

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

СОРОКА
Анна Андреевна

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS PUMILUS*

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
старший преподаватель кафедры
молекулярной биологии
К.Ю. Песоцкая

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 55 страниц, 20 рисунков, 8 таблиц, 37 источников.

Ключевые слова: *BACILLUS PUMILUS*, БАКТЕРИОФАГИ, ФАГОТЕРАПИЯ, ЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, СПЕКТ ЛИЗИСА, ФАГОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, МОРФОЛОГИЯ ФАГОВ, НУКЛИНОВАЯ КИСЛОТА, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.

Объект исследования: штаммы бактерии *Bacillus pumilus*, бактериофаги, инфицирующие *Bacillus pumilus*, нуклеиновая кислота бактериофагов, природные образцы (почва, вода)

Цель исследования: изучение биологических характеристик бактериофагов, инфицирующих клетки бактерий *Bacillus pumilus*, с целью расширения знаний об этой группе вирусов и возможности их использования для контроля заболеваний, вызываемых *Bacillus pumilus*.

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, выделение бактериофагов (с дополнительным использованием хлороформа или рифампицина) определение титра методом Грация, выявление частоты фагореистентных мутантов, определение спектра литического действия), молекулярно-генетические методы (ПДРФ-анализ, выделение нуклеиновой кислоты, электрофорез, ДСН-ПААГ электрофорез по Лэммли), методы статистической обработки данных.

В ходе работы было выделено четыре изолята бактериофагов, обладающих различной морфологией. Установлено, что бактериофаги, инфицирующие *B. pumilus*, характеризуются разным титром: $1,61 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактериофага SoA; $2,16 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактериофага ASor; $3,36 \times 10^9$ БОЕ/мл для бактериофага BiAs; $2,12 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактериофага РКР. Показано, что все исследуемые бактериофаги способны лизировать клетки *B. pumilus*, *B. subtilis*, при этом фаги SoA, ASor и BiAs так же проявили литическую активность в отношении *Serratia marcescens*.

Частота возникновения фагореистентных мутантов составила (в %) при обработке клеток суспензией бактериофага SoA: $6,5 \times 10^{-5}$ для *B. pumilus*, $6,5 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis* и $3,2 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*; суспензией бактериофага ASor: 6×10^{-5} для *B. pumilus*, $3,7 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis* и $9,2 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*; суспензией бактериофага BiAs: $5,2 \times 10^{-5}$ для *B. pumilus* и $5,1 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis*; суспензией бактериофага РКР: 6×10^{-5} для *B. pumilus*, 5×10^{-5} для *B. subtilis* и $4,9 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*.

Геном всех выделенных бактериофагов представлен дезоксирибонуклеиновой кислотой.

ПДРФ-анализ ДНК фагов SoA, ASor, BiAs и РКР показал следующее: при обработке ДНК фага BiAs ни одна из использованных рестриктаз не вызывала расщепления, что может указывать на отсутствие узнаваемых сайтов для данных ферментов; при обработке ДНК фага РКР рестриктазой *BstAF* — фрагменты длиной около 10 000 и 4 000 п.н.; при обработке ДНК фага SoA рестриктазой *EcoRV* — фрагменты по 8000 и 4000 п.н., *Psp24BI* — один фрагмент длиной около 7500 п.н., *Bru14I* — фрагмент длиной примерно 7900 п.н.; при обработке фага ASor рестриктазой *AclI* был выявлен фрагмент длиной около 8 000 п.н.

ДСН-ПААГ электрофорез выявил, что у образцов SoA и ASor основная интенсивная полоса наблюдается в области молекулярной массы около 90 кДа, тогда как у BiAs и РКР — около 45 кДа, что, вероятно, соответствует основному капсидному белку бактериофага. На геле визуализировались 3–4 чёткие полосы в каждой из исследуемых дорожек, что подтверждает неоднородность белкового состава выделенных фагов.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 55 старонак, 20 малюнкаў, 8 табліц, 37 крыніц.

