

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

КОВАЛЕВ

Евгений Александрович

ДЕГРАДАЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
БАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCUS*

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
доцент кафедры микробиологии,
кандидат биологических наук
М.И. Чернявская

Минск, 2020

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа 73 с., 10 табл., 19 рис., 31 источник.

БИОДЕГРАДАЦИЯ, БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ, *RHODOCOCCLUS*, АРОМАТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, НАФТАЛИН, ПЛАЗМИДА, БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ, МИНИ-РЕПЛИКОН

Объекты исследования: бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar дикого типа и полученные на их основе мутантные варианты; нуклеотидная последовательность плазмиды биодegradации нафталина pNAPH бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar.

Цель: изучение способности бактерий рода *Rhodococcus* к деградации ароматических соединений на примере нафталина, а также биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей плазмиды биодegradации нафталина.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, построение и анализ кривых роста); молекулярно-биологические (электрофорез в агарозном геле, выделение тотальной и плазмидной ДНК, ПЦР, рестрикция, лигирование, электротрансформация); биоинформационный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

В результате проведенных исследований установлено, что отсутствие в клетках бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar плазмиды биодegradации нафталина pNAPH определяет полную утрату способности к деградации оногo, тогда как инактивация ключевого гена деградации нафталина (*narAa*) так же, как и генов *alkB* (кодирует алканмонооксигеназу, определяет способность синтезировать ПАВ) и *sid* (детерминирует биосинтез сидерофоров) приводит лишь к снижению скорости роста на данном субстрате. Выявлено наличие на плазмиде pNAPH альтернативного пути биодegradации нафталина.

Аннотировано 70 генов плазмиды биодegradации нафталина pNAPH. Проведен филогенетический анализ для продуктов ключевых генов деградации нафталина (*narC*, *narB*, *narAb*, *narAa*), репликации (*repAB*), конъюгации (*traA*) и ключевых генов деградации дибензофурана, которые также могут определять и окисление нафталина. Наиболее сходные гомологичные белки обнаруживаются у различных видов рода *Rhodococcus*.

Получен мини-репликон плазмиды деградации нафталина на основе плазмидного вектора pK18mob и *rep*-области указанной плазмиды. Изолированный минирепликон может послужить основной для создания векторов для работы с бактериями рода *Rhodococcus* и представителями близких таксономических групп.

МІНІСТЭРСТВА АДУКАЦЫІ РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ
БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ЎНІВЕРСІТЭТ
БІЯЛАГІЧНЫ ФАКУЛЬТЭТ
Кафедра мікрабіялогіі

КАВАЛЁЎ

Яўген Аляксандравіч

ДЭГРАДАЦЫЯ АРАМАТЫЧНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ БАКТЭРЫЯМІ
РОДУ *RHODOCOCCUS*

Анатацыя да дыпломнай працы

Навуковы кіраўнік:
дацэнт кафедры мікрабіялогіі,
кандыдат біялагічных навук
М.І. Чарняўская

Мінск, 2020

АНАТАЦЫЯ

Дыпломная праца 73 с., 10 табл., 19 мал., 31 крыніца.

БІЯДЭГРАДАЦЫЯ, БАКТЭРЫІ-ДЭСТРУКТАРЫ, *RHODOCOCCLUS*, АРАМАТЫЧНЫЯ ЗЛУЧЭННІ, НАФТАЛІН, ПЛАЗМІДА, БІЯІНФАРМАЦЫЙНЫ АНАЛІЗ, МІНІ-РЭПЛІКОН

Аб'екты даследавання: бактэрыі *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap дзікага тыпу і атрыманыя на іх аснове мутантныя варыянты; нуклеатыдная паслядоўнасць плазміды биядэградацыі нафталіну pNAPH бактэрыі *R. pyridinivorans* 5Ap.

Мэта: вывучэнне здольнасці бактэрыі роду *Rhodococcus* да дэградацыі араматычных злучэнняў на прыкладзе нафталіну, а таксама біяінфармацыйны аналіз нуклеатыдных паслядоўнасцяў плазміды биядэградацыі нафталіну.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, пабудова і аналіз крывых росту); малекулярна-біялагічныя (электрафарэз ў агарозном гелі, вылучэнне татальнай і плазміднай ДНК, ПЛР, рэстрыкцыя, лігіраванне, электратрансфармацыя); біяінфармацыйны аналіз нуклеатыдных і амінакіслотных паслядоўнасцяў.

