

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Выпускная квалификационная бакалаврская работа

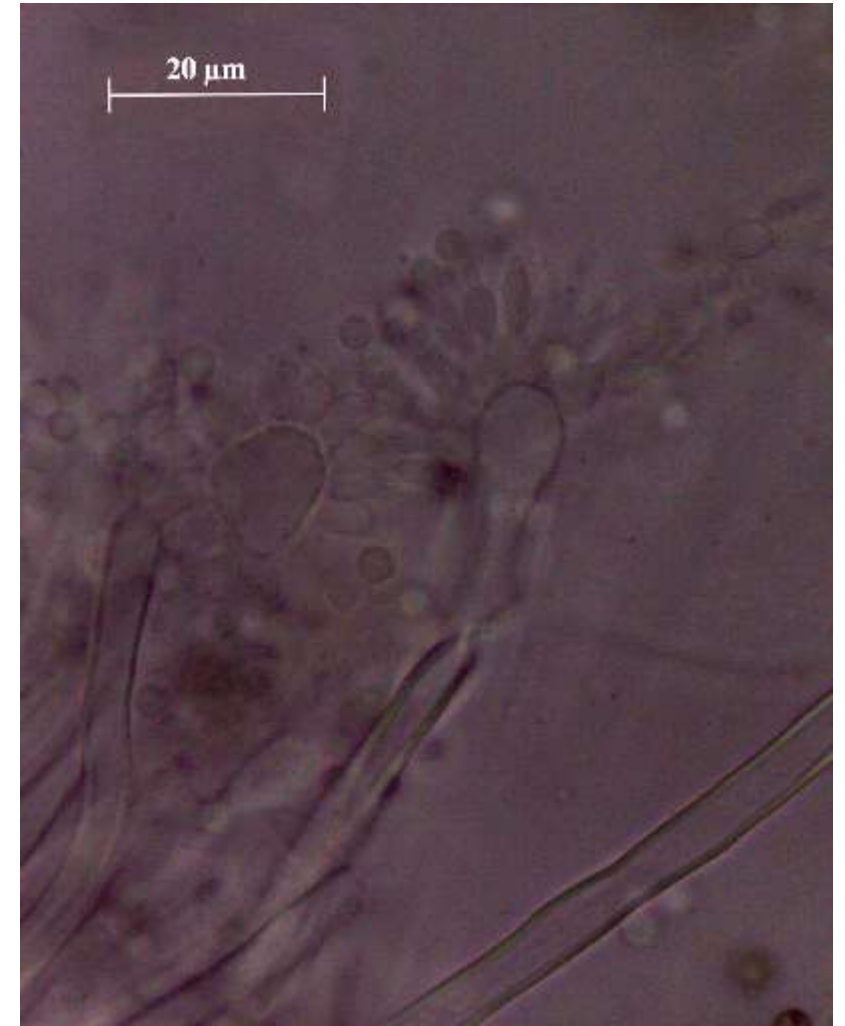
Антагонистическая активность грибов рода *Aspergillus*

Выполнила: студентка IV курса
Широкова Ю. С.
Научный руководитель: д.б.н.
Александрова А. В.

Москва, 2019

Актуальность работы

- Данные грибы широко распространены в окружающей среде. Их можно встретить в различных местах: на растениях, на разлагающихся органических веществах и в почве, в организме животных, в пресной и солёной воде. Также виды этого рода могут обитать в помещениях (на поверхности стен, зданий), на бытовых приборах, повреждать культурные объекты (памятники, картины).



Конидии *A. sydowii*

- Грибы рода *Aspergillus* синтезируют большое количество различных веществ, активно использующихся в различных областях человеческой деятельности (производстве красителей, ароматизаторов, фармацевтических препаратов, агрохимикатов и т.д.)
- Одним из перспективных направлений является поиск новых выделяемых грибами данного рода биологически активных веществ, которые могут найти применение в медицине (например, для разработки на их основе различных антимикробных препаратов), а также в сельском хозяйстве для борьбы с фитопатогенами

Цель работы

Исследование антагонистической активности грибов рода *Aspergillus* из разных географических точек в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также некоторых видов грибов.

Задачи работы

- Изучение литературы по теме исследования
- Высев исследуемых штаммов грибов рода *Aspergillus* из коллекции и подтверждение их видовой принадлежности
- Проверка антагонистической активности исследуемых штаммов грибов рода *Aspergillus* в отношении выбранных тест-культур
- Выявление наиболее перспективных штаммов для дальнейшего выделения биологически активных веществ и их практического применения
- Сравнение антагонистической активности российских и вьетнамских штаммов одного вида

Объекты

Объектами исследования послужили 35 штаммов грибов рода *Aspergillus* 26-ти видов, принадлежащих к 17-ти секциям.

