

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ТРИЧ

Екатерина Сергеевна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ДЕТЕРМИНАНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СИНТЕЗ ЦИТОХРОМОВ P450
У БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ar

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор М. А. Титок

Минск, 2021

АННОТАЦИЯ

Объекты исследования: бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, деградирующие широкий спектр органических соединений.

Цель: молекулярно-генетический и функциональный анализ детерминант, определяющих синтез цитохромов P450 у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), генетические (трансформация, конъюгация и мутагенез), молекулярно-генетические (выделение ДНК, рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция, полимеразная цепная реакция в реальном времени, клонирование) и информативные.

В результате проведенного исследования установлено, что в геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap присутствует 17 открытых рамок считывания (15 хромосомных и 2 плазмидных), способных определять синтез цитохромов P450. Среди исследованных генетических детерминант выявлены уникальные нуклеотидные последовательности хромосомного (*orf798* и *orf4743*) и плазмидного происхождения (*orf104*), которые могут быть использованы в качестве маркеров для молекулярного типирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap. Показано, что в составе цитохромов P450 присутствуют функциональные домены, определяющие процессы окисления углеводов и синтез вторичных метаболитов. Кроме того в составе цитохрома P450, кодируемого функционально активным геном *orf4097* (показано с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени) обнаружен характерный для фталатдиоксигеназ PDR-домен. В результате направленного мутагенеза отобран штамм с нарушенным геном *orf4097*, детерминирующим синтез цитохрома P450. Установлено, что мутация в гене *orf4097* не влияла на жизнеспособность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap и на деградацию отдельных алифатических (гексадекан, октан, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан), моноциклических (о-ксилол и бензол) и ароматических (нафталин, 2-метилнафталин, пирен и флюорен) углеводов, комплексных соединений (керосин и дизель) и некоторых органических субстратов (фенол и ацетон). В то же время нарушение в гене *orf4097* приводило к снижению эффективности утилизации дибутилфталата бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap (при концентрации дибутилфталата 0,1% и 0,2% эффективность утилизации относительно исходного штамма снижалась в 1,3 и 1,2 раза соответственно). Показано, что утилизация дибутилфталата определяется ферментами, синтез которых детерминирован нафталиновой плазмидой pRh5Ap-207 (при концентрации дибутилфталата 0,1% и 0,2% эффективность утилизации бесплазмидного штамма относительно исходных бактерий снижалась в 7 и 3 раза соответственно).

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЁНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

ТРЫЧ

Кацярына Сяргееўна

МАЛЕКУЛЯРНА-ГЕНЕТЫЧНЫ І ФУНКЦЫЯНАЛЬНЫ АНАЛІЗ
ДЭТЭРМІНАНТ, ЯКІЯ ВЫЗНАЧАЮЦЬ СІНТЭЗ ЦЫТАХРОМАЎ P450 У
БАКТЭРЫЙ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
Доктар біялагічных навук,
прафессар М.А. Ціток

Мінск, 2021

АНАТАЦЫЯ

Аб'екты даследвання: бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap, якія здольны дэградаваць шырокі спектр арганічных сродкаў.

Мэта: малекулярна-генетычны і функцыянальны аналіз дэтэрмінант, якія вызначаюць сінтэз цытахромаў P450 у бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap.

Метады даследвання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), генетычныя (трансфармацыя, кан'югацыя і мутагенез), малекулярна-генетычныя (вылучэнне ДНК, рэстрыкцыйны аналіз, палімеразная ланцуговая рэакцыя, палімеразная ланцуговая рэакцыя ў рэальным часе, кланаванне) і інфармацыйныя.

