

**ПОИСК КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СИНТЕЗ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ
СВОЙСТВАМИ В ГЕНОМЕ ШТАММА
PSEUDOMONAS LUNDENSIS 2Т.2.5.2,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ВРЕМЕННЫХ ВОДОЕМОВ
НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ**

Акулова О.Д.¹, Валентович Л.Н.^{1,2}, Мямин В.Е.^{1,2}

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
olya-akylova@mail.ru*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Вторичные метаболиты бактерий широко используются в медицине и ветеринарии, сельском хозяйстве, промышленности и, как известно, опосредуют различные взаимодействия между микроорганизмами, а иногда также между микро- и макроорганизмами. Информация о генах, ответственных за образование вторичных метаболитов позволяет при анализе геномных данных предсказывать возможность синтеза новых биологически активных веществ изучаемыми бактериями [3]. В ряде исследований было показано, что экстремофилы представляют собой малоизученный но многообещающий источник новых антибактериальных средств [5].

Объектами нашей работы стали 33 бактериальных изолята, выделенные во время полевого сезона 5 Белорусской антарктической экспедиции в районе базирования полевой базы «Гора Вечерняя» (Восточная Антарктида, Земля Эндерби, оазис Холмы Тала, участок Вечерний) из временных водоёмов побережья бухты Лазурная, залив Алашеева, море Космонавтов, 67°39' ю. ш., 46°10' в. д. [2]. Определение продукции антибактериальных веществ было проведено с использованием метода «замедленного» антагонизма [1]. Антарктические изоляты действовали в качестве культур продуцентов противомикробного агента, а в качестве тест-культур использовали следующие бактерии: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* XL1-Blue, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 6531 и *Staphylococcus saprophyticus* BSU. Три изолята (1т.3.20.1, 2т.2.5.2 и 2т.5.20.1) проявили антагонистическую активность в отношении всех грамположительных бактерий рода *Staphylococcus*, отобранных для анализа (рис. 1). В отношении грамотрицательных бактерий активности не наблюдалось.

С целью молекулярно-генетической идентификации бактерий было проведено определение последовательности фрагмента гена 16S рРНК трех отобранных изолятов. С помощью программы «BLASTN 2.9.0» на сайте NCBI, проводили поиск в базах данных ГенБанка последовательностей, схожих с полученными участками генов 16S рРНК. Для визуализации генетических данных осуществляли построение филогенетического дерева в программе

MEGA 7.0 (рис. 2). Все анализируемые микроорганизмы оказались представителями класса *Gamma-proteobacteria*, и все три были идентичны по последовательности фрагмента гена 16S рРНК и близки к штамму *Pseudomonas lundensis* ATCC 49968 (99%).



Рисунок 1 – Зоны задержки роста бактерий *Staphylococcus aureus* 25925 в районе медальонов изолятов бактерий 2t.2.5.2, 2t.5.20.1 и 1t.3.20.1

