

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ГУРИНОВИЧ Анастасия Сергеевна

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ PBS72 ПРИРОДНЫХ
БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Аннотация к магистерской диссертации
по специальности 1-31 80 12 «Микробиология»

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

Минск, 2020

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Дипломная работа 72 с., 25 рис., 16 табл., 54 источников.

ПЛАЗМИДА, ГЕНОМ, REP-БЕЛОК, РЕЛАКСАЗА, СТРЕСС.

Объект исследования: плазида рBS72.

Цель: изучить особенности генетической организации плазмиды рBS72 и её влияние на жизнеспособность бактерий *B. subtilis* в стрессовых условиях среды.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов), физические (спектрофотометрия), генетические (трансформация, конъюгация, направленный мутагенез), молекулярно-генетические (выделение ДНК, ПЦР, рестрикционный анализ, клонирование) и биоинформационные.

В результате проведенного исследования показано, что репликоны аналогичные плазмиде рBS72 выявляются с частотой 27 % в природных почвенных образцах, содержащих бактерии *B. subtilis*. Аминокислотная последовательность Rep-белка плазмиды рBS72 характеризуется 99 % сходством с полипептидами, синтез которых кодируется детерминантами, присутствующими в геномах бактерий *B. subtilis* (штаммы B4071, MB378, MB415, EH11, DH12), выделенных на территории Пакистана и Нидерландов из различных природных источников.

Анализ белка, кодируемого открытой рамкой считывания плазмиды рBS72, позволил заключить, что релаксаза (*orf37*) плазмиды рBS72, содержащая характерные аминокислотные остатки в пределах функциональных доменов (тирозин, серин и гистидин), относится к семейству MobL. Анализ полной нуклеотидной последовательности плазмиды рBS72 размером 102 254 п.н. помимо генов, определяющих репликацию и конъюгацию, позволил выявить генетические детерминанты, обеспечивающие синтез белков, обладающих способностью участвовать в процессах жизнедеятельности бактериальной клетки.

Для изучения роли плазмидных и хромосомных генов в устойчивости бактерий к стрессу получен бесплазмидный штамм природных бактерий *B. subtilis* 72 и коллекционный штамм *B. subtilis* 168, содержащий маркированную плазмиду рBS72. Установлено, что в кислой среде (рН 4,5) жизнеспособность бесплазмидных бактерий *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* 72 относительно плазмидсодержащих вариантов снижалась в 4,7 и 1,7 раза, в щелочной в 1,94 и 1,75 раз, а в среде, содержащей 13 % NaCl, – в 13 и 4,5 раза соответственно. Показано, что после воздействия ультрафиолетом на бактерии *B. subtilis* 168 и *B. subtilis* 72 жизнеспособность снизилась в 4,5 и 3,5 раза. При воздействии высоких температур выживаемость плазмидного варианта штамма *B. subtilis* 72 возросла в 1,8 раз.

АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА ПРАЦЫ

Дыпломная праца 72 с., 25 мал., 16 табл., 54 крыніцы.

ПЛАЗМІДА, ГЕНОМ, РЕР-БЯЛОК, РЕЛАКСАЗА, СТРЭС.

Аб'ект даследавання: плазмідна рBS72.

Мэта: вывучыць асаблівасці генетычнай арганізацыі плазміды рBS72 і яе ўплыў на жыццяздольнасць бактэрыі *B. subtilis* ў стрэсавых умовах асяроддзя.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), фізічныя (спектрафатометры), генетычныя (трансфармацыя, кан'югацыі, накіраваны мутагенез), малекулярна-генетычныя (вылучэнне ДНК, палімеразная ланцуговая рэакцыя, рэстрыкцыйны аналіз, кланаванне) і біяінфармацыйныя.

У выніку праведзенага даследавання паказана, што рэпліконы аналагічныя плазмідзе рBS72 выяўляюцца з частатой 27% у прыродных глебавых узорах, якія змяшчаюць бактэрыі *B. subtilis* (бактэрыі *B. subtilis* выяўлены ў 22 узорах з 36 даследаваных). Амінакіслотны паслядоўнасць Рер-бялка плазміды рBS72 характарызуецца 99% падабенствам з поліпептыдамі, сінтэз якіх кадуецца дэтэрмінантамі, прысутнымі ў геному бактэрыі *B. subtilis* (штамы В4071, МВ378, МВ415, ЕН11, ДН12), выдзеленых на тэрыторыі Пакістана і Нідэрландаў з розных прыродных крыніц.

