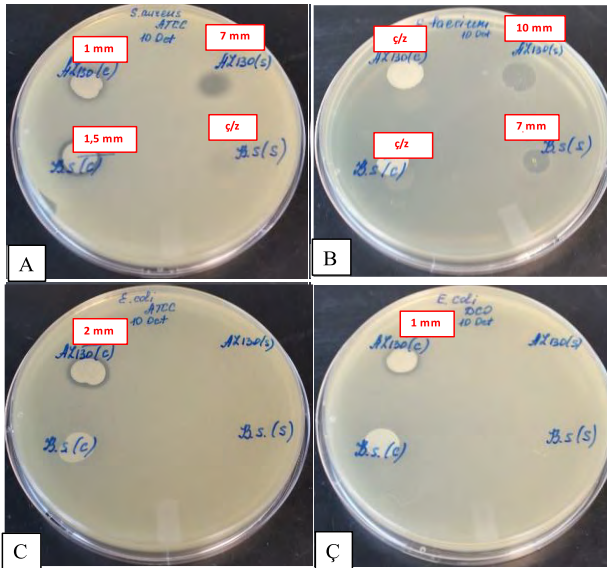
Şəkil 15. Dörd müxtəlif mühitdə AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının böyümə kinetikasi.

6.2. AZ-130 və *B. subtilis* kulturalarının və onların supernatantlarının müxtəlif patogenlərə qarşı fəallıqlarının müqayisəli analizi

AZ-130 ştamının *S. aureus* ATCC 29213 -ə qarşı kulturada 1 mm, *E. faecium*-ə qarşı isə çox zəif, *B. subtilis*-in isə kulturada eyni ştamlara qarşı fəallığı müvafiq olaraq 1,5 mm və çox zəif olmuşdur. AZ-130 ştamı *B. subtilis*-dən fərqli olaraq, tədqiq edilmiş hər iki *E.*

coli ştamına qarşı kulturada fəallıq göstərmişdir (*E. coli* ATCC 25922-yə qarşı 2 mm və *E. coli* DC0-a qarşı 1 mm).

AZ-130 ştamının SN-ı *S. aureus* ATCC 29213 və *E. faecium*-a qarşı müvafiq olaraq 7 mm və 10 mm, *B. subtilis* SN-ı isə çox zəif (*S. aureus* ATCC 29213-ə qarşı) və 7 mm (*E. faecium*-a qarşı) fəallıq göstərmişdir. Hər iki ştamın inokulyasiyası və becərilməsinin eyni şəraitdə baş verdiyini nəzərə alsaq, AZ-130 ştamının fəallığının əhəmiyyətli dərəcədə yüksək olduğunu iddia etmək olar (Şəkil 16).

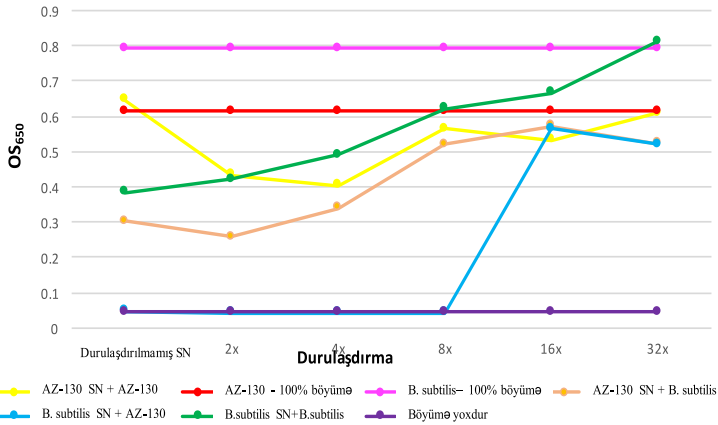


Şəkil 16. AZ-130 və *B. subtilis* kulturalarının və onların supernatantlarının antibakterial fəallığı A) *S. aureus* ATCC 29213 qarşı; B) *E. faecium* qarşı; C) *E. coli* ATCC 25922 qarşı; Ç) *E. coli* DC0 qarşı.