В качестве тест-объектов были выбраны 7 видов грамотрицательных и 5 видов грамположительных бактерий, предоставленных кафедрой биологии почв факультета Почвоведения МГУ, а также 3 вида грибов.

Грамположительные бактерии:

- *Bacillus cereus*
- *Bacillus subtilis*
- *Rhodococcus luteus*
- *Rhodococcus erythropolis*
- *Arthrobacter globiformis*
- *Arthrobacter pascens*
- *Micrococcus agilis*

Грамотрицательные бактерии:

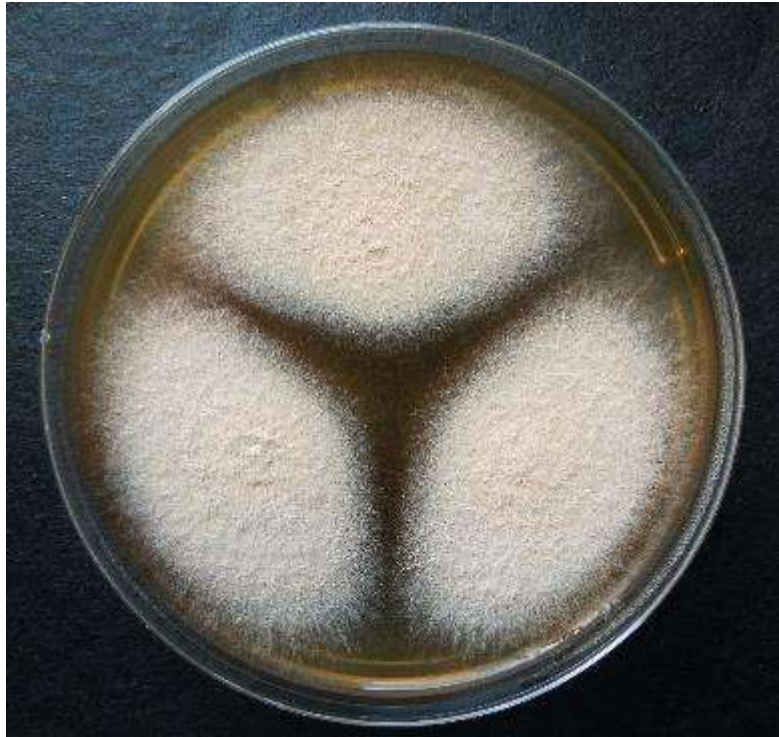
- *Agrobacterium rhizogenes*
- *Mycococcus sp.*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Comamonas sp.*
- *Serratia sp.*

Грибы:

- *Saccharomyces ludwigii*
- *Aureobasidium pullulans*
- *Fusarium oxysporum*

Методы

Высев исследуемых штаммов грибов из коллекции на питательные среды



A. parvulus



A. janus

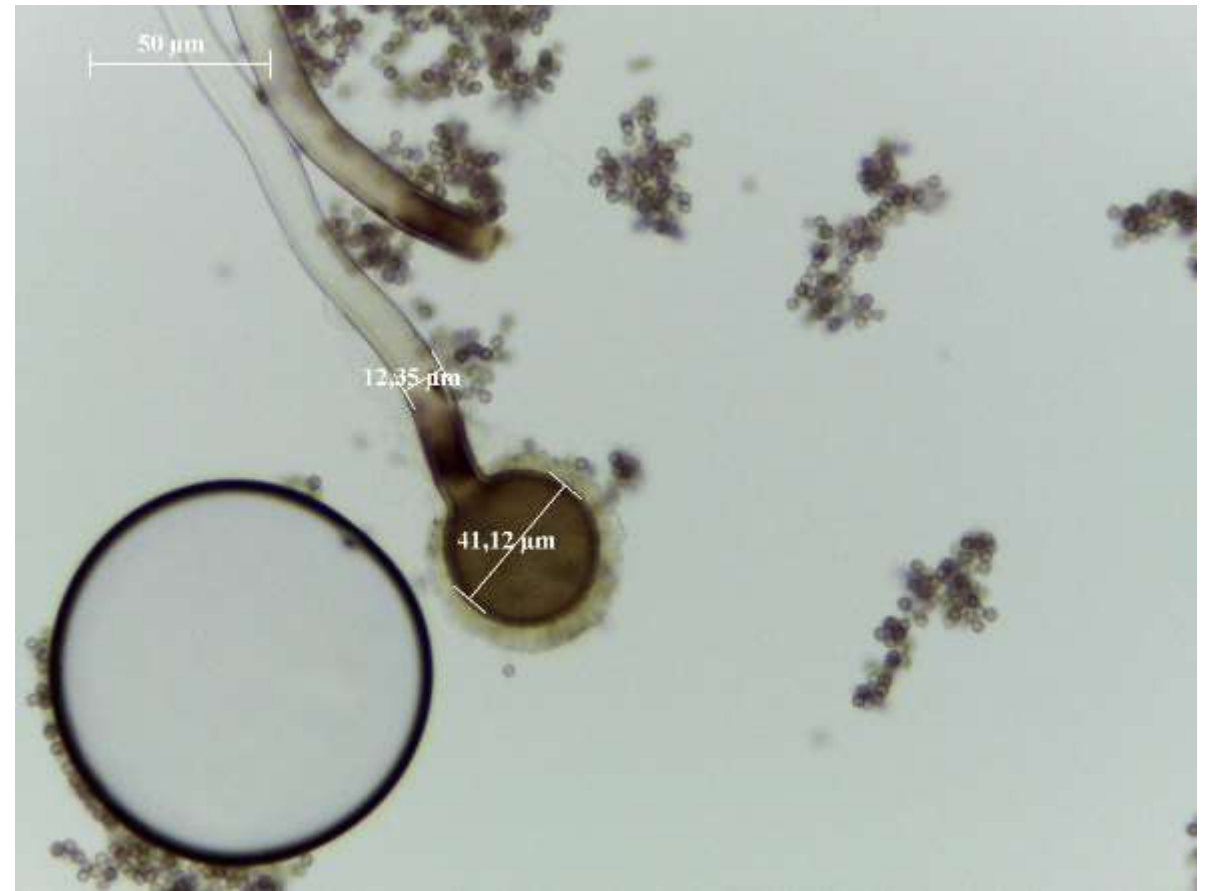


A. alliaceus

Подтверждение видовой принадлежности исследуемых штаммов,
составление макро- и микроморфологического описания колоний



A. flavipes



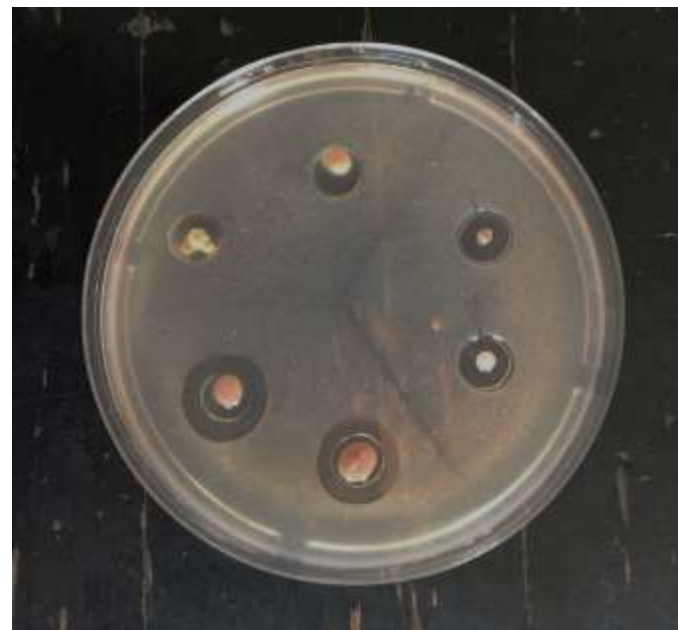
A. aculeatinus

Проверка на антагонистическую активность выделенных штаммов грибов рода *Aspergillus* производилась луночным методом. Использовались культуральная жидкость и пеллеты мицелия гриба. В каждый из трёх секторов чашки Петри помещался гриб одного штамма, после чего они ставились в термостат (25°C) на 3-4 дня. Затем определялась зона задержки роста тест-культуры. Измерялся **радиус** зоны задержки роста в мм **без учёта лунки**.

