

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра микробиологии**

РАТНИКОВА Мария Сергеевна

**РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ**  
**В СИНТЕЗЕ ТРЕГАЛОЛИПИДОВ**  
**У БАКТЕРИЙ *R. QINGSHENGII***

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

Магистерская работа: 87 с., 28 рис., 11 табл., 81 источник (включая 4 публикации магистранта).

**Ключевые слова:** *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus qingshengii*, трегалолипиды, алкан-1-монооксигеназа, видовая идентификация, рестрикционный анализ.

**Объект исследования:** бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii*.

**Цель:** поиск и видовая идентификация природных бактерий рода *Rhodococcus*, способных эффективно продуцировать поверхностно-активные вещества, и изучение роли отдельных генетических детерминант в синтезе трегалолипидов у бактерий этой таксономической группы.

**Методы исследования:** микробиологические (культивирование микроорганизмов), физические (спектрофотометрия, измерение поверхностного натяжения), генетические (трансформация, конъюгация, направленный мутагенез), молекулярно-генетические (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, клонирование), биохимические (экстракция веществ) и биоинформационные.

В результате проведенного исследования разработаны молекулярно-генетические подходы для выявления и идентификации полиморфных природных бактерий рода *Rhodococcus* (выявлены новые генетические маркеры (*rpoC*, *alkB3*, *alkB5*), пригодные для идентификации бактерий *R. erythropolis* и близкородственного вида *R. qingshengii*). Полученные данные позволили реидентифицировать штамм *R. erythropolis* A29-k1 и идентифицировать штамм A52-5 как *R. qingshengii*. Среди ранее и вновь идентифицированных природных бактерий рода *Rhodococcus* выявлен штамм *R. qingshengii* A29-k1, эффективно продуцирующий экзоклеточные и связанные с клетками поверхностно-активные соединения. В результате направленного мутагенеза отобраны рифампицинрезистентные варианты бактерий *R. qingshengii* A29-k1 с нарушенными генами *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, *alkB5*, кодирующими синтез алкан-1-монооксигеназ. С использованием оптимизированного спектрофотометрического метода определена концентрация трегалолипидов, синтезируемых исходными и мутантами бактериями *R. qingshengii* A29-k1. Впервые установлено, что у рифампицинрезистентных мутантов синтез трегалолипидов увеличивается в 2 раза. Показано, что мутации в генах *alkB1*, *alkB2* и *alkB4* приводят к снижению продукции трегалолипидов (на 43, 29 и 26 % соответственно), тогда как продукт гена *alkB3* не оказывает влияния на их синтез.

Показано, что у бактерий, устойчивых к рифампицину, и мутантов с нарушенными генами *alkB1* и *alkB4* степень гидрофобности клеточной поверхности снижается (на 9, 11 и 6 % соответственно), а у мутантов с инактивированными генами *alkB2* и *alkB3* соответствует штамму дикого типа.

## АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА РАБОТЫ

Магістэрская работа: 87 с., 28 мал., 11 табл., 81 крыніца (у тым ліку 4 публікацыі магістранта).

**Ключавыя словы:** *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus qingshengii*, трэгалаліпіды, алкан-1-монааксігеназа, відавая ідэнтыфікацыя, рэстрыкцыёны аналіз.

**Аб'ект даследавання:** бактэрыі *R. erythropolis* і *R. qingshengii*.

**Мэта:** пошук і відавая ідэнтыфікацыя прыродных бактэрыі роду *Rhodococcus*, здольных эфектыўна прадукцыяваць паверхнева-актыўныя рэчывы, і вывучэнне ролі асобных генетычных дэтэрмінант у сінтэзе трэгалаліпідаў у бактэрыі гэтай таксанамічнай групы.

**Метады даследавання:** мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў), фізічныя (спектрафотаметрыя, вымярэнне паверхневага нацяжэння), генетычныя (трансфармацыя, кан'югацыя, накіраваны мутагенэз), малекулярна-генетычныя (выдзяленне ДНК, палімеразная ланцужковая рэакцыя, рэстрыкцыённы аналіз, кланіраванне), біяхімічныя (экстракцыя рэчываў) і біяінфармацыйныя.