6.3. AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının supernatantlarının fəallığının çarpaz analizi

B. subtilis SN-ı AZ-130 ştamına qarşı 9 mm, AZ-130 ştamının SN-ı isə *B. subtilis* bakteriyasına qarşı fəallıq göstərməmişdir. SN-ın mikrodurulaşdırma metodu ilə analizi göstərmişdir ki, *B. subtilis*-in SN-ı hətta 8 dəfə durulaşdırıldıqdan sonra belə, AZ-130 ştamının böyüməsini tamamilə inhibə edir, lakin AZ-130 ştamının SN-da *B. subtilis*-ə qarşı heç bir fəallıq müşahidə edilməmişdir (Şəkil 17). Produsentlərin sintez etdikləri antimikrob birləşmələrə davamlı olduğunu nəzərə alsaq, *B. subtilis* SN-ının AZ-130 ştamının böyüməsini dayandırması AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının sintez

etdiyi antibakterial maddələrin strukturunda və təsir mexanizmlərində mümkün fərqləri göstərir.

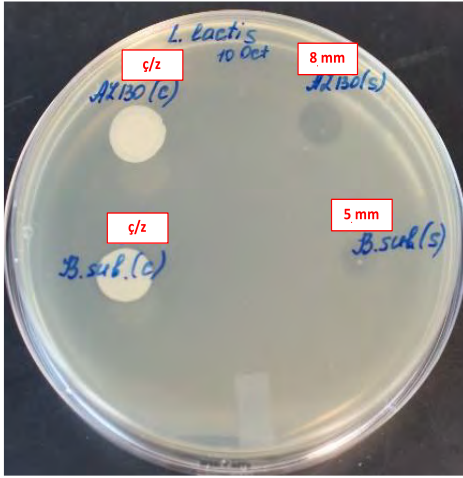


Şəkil 17. AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının supernatantlarının mikrodurulaşdırma metodu ilə inhibitor fəallığının çarpaz analizi.

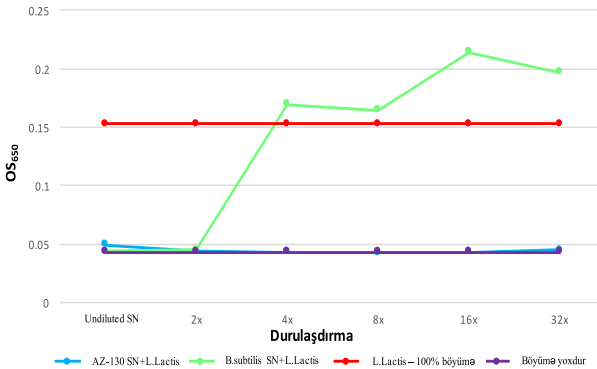
6.4. AZ-130 və *B. subtilis* supernatantlarının *Lactococcus lactis*-ə qarşı fəallığının müqayisəli analizi

Məlumdur ki, subtilin *L. lactis*-in böyüməsini və inkişafını inhibə edir¹³. AZ-130 ştamı tərəfindən sintez edilən antimikrob birləşmənin subtilinlə fəallıq mexanizmlərində olan oxşarlığı müəyyən etmək üçün *B. subtilis* və AZ-130 ştamının SN-ları *L. lactis*-ə qarşı fəallıqlarına görə analiz edilmişdir. AZ-130 və *B. subtilis* ştamları kulturada *L. lactis*-ə qarşı çox zəif fəallıq göstərmiş, eyni bakteriyaların SN-ının fəallığı isə kifayət qədər yüksək olmuşdur: 8 mm - AZ-130 ştamının SN və 5 mm - *B. subtilis* SN-ı (Şəkil 18). İnhibitor vahidlərin miqdarlarını müqayisə etmək üçün həyata keçirilmiş SN mikrodurulaşdırma metodu ilə analizi göstərmişdir ki, AZ-130 ştamının SN-ın *L. lactis*-ə qarşı fəallığı *B. subtilis* SN-dan 16 dəfə yüksəkdir (Şəkil 19).