Ключавыя словы: *Bacillus pumilus*, бактэрыяфагі, фагатэрапія, літычная актыўнасць, спектр лізісу, фагарэзістэнтнасць, морфалогія фагаў, нуклеінавая кіслата, біялагічныя ўласцівасці.

Аб'ект даследавання: штамы бактэрыі *Bacillus pumilus*, бактэрыяфагі, што інфіцыруюць *Bacillus pumilus*, нуклеінавая кіслата бактэрыяфагаў, прыродныя ўзоры (глеба, вада).

Мэта даследавання: вывучэнне біялагічных характарыстык бактэрыяфагаў, што інфіцыруюць клеткі бактэрыі *Bacillus pumilus*, з мэтай пашырэння ведаў пра гэтую групу вірусаў і магчымасці іх выкарыстання для кантролю захворванняў, выкліканых *Bacillus pumilus*.

Методы даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, вылучэнне бактэрыяфагаў з выкарыстаннем хлараформу або рыфампіцыну, вызначэнне тытру метадам Грацыя, выяўленне частаты фагарэзістэнтных мутантаў, вызначэнне спектру літычнага дзеяння), малекулярна-генетычныя метады (рэстрыкцыйны аналіз, вылучэнне фагавай ДНК, электрофарэз, бялковы электрофарэз), метады статыстычнай апрацоўкі дадзеных.

У ходзе даследавання былі вылучаны чатыры ізаляты бактэрыяфагаў з рознай морфалогіяй. Устаноўлена, што бактэрыяфагі, што інфіцыруюць *Bacillus pumilus*, характарызуюцца розным тытрам: $1,61 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактэрыяфага SoA; $2,16 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактэрыяфага ASor; $3,36 \times 10^9$ БОЕ/мл для бактэрыяфага BiAs; $2,12 \times 10^{11}$ БОЕ/мл для бактэрыяфага РКР. Паказана, што ўсе даследаваныя бактэрыяфагі здольныя лізіраваць клеткі *Bacillus pumilus* і *Bacillus subtilis*, прычым фагі SoA, ASor і BiAs таксама праявілі літычную актыўнасць у дачыненні да *Serratia marcescens*.

Выяўлена, што частата ўзнікнення фагарэзістэнтных мутантаў (%) для бактэрыяфага SoA склала $6,5 \times 10^{-5}$ для *B. pumilus*, $6,5 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis* і $3,2 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*; для бактэрыяфага ASor — 6×10^{-5} для *B. pumilus*, $3,7 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis* і $9,2 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*; для бактэрыяфага BiAs — $5,2 \times 10^{-5}$ для *B. pumilus* і $5,1 \times 10^{-5}$ для *B. subtilis*; для бактэрыяфага РКР — 6×10^{-5} для *B. pumilus*, 5×10^{-5} для *B. subtilis* і $4,9 \times 10^{-5}$ для *S. marcescens*.

Геном усіх вылучаных бактэрыяфагаў прадстаўлены дэзаксірыбануклеінавай кіслатой.

ПДРФ-аналіз ДНК фагаў SoA, ASor, BiAs і РКР паказаў наступнае: пры апрацоўцы ДНК фага BiAs ні адна рэстрыктаза не выклікала расшчаплення, што можа гаварыць аб адсутнасці сайтаў звязвання даных ферментаў; пры апрацоўцы ДНК фага РКР рэстрыктазай *BstAF* — фрагменты даўжынёй каля 10 000 і 4 000 п.н.; пры апрацоўцы ДНК фага SoA рэстрыктазай *EcoRV* — фрагменты даўжынёй каля 8 000 і 4 000 п.н., *Pspt24BI* — адзін фрагмент даўжынёй каля 7500 п.н., *Bpu14I* — фрагмент даўжынёй 7900 п.н.; пры апрацоўцы ДНК фага ASor рэстрыктазай *AclI* выяўлен фрагмент даўжынёй прыблізна 8 000 п.н.