У выніку праведзенага даследвання ўстаноўлена, што ў геноме бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap прысутнічае 17 адкрытых рамак счытвання (15 храмасомных і 2 плазмідных), здольных вызначаць сінтэз цытахромаў P450. Сярод даследаваных генетычных дэтэрмінант выяўлены ўнікальныя нуклеатыдныя паслядоўнасці храмасомнага (*orf798* і *orf4743*) і плазміднага паходжання (*orf104*), якія могуць быць выкарастаны ў якасці маркераў для малекулярнага тыпавання бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap. Паказана, што ў складзе цытахромаў P450 прысутнічаюць функцыянальныя дамены, якія вызначаюць працэсы акіслення вуглевадародаў і сінтэз другасных метабалітаў. Акрамя таго, у складзе цытахрома P450, кадаванага функцыянальна актыўным генам *orf4097* (паказана з выкарыстаннем палімеразнай ланцуговай рэакцыі ў рэальным часе), знойдзены характэрны для фталатдыоксігеназ PDR-дамен. У выніку накіраванага мутагенезу адабраны штам з парушаным генам *orf4097*, дэтэрмінуючым сінтэз цытахрома P450. Устаноўлена, што мутацыя ў гене *orf4097* не ўплывала на жыццяздольнасць бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap і на дэградацыю асобных аліфатычных (гексадэкан, актан, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметылнанан), монацыкличных (о-ксилол і бензол) і араматычных (нафталин, 2-метылнафталін, пірэн і флюарэн) вуглевадародаў, комплексных злучэнняў (керасін і дызель) і некаторых арганічных субстратаў (фенол і ацэтон). У той жа час парушэнне у гене *orf4097* прыводзіла да зніжэння эфектыўнасці утылізацыі дыбутылфталата бактэрыямі *R. pyridinivorans* 5Ap (пры канцэнтрацыі дыбутылфталата 0,1% і 0,2% эфектыўнасць утылізацыі адносна зыходнага штаму зніжалася ў 1,3 і 1,2 разы адпаведна). Паказана, што утылізацыя дыбутылфталата вызначаецца ферментамі, сінтэз якіх дэтэрмінаваны нафталінавай плазмідай pRh5Ap-207 (пры канцэнтрацыі дыбутылфталата 0,1% і 0,2% эфектыўнасць утылізацыі бесплазміднага штаму адносна зыходных бактэрыі зніжалася ў 7 і 3 разы адпаведна).

MINISTRY OF EDUCATION REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
BIOLOGICAL FACULTY
Microbiology department

Ekaterina Sergeevna

Trich

**MOLECULAR-GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF
DETERMINANTS DEFINE SYNTHESIS OF CYTOCHROMES P450 IN
BACTERIA *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP**

Scientific supervisor:
Doctor of Biological Sciences,
Professor Titok M.A.

Minsk, 2021

ABSTRACT

Research objects: bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap, degrading a wide range of organic compounds.

Purpose of research: molecular-genetic and functional analysis of determinants define synthesis of cytochromes P450 in bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganisms), genetic (transformation, conjugation and mutagenesis), molecular-genetic (DNA extraction, restriction analysis, polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, cloning) and informative methods.

As a result of the study, it was found the genome of bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap contains 17 open reading frames (15 chromosomal and 2 plasmid) capable of defining the synthesis of cytochromes P450. Among the studied genetic determinants unique nucleotide sequences of chromosomal (*orf798* and *orf4743*) and plasmid origin (*orf104*) were identified. They can be used as markers for molecular typing of bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap. It was shown the composition of cytochromes P450 contains functional domains that determine the processes of oxidation of hydrocarbons and the synthesis of secondary metabolites. In addition, a PDR-like domain was found in the cytochrome P450 encoded by functionally active gene *orf4097* (it was shown with the help of real-time polymerase chain reaction). This PDR-like domain is characteristic of phthalate dioxygenases. As a result of directed mutagenesis a strain with a disrupted gene *orf4097* which determines the synthesis of cytochrome P450 was selected. It was found that the mutation in the *orf4097* gene has no effect on viability of bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap and the degradation of individual aliphatic (hexadecane, 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane), monocyclic (o-xylene and benzene) and aromatic (naphthalene, 2-methylnaphthalene, pyrene and fluorine) hydrocarbons, complex compounds (kerosene and diesel) and some organic substrates (phenol and acetone). At the same time, the disruption in the *orf4097* gene led to decrease of the efficiency of dibutyl phthalate utilization by bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap (at a dibutyl phthalate concentration of 0,1% and 0,2%, the utilization efficiency relative to the origin stain decreased in 1,3 and 1,2 times, accordingly). It was shown that the utilization of dibutyl phthalate is determined by enzymes whose synthesis is determined by the naphthalene plasmid pRh5Ap-207 (at a dibutyl phthalate concentration of 0,1% and 0,2%, the efficiency of utilization of the plasmid-free stain relative to origin bacteria decreased by 7 and 3 times, accordingly).