¹³ 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.



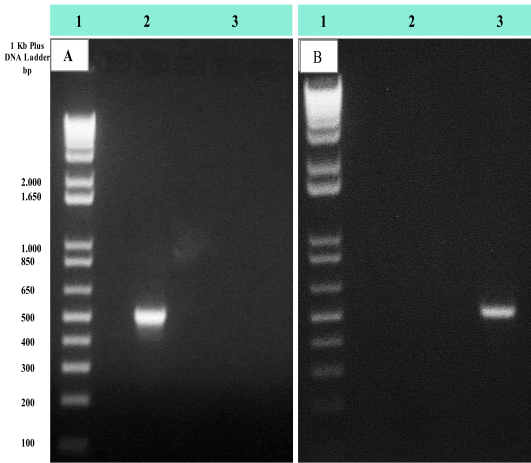
Şəkil 18. AZ-130 və *B. subtilis* kulturalarının və onların supernatantlarının *L. lactis*-ə qarşı antibakterial fəallığı. *Qeyd:* ç/z - çox zəif fəallıq.



Şəkil 19. AZ-130 və *B. subtilis* ştamlarının supernatantlarının mikrodurulaşdırma metodu ilə *L. lactis*-ə qarşı inhibitor fəallığı.

6.5. SpaS subtilin geninin PZR analizi

AZ-130 ştamının sintez etdiyi antibakterial birləşmə ilə subtilinin molekulyar səviyyədə fərqləndirilməsi üçün hazırlanmış spesifik spaS-seqR və spaS-seqF praymerlərindən istifadə etməklə aparılmış PZR analizi nəticəsində *B. subtilis* DNT-də ölçüsü 500 bp-dən böyük olan fraqment aşkar edilmişdir, lakin AZ-130 ştamının amplifikasiyası baş verməmişdir. Bu nəticə AZ-130 ştamında subtilin geninin olmadığını və bu ştamın subtilindən fərqli bir birləşmə sintez etdiyini göstərir (Şəkil 20).



Şəkil 20. PZR fraqmentlərinin elektroforetik ayrılması. Gözlənilən amplikonun ölçüsü ~ 521 bp-dir. A) Yuvacığı 1 - GeneRuller TM 1 kb Plus DNT Ladder, yuvacığı 2 - *B. subtilis* PZR məhsulu, yuvacığı 3 - AZ-130 PZR məhsulu. B) Yuvacığı 1 - GeneRuller TM 1 kb Plus DNT Ladder, yuvacığı 2 - AZ-130 PZR məhsulu, yuvacığı 3 - *B. subtilis* PCR məhsulu.

AZ-130 biomolekulunun molekül kütləsinə görə subtilinə oxşarlığı (3300 Da-dan çox) və *L. lactis*-ə qarşı fəallığının olması AZ-130 ştamının sintez etdiyi antimikrob birləşmənin eyni sinfə (subtilinə bənzər) aid olmasını deməyə imkan versə də, PZR analizi isə AZ-130 ştamında subtilin geninin olmadığını göstərir.

