

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра микробиологии

ПЕТРУША
Яна Владимировна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
АНАЛИЗ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ
СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Аннотация к магистерской диссертации

Специальность 1-31 80 12 «Микробиология»

Научный руководитель
Титок Марина Алексеевна
доктор биологических наук,
профессор

Минск, 2023

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Перечень ключевых слов: *BACILLUS*, CodY, КОНЪЮГАЦИЯ.

Объекты исследования: природные бактерии рода *Bacillus*.

Цель: установить возможность использования конъюгативной плазмиды pBS72 для введения векторов и изучения функциональной роли отдельных генов, определяющих практически важные свойства бактерий рода *Bacillus* (в частности, антимикробную активность).

Методы исследования: микробиологические (культивирование бактерий), физиолого-биохимические (ферментативная активность), генетические (конъюгация, электропорация), молекулярно-генетические (выделение ДНК, рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция, клонирование) и биоинформационные.

В результате проведенного исследования установлено, что исследованные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (*B. subtilis* d16, *B. velezensis* 7I3A, *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3, *B. aryabhattai*) являются перспективными объектами биотехнологии, обладающими высоким адаптивным потенциалом. Исследованные штаммы растут в широком диапазоне температур (от 18 до 55 °C), pH-среды (от 3 до 11), в присутствии NaCl (до 13 %). Штаммы *B. subtilis* d16, *B. velezensis* 7I3A характеризуются широким спектром ферментативных активностей (в частности, протеолитической, целлюлолитической, амилолитической и др.) и подавляют развитие патогенных грибов (от 5 до 7 видов) и бактерий (от 2 до 5 видов). Бактерии *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3 и *B. aryabhattai* утилизируют углеводороды (до 9 углеводородных субстратов).

Установлено, что в клетки всех исследованных бактерий можно вводить вектора с mobV-сайтом путем мобилизации плазмидой pBS72 (частота конъюгационного переноса составила от 10^{-7} до 10^{-4}).

В геноме бактерий *B. velezensis* 7I3A выявлены локусы, определяющие синтез антимикробных метаболитов (сурфактина, макролактина, фенгицина, диффицидина, бацилломицина, бациллибактина, бациллаена, бацилизина) и изолированы фрагменты гена *codY*, играющего роль в регуляции их синтеза. Введение вектора pKS1mob с клонированными фрагментами гена *codY* в клетки *B. velezensis* 7I3A путем мобилизации конъюгативной плазмидой pBS72 позволил с частотой 10^{-4} отобрать трансконъюганты, содержащие за счет инсерции гена канамидинрезистентности хромосомную мутацию. Отобранные мутанты являются основой для изучения роли гена *codY* в метаболизме бактерий *B. velezensis* 7I3A (в частности, в синтезе антимикробных метаболитов).

АГУЛЬНАЯ ХАРАКТЕРЫСТЫКА РАБОТЫ

Пералік ключавых слоў: *BACILLUS*, *CodY*, КАН'ЮГАЦЫЯ.

Аб'екты даследвання: прыродныя бактэрыі роду *Bacillus*.

Мэта: устанавіць магчымасць выкарыстання кан'югатыўнай плазміды pBS72 для увядзення вектараў і вывучэння функцыянальнай ролі асобных генаў, якія вызначаюць практычна важныя якасці бактэрыі роду *Bacillus* (у прыватнасці, антымیکробную актыўнасць).

Метады даследвання: мікрабіялагічныя (культывіраванне бактэрыі), фізіёлага-біяхімічныя (ферментатыўная актыўнасць), генетычныя (кан'югацыя, электрапарацыя), малекулярна-генетычныя (выдзяленне ДНК, рэстрыкцыйны аналіз, палімеразная ланцуговая рэакцыя, кланіраванне) і біяінфармацыйныя.