Пример теста с использованием культуральной жидкости



Пример теста с использованием пеллет мицелия



В работе применялась следующая система оценки интенсивности антагонистической активности, основанная на измерении **радиуса** зоны угнетения в мм **без учёта лунки**:

- 0 мм – неактивные
- 1-4 мм – слабоактивные
- 4-8 мм – умеренно активные
- >8 мм – высокоактивные

Результаты работы

Для каждого исследуемого штамма были построены диаграммы размаха («ящички с усами») радиусов угнетения тест-культур

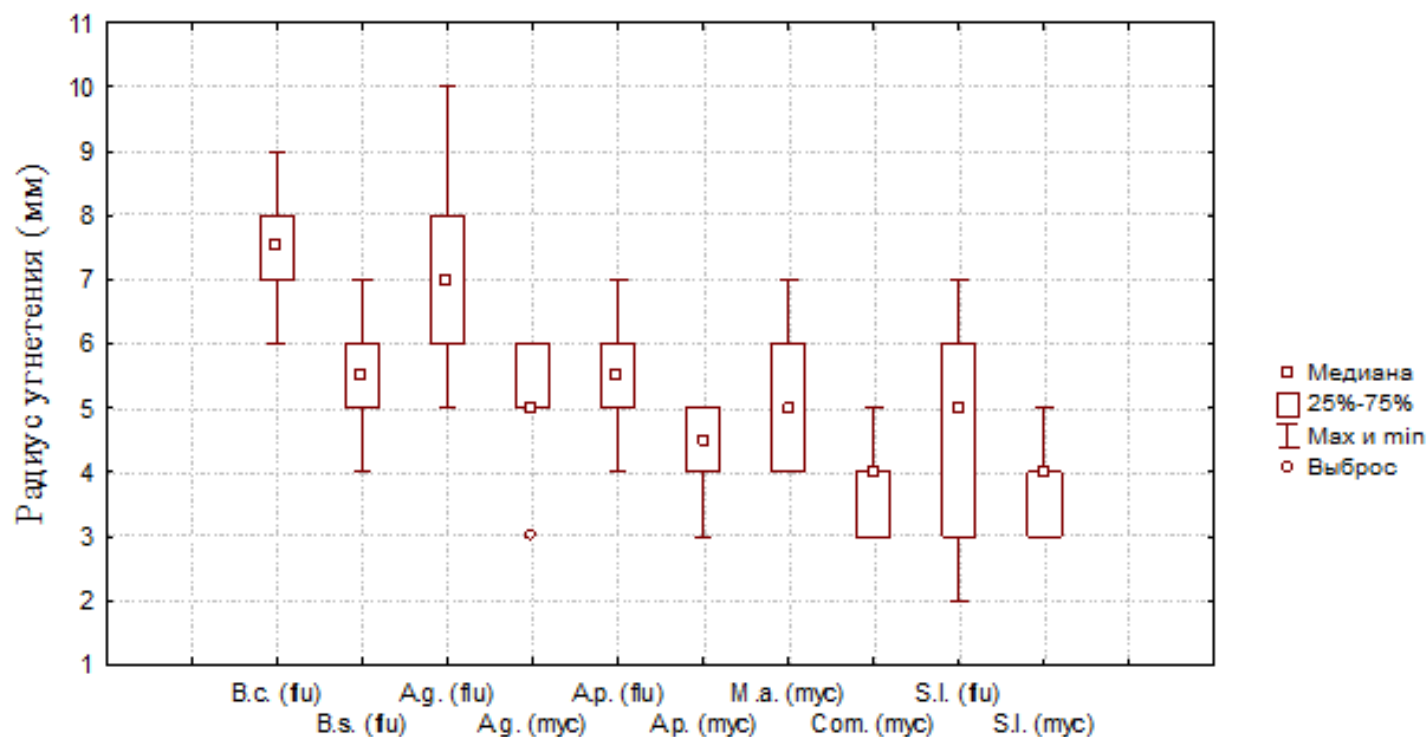


Рис. 1. Диаграммы размаха радиусов угнетения (мм) тест-культур метаболитами, содержащимися в культуральной жидкости и мицелии *Aspergillus amstelodami* (MSU_FS-01458)

13 штаммов проявили высокую и умеренную антибиотическую активность по отношению к грамположительным бактериям

1. *A. amstelodami* (5 культур, max 10 мм – *Arthrobacter globiformis*)
2. *A. neoflavipes* (4 культуры, max 12 мм – *Bacillus cereus*)
3. *A. flavipes* MSU_FS-03465 (4 культуры, max 12 мм – *Bacillus subtilis*)
4. *A. tamarii* MSU_FS-02587 (4 культуры, max 11 мм – *Arthrobacter globiformis*)
5. *A. clavatus* (4 культуры, max 10 мм – *Bacillus cereus*)
6. *A. candidus* MSU_FS-02680 (4 культуры, max 9 мм – *Bacillus subtilis*)
7. *A. sulphureus* (4 культуры, max 8 мм – *Bacillus subtilis*)
8. *A. terreus* MSU_FS-00719 (4 культуры, max 7 мм – *Bacillus subtilis*)
9. *A. fumigatus* (3 культуры, max 14 мм – *Bacillus cereus*)
10. *A. parvulus* MSU_FS-01633 (3 культуры, max 13 мм – *Bacillus subtilis*)
11. *A. janus* (2 культуры, max 12 мм – *Bacillus subtilis*)
12. *A. awamori* (2 культуры, max 7 мм – *Arthrobacter globiformis*)
13. *A. cervinus* (2 культуры, max 7 мм – *Bacillus subtilis*)