У выніку праведзеных даследаванняў выяўлена, што адсутнасць у клетках бактэрыі *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap плазміды биядэградацыі нафталіну pNAPH вызначае поўную страту здольнасці да яго дэградацыі, у той час як інактывацыя ключавога гена дэградацыі нафталіну (*narAa*), як і генаў *alkB* (кадзіруе алканмонааксігеназу, вызначае здольнасць сінтэзаваць ПАР) і *sid* (дэтэрмінуе біясінтэз сідзерафораў) прыводзіць толькі да зніжэння хуткасці росту на гэтым субстраце. Выяўлена наяўнасць на плазмідзе pNAPH альтэрнатыўнага шляху биядэградацыі нафталіну.

Анатавана 70 генаў плазміды биядэградацыі нафталіну pNAPH. Праведзены філагенетычны аналіз для прадуктаў ключавых генаў дэградацыі нафталіну (*narC*, *narB*, *narAb*, *narAa*), рэплікацыі (*repAB*), кан'югацыі (*traA*) і ключавых генаў дэградацыі дзібензафурана, якія таксама могуць абумоўліваць і акісленне нафталіну. Найбольш падобныя гамалагічныя бялкі выяўляюцца ў розных відаў роду *Rhodococcus*.

Атрыманы міні-рэплікон плазміды дэградацыі нафталіну на аснове плазміднага вектара pK18mob і гер-вобласці плазміды pNAPH. Ізаляваны міні-рэплікон можа паслужыць як асноўва для стварэння вектараў для працы з бактэрыямі роду *Rhodococcus* і прадстаўнікамі блізкіх таксонамічных груп.

MINISTRY OF EDUCATION OF THE REPUBLIC OF BELARUS
BELARUSIAN STATE UNIVERSITY
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Microbiology

KOVALEV

Evgeny Alexandrovich

**DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS BY BACTERIA OF
THE GENUS RHODOCOCCUS**

Abstract to graduate work

Scientific adviser:

Associate Professor, Department of
Microbiology,

Candidate of Biological Sciences

M.I. Charniauskaya

Minsk, 2020

ANNOTATION

Thesis 73 p., 10 tab., 19 fig., 31 sources.

BIODEGRADATION, DESTRUCTOR BACTERIA, *RHODOCOCCUS*, AROMATIC COMPOUNDS, NAPHTHALINE, PLASMID, BIOINFORMATION ANALYSIS, MINI REPLICON

Objects of research: natural bacteria *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap and its mutant variants obtained on their basis; The nucleotide sequence of the naphthalene biodegradation pNAPH plasmid of bacteria *R. pyridinivorans* 5Ap.

Objective: to study the ability of bacteria of the genus *Rhodococcus* to degrade aromatic compounds using naphthalene as an example, as well as bioinformation analysis of the nucleotide sequences of the naphthalene biodegradation plasmid.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganisms, construction and analysis of growth curves); molecular biological (electrophoresis in agarose gel, isolation of total and plasmid DNA, PCR, restriction, ligation, electrotransformation); bioinformation analysis of nucleotide and amino acid sequences.

As a result of the studies, it was found that the absence of the naphthalene biodegradation pNAPH plasmid in the bacterium *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap cells determines the complete loss of the ability to degrade it, whereas the inactivation of the key naphthalene degradation gene (*narAa*) as well as the *alkB* genes (encodes alkane monooxygenase determines the ability to produce surfactants) and *sid* (determines the biosynthesis of siderophores) only leads to a decrease in the growth rate on this substrate. The presence of an alternative pathway of naphthalene biodegradation on pNAPH plasmid was detected.

70 genes of the plasmid biodegradation of naphthalene pNAPH have been annotated. Phylogenetic analysis has been performed for the products of the key genes for the degradation of naphthalene (*narC*, *narB*, *narAb*, *narAa*), replication (*repAB*), conjugation (*traA*), and the key genes for the degradation of dibenzofuran, which can also determine the oxidation of naphthalene. The most similar homologous proteins are found in various species of the genus *Rhodococcus*.

A minireplicon of the naphthalene degradation plasmid was obtained based on the pK18mob plasmid vector and the rep region of the indicated plasmid. An isolated minireplicon can serve as the main one for creating vectors for working with bacteria of the genus *Rhodococcus* and representatives of related taxonomic groups.