Аналіз бялку, кадаваных адкрытай рамкай счытвання плазміды рBS72, дазволіў заключыць, што рэлаксаза (*orf37*) плазміды рBS72, якая змяшчае характэрныя амінакіслотныя астаткі ў межах функцыянальных даменаў (тыразін, серын і гісцідзін), адносіцца да сямейства MobL. Аналіз поўнай нуклеатыднай паслядоўнасці плазміды рBS72 памерам 102 254 п.н. акрамя генаў, якія вызначаюць рэплікацыю і кан'югацыю, дазволіў выявіць генетычныя дэтэрмінанты, якія забяспечваюць сінтэз бялкоў, якія валодаюць здольнасцю ўдзельнічаць у працэсах жыццяздольнасці бактэрыяльнай клеткі.

Для вывучэння ролі плазмідных і храмасомных генаў ва ўстойлівасці бактэрыі да стрэсу атрыманы бесплазмідны штам прыродных бактэрыі *B. subtilis* 72 і калекцыйны штам *B. subtilis* 168, які змяшчае маркіраваную плазмідну рBS72. Устаноўлена, што ў кіслым асяроддзі (рН 4,5) жыццяздольнасць бесплазмідных бактэрыі *B. subtilis* 168 і *B. subtilis* 72 адносна плазміднаўтрымліваючых варыянтаў зніжалася ў 4,7 і 1,7 разы, у шчолачным ў 1,94 і 1,75 раза, а ў асяроддзі, якое змяшчае 13% NaCl, – у 13 і 4,5 раза адпаведна. Паказана, што пасля ўздзеяння ультрафіялетам на бактэрыі *B. subtilis* 168 і *B. subtilis* 72 жыццяздольнасць знізілася ў 4,5 і 3,5 разы. Пры ўздзеянні высокіх тэмператур выжывальнасць плазміднага варыянта штама *B. subtilis* 72 павялічылася ў 1,8 раза.

GENERAL DESCRIPTION OF WORK

The thesis is 72 pages, 25 fig., 16 tab., 54 sources.

PLASMID, GENOME, REP-PROTEIN, RELAXASES, STRESS.

Object of study: plasmid pBS72.

Objective: to study the features of the genetic organization of the plasmid pBS72 and its effect on the viability of *B. subtilis* bacteria under stressful environmental conditions.

Research methods: microbiological (cultivation of micro-organisms), physical (spectrophotometry), genetic (transformation, conjugation, directed mutagenesis), molecular genetic (DNA isolation, polymerase chain reaction, restriction analysis, cloning) and bioinformation.

As a result of the study, it was shown that replicons similar to plasmid pBS72 are detected with a frequency of 27% in natural soil samples containing *B. subtilis* bacteria (*B. subtilis* bacteria were detected in 22 samples out of 36 studied). The amino acid sequence of the Rep protein of plasmid pBS72 is 99% similar to polypeptides, the synthesis of which is encoded by determinants present in the *B. subtilis* bacterial genomes (strains B4071, MB378, MB415, EH11, DH12) isolated in Pakistan and the Netherlands from various natural sources.

Analysis of the protein encoded by the open reading frame of plasmid pBS72 allowed us to conclude that the relaxase (*orf 37*) of plasmid pBS72 containing the characteristic amino acid residues within the functional domains (tyrosine, serine, and histidine) belongs to the MobL family. Analysis of the complete nucleotide sequence of plasmid pBS72 of size 102 254 bp in addition to the genes that determine replication and conjugation, he revealed genetic determinants that provide the synthesis of proteins that have the ability to participate in the processes of bacterial cell activity.

To study the role of plasmid and chromosomal genes in the resistance of bacteria to stress, a plasmid-free strain of natural bacteria *B. subtilis* 72 and a collection strain of *B. subtilis*168 containing the marked plasmid pBS72 were obtained. It was found that in an acidic medium (pH 4.5), the viability of plasmid-free bacteria *B. subtilis*168 and *B. subtilis* 72 relative to plasmid-containing variants decreased 4.7 and 1.7 times, in alkaline 1.94 and 1.75 times, and in a medium containing 13% NaCl, 13 and 4.5 times, respectively. It was shown that after ultraviolet exposure to bacteria *B. subtilis*168 and *B. subtilis* 72, viability decreased by 4.5 and 3.5 times. When exposed to high temperatures, the survival of the plasmid variant of the strain *B. subtilis* 72 increased by 1.8 times.