5 штаммов проявили высокую и умеренную антибиотическую активность по отношению к грамотрицательным бактериям

1. *A. terreus* MSU_FS-02680 (3 культуры, max 9 мм – *Mucococcus* sp.)
2. *A. lentulus* MSU_FS-03251 (3 культуры, max 9 мм – *Comamonas* sp.)
3. *A. parasiticus* (3 культуры, max 8 мм – *Micrococcus agilis*)
4. *A. sulphureus* (2 культуры, max 9 мм – *Comamonas* sp.)
5. *A. flavus* (2 культуры, max 9 мм – *Comamonas* sp.)

10 штаммов проявили высокую и умеренную антимикотическую активность против фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum*

1. *A. ochraceus* (max 15 мм)
2. *A. niger* MSU_FS-03510 (max 14 мм)
3. *A. flavus* (max 16 мм)
4. *A. tamaritii* MSU_FS-02587 (max 13 мм)
5. *A. terreus* MSU_FS-02680 (max 11 мм)
6. *A. fumigatus* (max 10 мм)
7. *A. aculeatus* (max 7 мм)
8. *A. lentulus* MSU_FS-03251 (max 8 мм)
9. *A. parasiticus* (max 7 мм)
10. *A. awamori* (max 8 мм)

Для штаммов одного вида различных мест обитания была проведена проверка на достоверность отличий (U критерий Манна-Уитни) интенсивности угнетения тест-объектов

Тест-культура	p-level	Достоверные различия
<i>Bacillus subtilis</i> (flu)	0,575174	Нет
<i>Bacillus subtilis</i> (myc)	0,229767	Нет
<i>Arthrobacter globiformis</i> (flu)	0,030640	Да
<i>Arthrobacter pascens</i> (flu)	0,008239	Да
<i>Arthrobacter pascens</i> (myc)	0,006486	Да
<i>Myxococcus</i> sp. (myc)	0,010406	Да
<i>Comamonas</i> sp. (flu)	0,688921	Нет
<i>Saccharomyces ludwigii</i> (flu)	0,065553	Нет
<i>Saccharomyces ludwigii</i> (myc)	0,471171	Нет
<i>Aureobasidium pullulans</i> (flu)	0,128206	Нет

Табл. 8. U критерий Манна-Уитни для штаммов MSU_FS-02110 и MSU_FS-01633 *A. parvulus*

Выводы

1. Выявлен спектр антагонистической активности 35-ти штаммов грибов рода *Aspergillus*, принадлежащих к 26-ти видами и 17-ти секциям, в отношении 15-ти тест-организмов. Все исследованные штаммы в той или иной мере проявили антагонистическую активность.
2. Показано, что 13 исследуемых штаммов проявляют высокую и умеренную антибиотическую активность по отношению к грамположительным бактериям, 5 штаммов – к грамотрицательным бактериям, а 10 штаммов проявляют высокую и умеренную антимикотическую активность против фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum*.
3. Наиболее антагонистически активными среди всех исследованных видов грибов в отношении фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum* являются виды *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. terreus* и *A. fumigatus*. Рекомендуется использовать их в дальнейшем для выделения веществ, контролирующих развитие этого гриба.

4. Для выделения веществ, ингибирующих рост грамположительных бактерий, рекомендуются виды *A. tamarii*, *A. parvulus*, *A. flavipes*, *A. janus*, *A. clavatus*, *A. neoflavipes*, *A. fumigatus* и *A. amstelodami*.

5. Установлено, что штаммы одного вида, обитающие в различных географических зонах, могут демонстрировать существенные различия в спектре угнетаемых тест-объектов, а также интенсивности их угнетения. Следовательно, антагонистическую активность каждого интересующего штамма нужно изучать индивидуально.

6. По результатам данного исследования вьетнамские штаммы проявляют в отношении некоторых тест-объектов большую активность, чем российские штаммы того же вида.

Спасибо за внимание!