У выніку праведзенага даследвання вызначана, што даследаваныя спораўтвараючыя бактэрыі роду *Bacillus* (*B. subtilis* d16, *B. velezensis* 713A, *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3, *B. aryabhattai*) з'яўляюцца перспектыўнымі аб'ектамі біятэхналогіі, якія валодаюць высокім адаптыўным патэнцыялам. Даследвагыя штамы растуць у шырокім дыяпазоне тэмператур (ад 18 да 55 °C), pH-асяроддзя (ад 3 да 11), у прысутнасці NaCl (да 13%). Штамы *B. subtilis* d16, *B. velezensis* 713A характарызуюцца шырокім спектрам ферментатыўных актыўнасцей (у прыватнасці, протэалітычнай, цэлюлалітычнай, амілалітычнай і інш.) і падаўляюць развіццё патагенных грыбоў (ад 5 да 7 відаў) і бактэрыі (ад 2 да 5 відаў). Бактэрыі *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3 і *B. aryabhattai* утылізуюць вуглевадароды (да 9 вуглевадародных субстратаў).

Устаноўлена, што у клеткі ўсіх даследаваных бактэрыі можна ўводзіць вектары з *mobV*-сайтам шляхам мабілізацыі плазмідай pBS72 (частата кан'югацыйнага пнраносу склала ад 10^{-7} да 10^{-4}).

У геноме бактэрыі *B. velezensis* 713A выяўлены локусы, якія вызначаюць сінтэз антымیکробных метабалітаў (сурфактына, макралакціна, фенгіцына, дыфіцыдзіна, бацылібактына, бацылаена, бацілізіна) і ізаляваныя фрагменты гена *codY*, якія іграюць ролю у рэгуляцыі іх сінтэзу. Увядзенне вектару pKS1mob з кланіраванымі фрагментамі гена *codY* у клеткі *B. velezensis* 713A шляхам мабілізацыі кан'югатыўнай плазмідай pBS72 дазволіў з частатой 10^{-4} атабраць транскан'юганты, якія утрымліваюць за кошт інсерцыі гена канаміцынрэзістэнтнасці храмасомную мутацыю. Атабраныя мутанты з'яўляюцца асновай для вывучэння ролі гена *codY* у метабалізме бактэрыі *B. velezensis* 713A (ў прыватнасці, у сінтэзе антымیکробных метабалітаў).

GENERAL DESCRIPTION OF WORK

Keywords: *BACILLUS*, CodY, CONJUGATION.

Objects of study: natural bacteria of the genus *Bacillus*.

Objective: to check whether it is possible to use the conjugative plasmid pBS72 for vector transfer and studying of functional role of separate genes, that determine practically important properties of bacteria of the genus *Bacillus* (in particular, their antimicrobial activity).

Research methods: microbiological (cultivation of bacteria), physiological-biochemical (enzyme activity), genetic (conjugation, electroporation), molecular-genetic (DNA extraction, restriction analysis, polymerase chain reaction, cloning) and bioinformatic.

As a result of the research, it was established that examined spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* (*B. subtilis* d16, *B. velezensis* 7I3A, *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3, *B. aryabhattai*) are promising biotechnological objects, having a high adaptive potential. Examined strains grow in a wide temperature (from 18 to 55 °C), pH (from 3 to 11), NaCl (up to 13 %) ranges. Strains *B. subtilis* d16, *B. velezensis* 7I3A demonstrate a broad spectrum of enzyme activities (in particular, proteolytic, cellulolytic, amylolytic and others) and can inhibit growth of pathogenic fungi (from 5 to 7 species) and bacteria (from 2 to 5 species). Bacteria *B. licheniformis* FD9, *B. flexus* 6-3, and *B. aryabhattai* can utilize hydrocarbons (up to 9 types of hydrocarbon substrates).

We discovered, that it is possible to introduce mobV-site containing vectors by mobilization with the help of plasmid pBS72 into cells of all examined bacteria (the rate of conjugative transfer was from 10^{-7} to 10^{-4}).

The genome of *B. velezensis* 7I3A contained loci, responsible for the synthesis of antimicrobial metabolites (surfactin, macrolactin, fengycin, difficidin, bacillomycin, bacillaene, bacylisin). Fragments of gene *codY*, responsible for the regulation of their synthesis, were isolated. The introduction of pKS1mob vector with cloned fragments of gene *codY* into cells of *B. velezensis* 7I3A by mobilization with the conjugative plasmid pBS72 allowed to select the transconjugants, that contain mutation due to the insertion of kanamycin resistance gene in their chromosome, with the rate of 10^{-4} . The mutants are the basis for the research of the role of *codY* gene in the metabolism of bacteria *B. velezensis* 7I3A (in particular, its influence on the synthesis of antimicrobial metabolites).