ДСН-ПААГ электрофарэз выявіў, што ў узораў SoA і ASor асноўная інтэнсіўная паласа назіраецца ў вобласці малекулярнай масы каля 90 кДа, тады як у BiAs і РКР — каля 45 кДа, што, верагодна, адпавядае асноўнаму капсіднаму бялку бактэрыяфага. На гелі візуалізаваліся 3–4 выразныя паласы ў кожнай з даследаваных дарожак, што пацвярджае неаднароднасць бялковага складу вылучаных фагаў.

ABSTRACT

Diploma thesis, 55 pages, 20 figures, 8 tables, 37 sources.

Keywords: *Bacillus pumilus*, bacteriophages, phage therapy, lytic activity, lysis spectrum, phage resistance, phage morphology, nucleic acid, biological properties.

Object of research: *Bacillus pumilus* strains, bacteriophages infecting *Bacillus pumilus*, bacteriophage nucleic acid, environmental samples (soil, water).

Work purpose: To investigate the biological characteristics of bacteriophages infecting *Bacillus pumilus* cells in order to expand knowledge about this group of viruses and assess their potential application for controlling diseases caused by *Bacillus pumilus*.

Research methods: Microbiological methods: cultivation of microorganisms, isolation of bacteriophages (including protocols with chloroform or rifampicin), determination of phage titer using the Gratia method, detection of phage-resistant mutants, assessment of the lytic spectrum. Molecular genetic methods: restriction analysis, DNA extraction, gel electrophoresis, protein electrophoresis. Statistical methods: data processing and analysis.

Four bacteriophage isolates with distinct morphological characteristics were obtained. It was established that bacteriophages infecting *Bacillus pumilus* exhibited varying titers: 1.61×10^{11} PFU/mL for phage SoA; 2.16×10^{11} PFU/mL for phage ASor; 3.36×10^9 PFU/mL for phage BiAs; and 2.12×10^{11} PFU/mL for phage PKP. All tested bacteriophages demonstrated the ability to lyse *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*. Additionally, phages SoA, ASor, and BiAs showed lytic activity against *Serratia marcescens*.

The frequency of phage-resistant mutant formation (%) was as follows: Phage SoA: 6.5×10^{-5} (*B. pumilus*), 6.5×10^{-5} (*B. subtilis*), 3.2×10^{-5} (*S. marcescens*). Phage ASor: 6×10^{-5} (*B. pumilus*), 3.7×10^{-5} (*B. subtilis*), 9.2×10^{-5} (*S. marcescens*). Phage BiAs: 5.2×10^{-5} (*B. pumilus*), 5.1×10^{-5} (*B. subtilis*). Phage PKP: 6×10^{-5} (*B. pumilus*), 5×10^{-5} (*B. subtilis*), 4.9×10^{-5} (*S. marcescens*).

The genomes of all isolated bacteriophages were identified as double-stranded DNA.

RFLP analysis of phage DNA showed the following results: BiAs DNA didn't produce fragments after treatment with any of the restriction enzymes, which might lead to the assumption that there are no restriction sites for these specific enzymes; PKP DNA treated with *Bst*AF produced fragments of 10,000 and 4,000 bp; SoA DNA treated with *Eco*RV produced fragments of 8000 and 4000 bp, *Pspt*24BI – one 7500 bp fragment, *Bpu*14I – one 7900 bp fragment; ASor DNA treated with *Acl*I one 8000 bp fragment.

SDS-PAGE electrophoresis revealed that the main protein band for SoA and ASor was observed near 90 kDa, whereas for BiAs and PKP it was around 45 kDa, presumably corresponding to the major capsid protein. Each sample lane showed 3–4 distinct bands, indicating heterogeneity in the protein composition of the isolated phages.