У выніку праведзенага даследавання распрацаваны малекулярна-генетычны падыходы для выяўлення і індэтыфікацыі паліморфных прыродных бактэрыі роду *Rhodococcus* (выяўлены новыя генетычныя маркеры (*rpoC*, *alkB3*, *alkB5*), прыдатныя для ідэнтыфікацыі бактэрыі *R. erythropolis* і блізкароднаснага віду *R. qingshengii*). Атрыманыя дадзеныя дазволілі рэідэнтыфікаваць штаб *R. erythropolis* A29-k1 і ідэнтыфікаваць штаб A52-5 як *R. qingshengii*. Сярод раней і зноў ідэнтыфікаваных прыродных бактэрыі роду *Rhodococcus* выяўлены штаб *R. qingshengii* A29-k1, які эфектыўна прадукцыюе экзаклетачныя і звязаныя з клеткамі паверхнева-актыўныя рэчывы. У выніку накіраванага мутагенезу адабраны рыфампіцынрэзістэнтныя варыянты бактэрыі *R. qingshengii* A29-k1 з парушанымі генамі *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, *alkB5*, якія кадзіруюць сінтэз алкан-1-монааксігеназ. З дапамогай аптымизаванага спектрафотаметрычнага метаду вызначана канцэнтрацыя трэгалаліпідаў, якія сінтэзуюць зыходныя і мутантныя бактэрыі *R. qingshengii* A29-k1. Упершыню выяўлена, што ў мутантаў, устойлівых да рифампіцыну, сінтэз трэгалаліпідаў павялічваецца ў 2 разы. Устаноўлена, што мутацыі ў генах *alkB1*, *alkB2* і *alkB4* прыводзяць да зніжэння прадукцыі трэгалаліпідаў (на 43, 29 і 26 % адпаведна), у той час як прадукт гена *alkB3* не ўрльвае на іх сінтэз. Выяўлена, што ў бактэрыі, устойлівых да рифампіцыну, і мутантаў з парушанымі генамі *alkB1* і *alkB4* ступень гідрафобнасці клетачнай

паверхні зніжаецца (на 9, 11 і 6 % адпаведна), а ў мутантаў з інактыраванымі генамі *alkB2* і *alkB3* адпавядае штаму дзікага тыпу.

## GENERAL DESCRIPTION OF WORK

Master's thesis: 87 p., 28 fig., 11 tables, 81 sources (including 4 master's publications).

**Key words:** *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus qingshengii*, trehalolipids, alkane-1-monooxygenase, species identification, restriction analysis.

**The object of the research:** *R. erythropolis* and *R. qingshengii* bacteria.

**The aim of the research:** the search and species identification of natural *Rhodococcus* bacteria capable of efficiently producing surfactants, and studying the role of particular genetic determinants in the synthesis of trehalolipids in bacteria of this taxonomic group.

**The research methods:** microbiological (cultivation of microorganisms), physical (spectrophotometry, measurement of surface tension), genetic (transformation, conjugation, directed mutagenesis), molecular-genetic (DNA extraction, polymerase chain reaction, restriction analysis, cloning), biochemical (extraction of substances) and bioinformational techniques.

As a result of the study, molecular genetic approaches to detect and identify polymorphic natural bacteria of *R. erythropolis* were developed (new genetic markers (*rpoC*, *alkB3*, *alkB5*) were identified as are suitable for identification of bacteria *R. erythropolis* and closely related species *R. qingshengii*). The data obtained allowed us to re-identify the strain *R. erythropolis* A29-k1 and identify the strain A52-5 as *R. qingshengii*. Among the previously and newly identified natural bacteria *Rhodococcus*, the strain *R. qingshengii* A29-k1 effectively producing exocellular and cell-binding surfactants was detected. As a result of directed mutagenesis, rifampicin-resistant variants of *R. qingshengii* A29-k1 bacteria with inactivated *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4*, *alkB5* genes encoding the synthesis of alkane-1-monooxygenases were selected. Using the optimized spectrophotometric method, the concentration of trehalolipids synthesized by the natural and mutant bacteria *R. qingshengii* A29-k1 was determined. First it has been shown that the synthesis of trehalolipids by rifampicin-resistant mutants is increased by 2 times. Also it has been shown that mutations in the *alkB1*, *alkB2* and *alkB4* genes lead to reduction of the production of trehalolipids (by 43, 29 and 26 %, respectively), while the *alkB3* gene product has no effect on their synthesis. It has been shown that the degree of cell surface hydrophobicity decreases in bacteria resistant to rifampicin and mutants with inactivated *alkB1* and *alkB4* genes (by 9, 11 and 6 %, respectively), while in mutants with inactivated *alkB2* and *alkB3* genes it corresponds to the level of a wild-type strain.