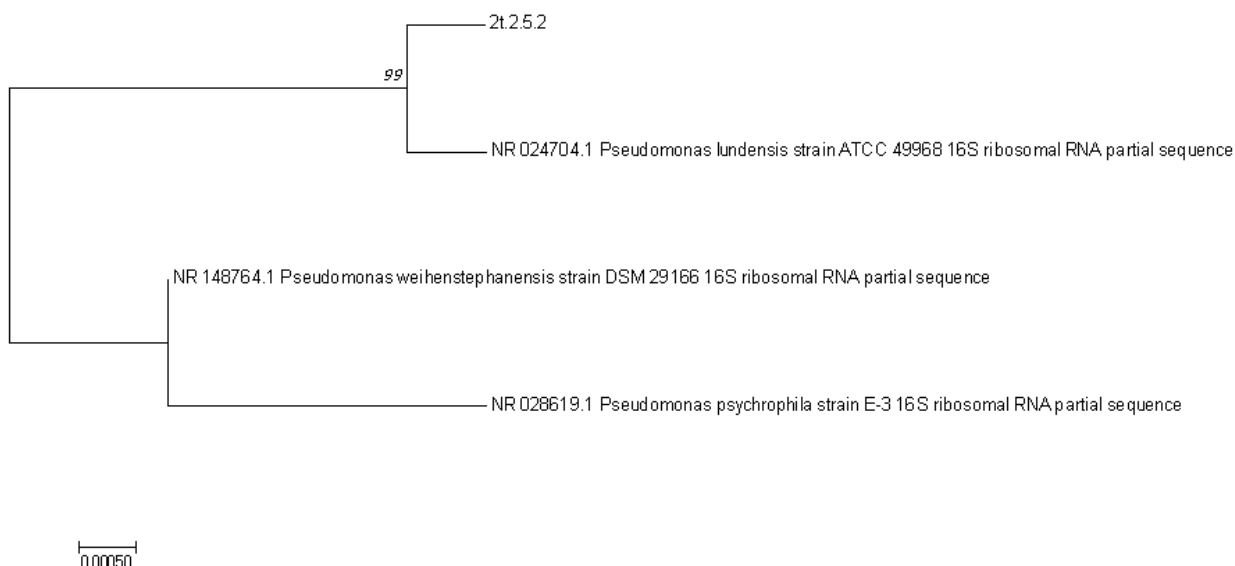


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное по методу максимального правдоподобия на основе последовательностей фрагмента гена 16S рРНК для штамма *Pseudomonas lundensis* 2t.2.5.2 и ближайших гомологов по базе данных BLAST, шкала соответствует 0,5% разнице в нуклеотидной последовательности.

После предварительной оценки был отобран один штамм *Pseudomonas lundensis* 2t.2.5.2, для проведения более детального изучения. Полногеномное определение нуклеотидной последовательности анализируемого штамма проводили с использованием методов компании Иллюмина (на приборе MiSeq) а также с применением технологии нанопорового секвенирования (на приборе MinION, Oxford Nanopore Technologies).

На следующем этапе работы проводили поиск генных кластеров, предположительно вовлеченных в синтез вторичных метаболитов в геноме штамма *Pseudomonas lundensis* 2t.2.5.2 с использованием программного продукта antiSMASH 5.0, который путем сканирования генома, детектирует известные кластеры генов, ответственных за образование вторичных метаболитов [3]. По предварительным данным были обнаружены следующие типы генных кластеров (табл. 1).

- гены нерибосомных пептид-синтетаз (НРПС);
- гены, кодирующие N-ацетилглутаминилглутаминамид (НАГГН) участвующий в адаптации к осмотическому стрессу;
- кластер синтеза бактериоцина или другого неуточненного рибосомно-синтезирующегося и посттрансляционно модифицированного пептидного продукта;
- арилполиеновый кластер (АПЕ), кодирующий бактериальные пигменты, которые отвечают за защиту бактерии от активных форм кислорода (подобно каротиноидам);
- кластер, кодирующий β -лактонсодержащий ингибитор протеазы.[4]

Таблица 1 – Выявленные регионы вторичных метаболитов

Регион №	Тип	Координаты		Наиболее похожий известный кластер, синтезирующий	Процент схожести
		От	До		
1	НРПС	219 586	281 574	Пиовердин	10%
2	НРПС	343 919	396 917	Пиовердин	9%
3	НАГГН	492 387	507 167		
4	Бактериоцин	1 083 810	1 094 837		
5	Арилполиен	2 627 810	2 671 405	АПЕ	40%
6	β -лактон	3 824 545	3 847 681	Фенгицин	20%

В ходе исследований была обнаружена антибактериальная активность трех изолятов *Pseudomonas lundensis* в отношении грамположительных бактерий рода *Staphylococcus* на твердой агаризованной среде. Механизм ингибирования роста на сегодняшний момент неясен, потому на следующем этапе планируется проведение направленного мутагенеза клеток изучаемого штамма для выявления генов, ответственных за синтез антибактериального вещества.

Литература

1. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987, с.341-343.
2. Мямин, В.Е. Физиолого-биохимическая характеристика бактерий, изолированных в участке вечерний оазиса холмы тала (восточная Антарктида) / В.Е. Мямин, С.К. Лозюк, А.В. Сидоренко, Л.Н. Валентович // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: мат. I международной науч.-практ. конф., к.п. Нарочь, 26 – 29 мая 2014 г. / Национальная академия наук Беларуси; редкол.: О.И. Бородин [и др.]. к.п. Нарочь, 2014. – С.193-197.
3. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline / K. Blin [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, № W1. – P. W81-W87.
4. Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters / P. Cimermancic [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 158, № 2. – P. 412-421.
5. Ravot, G. 34 Applications of Extremophiles: The Industrial Screening of Extremophiles for Valuable Biomolecules / G. Ravot, J.-M. Masson, F. Lefèvre // *Methods in Microbiology.* – Academic Press, 2006. – Vol. 35. – 34 Applications of Extremophiles. – P. 785-813.