NƏTİCƏLƏR

1. İlk dəfə olaraq, Azərbaycanın neftlə çirklənmiş torpaqlarının mikrobiotasından antibakterial fəallığa malik 12 növə aid 28 bakteriya ştamı ayrılmışdır. Onların əsasında “antimikrob birləşmələrin produsentləri” adlı xüsusi kolleksiya yaradılmışdır [1, 2, 3, 5, 6].
2. İlk dəfə olaraq, *Bacillus vallismortis* növünə aid bakteriyaların antibakterial fəallığı aşkar edilmişdir. Göstərilmişdir ki, *B. vallismortis* bakteriyasının AZ-130 ştamı supernatantda Qram-müsbət şərti bakteriyalara qarşı yüksək fəallığa malikdir və YEMX sütununda saxlanma müddəti (Rt) 12,648 dəq təşkil edən bir antibakterial birləşmə sintez edir [8, 10, 12].
3. AZ-130 biomolekulu pH-ın aşağı qiymətlərində stabildir və üzvi həlledicilərdə həll olur. Bioaktiv AZ-130 molekulu təxmini molekül kütləsi 3319,6 Da təşkil edir. Hal-hazırda *B.vallismortis* bakteriyası tərəfindən sintez olunan belə antibakterial birləşmə haqqında heç bir məlumat yoxdur [11, 12].

4. Müəyyən edilmişdir ki, *B. vallismortis*-in AZ-130 ştamı TB + 2% qlükoza mühitində 32°C-də 2 gün ərzində becərildikdə ən yüksək miqdarda antibakterial birləşmələr sintez edir. Müşahidə olunan fəallıq yüksək və stabildir, belə ki, AZ-130 biomolekulu hətta 5 günlük inkubasiyadan sonra da fəallığını itirmir [4, 10].
5. Göstərilmişdir ki, qismən təmizlənmiş AZ-130 antibakterial birləşməsi 8 µq/ml-dən 16 µq/ml-ə qədər qatılıqda metisillinə davamlı *Staphylococcus aureus* ştamının böyümə və inkişafını dayandırır [14].
6. Müəyyən edilmişdir ki, AZ-130 ştamının supernatantı *Lactobacillus lactis* bakteriyasına qarşı yüksək fəallığa malikdir. AZ-130 biomolekulunun molekul kütləsinin *Bacillus subtilis* tərəfindən sintez olunan subtilinlə (3300 Da-dan artıq) oxşarlığı və *L. lactis*-ə qarşı fəallığının olması bu antimikrob birləşmənin subtilinlə eyni sinfə aid olması ehtimalını göstərir, ancaq fəallığı subtilinə nəzərən 16 dəfə çoxdur [15].
7. Aşkar olunmuşdur ki, *Bacillus subtilis*-in supernatantı AZ-130 ştamının böyüməsini tamamilə dayandırır, AZ-130 ştamının supernatantı isə *B. subtilis*-ə qarşı fəallıq göstərmir. AZ-130 ştamının böyüməsinin *B. subtilis* supernatantı tərəfindən inhibə edilməsi bu ştamlar tərəfindən ifraz olunan antibakterial maddələrin strukturunda və təsir mexanizmlərində mümkün fərqi göstərir [10, 7].
8. SpaS subtilin geninin amplifikasiyası üçün hazırlanmış spaS-seqR və spaS-seqF spesifik praymerlərdən istifadə etməklə aparılan PZR analizi nəticəsində AZ-130 ştamında bu genin olmadığı təsdiqlənmişdir. AZ-130 ştamı subtilindən fərqli bir birləşmə sintez edir ki, bu da alınan biomolekulun ümumilikdə elm üçün yeni olduğunu göstərir [13].

DİSSERTASIYA İŞİNƏ AİD ÇAP EDİLMİŞ ELMİ NƏŞRLƏRİN SİYAHISI

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 ştammi kolleksiyasının yaradılması və onların yeni biomolekullar üçün skriniği // 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.

Dissertasiyanın müdafiəsi 2 noyabr 2022-ci il tarixində saat 11:30 -da Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 1.25 Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcək.

Ünvan: AZ1073, Bakı şəh., İzzət Nəbiyev küçəsi, 11.

Dissertasiya ilə Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Dissertasiya və avtoreferatın elektron versiyaları Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyi Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutunun rəsmi internet saytında (<https://www.imbb.az/>) yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat 1 oktyabr 2022-ci il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 29.09.2022

Kağızın formatı: A5

Həcm: 38260

Tiraj: 30