

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

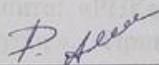
Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ КРАСНОГО МОРЯ,
СЕКРЕТИРУЮЩИЕ РНКАЗУ

Обучающийся 4 курса
группы 01-904

"14" июня 2023 г.

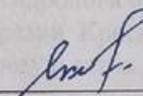


Михайлова Д.В.

Научный руководитель

канд. биол. наук, доцент

"14" июня 2023 г.

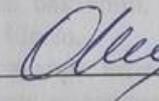


Яковлева Г.Ю.

Заведующий кафедрой
микробиологии

д-р биол. наук, профессор

"14" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 Микробное разнообразие морей и океанов	Ошибка! Закладка не определена.
1.2 Красное море: географическое положение и гидрологический режим	Ошибка! Закладка не определена.
1.3 Микробиологическое разнообразие Красного моря ..	Ошибка! Закладка не определена.
1.4 Фермент рибонуклеаза (РНКаза).....	Ошибка! Закладка не определена.
1.5 Продуценты РНКаза	Ошибка! Закладка не определена.
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	Ошибка! Закладка не определена.
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 Отбор проб воды Красного моря.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 Получение чистых культур из образца воды	Ошибка! Закладка не определена.
2.3 Идентификация выделенных микроорганизмов....	Ошибка! Закладка не определена.
2.4 Метагеномный анализ образца воды	Ошибка! Закладка не определена.
2.4.1 Выделение тотальной ДНК.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.4.2 Амплификация тотальной ДНК и секвенирование 16s рРНК	Ошибка! Закладка не определена.
2.4.3 Биоинформатический анализ.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.5 Определение РНКазной активности	Ошибка! Закладка не определена.
2.6 Статистическая обработка данных...	Ошибка! Закладка не определена.
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Метагеномный анализ образца воды Красного моря по 16S рРНК	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.1 Альфа-биоразнообразие микробных сообществ ..	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.2 Филогенетический анализ последовательностей .	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Идентификация изолятов из образца воды Красного моря.....	Ошибка! Закладка не определена.

3.2.1 Метаболическая активность выделенных изолятов.....**Ошибка!**
Закладка не определена.

ВЫВОДЫ..... 5

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ..**Ошибка! Закладка не определена.**

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к изучению микробного разнообразия заметно возрос благодаря его значимости в различных экологических и биотехнологических процессах, таких как пищевая промышленность, фармацевтические и сельскохозяйственные аспекты [Bisen, 2014]. Морские микроорганизмы демонстрируют огромное разнообразие и, хотя около 70 % поверхности Земли покрыто водой, предполагается, что самый большой процент этих видов все еще не описан [Glöckner *et al.*, 2012; Pomponi, 1999]. Как показывают немногочисленные метагеномные исследования, микробиота Красного моря отличается от той, что встречается в других морских средах. Например, в горячих рассольных бассейнах Красного моря обитает множество галофилов, процветающих в условиях, которые считаются не совсем благоприятными для живых организмов [Behzad *et al.*, 2016].

Уникальность Красного моря, как среды обитания, была предметом исследований более века назад. Метагеномика ускорила изучение экологии морских микроорганизмов, раскрыв огромное разнообразие ранее неизвестных форм микробной жизни в различных морских нишах [Antunes *et al.*, 2011].

Интерес к морским микроорганизмам и их ферментам связан, в первую очередь, с их способностью жить в экстремальных условиях (низкая температура, высокое давление и соленость) [Reysenbach, Louise, 2006]. Благодаря высокой солеустойчивости и термостабильности ферменты, продуцируемые морскими микроорганизмами, важны в биотехнологических аспектах [Baharum *et al.*, 2010].

Экзогенные ферменты микроорганизмов нашли широкое применение в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. С появлением новых исследований в биотехнологии применение рибонуклеаз (РНКаза), помимо молекулярной биологии, вошло во многие другие области, такие как медицинская, клиническая и аналитическая химия [Shamsher *et al.*, 2016]. Бактериальные внеклеточные РНКазы секретируются преимущественно представителями рода *Bacillus* [Ulyanova *et al.*, 2016], которые были выделены из различных экологических ниш. Многие РНКазы обладают противовирусным [Shah Mahmud *et al.*, 2013] и противоопухолевым действием [Pinskaya *et al.*, 2016; Покровский с соавт., 2016]. Среди них наиболее клинически перспективными являются бактериальные биназа и барназа, РНКазы *Ginseng* (РНКаза клеток женьшеня *Panax ginseng*) и онконаза (РНКаза клеток лягушки *Rana pipiens*) [Evandro, Ng, 2011]. Изучение микроорганизмов экстремальных мест обитания внесет свой вклад в поиск новых продуцентов внеклеточных ферментов.

Целью данной работы является характеристика сообщества галофильных бактерий Красного моря.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи.

- 1) Провести метагеномный анализ образца воды Красного моря по 16S рРНК.
- 2) Выделить из образца воды Красного моря чистые культуры микроорганизмов и определить их с помощью метода прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии.

3) Оценить способность выделенных бактерий синтезировать экзогенные РНКазы.

ВЫВОДЫ

1) В образце воды Красного моря было выявлено 207 операционных таксономических единиц (ОТЕ). Индекс Шеннона-Винера составил 3.57, что свидетельствует о видовом разнообразии микроорганизмов.

2) В исследуемом образце воды Красного моря преобладали представители фила *Poteobacteria* (83 %). Среди фила *Proteobacteria* в образце определили представителей порядков *Alphaproteobacteria* (64 %) и *Gammaproteobacteria* (36 %). Семейство *Rhodobacteraceae* (71 %) являлось доминирующим в порядке *Alphaproteobacteria*, семейство *Pseudoalteromonadaceae* (25 %) – в порядке *Gammaproteobacteria*. Из всех родов определенных в образце воды Красного моря преобладали представители родов *Sulfitobacter* (12 %), *Pseudoalteromonas* (9 %).

3) На среде LB-агар с добавлением различных концентраций NaCl (2 – 20 %) выделено 14 бактерий, 43 % из которых выросло в присутствии 6 % NaCl. Используя метод прямого белкового профилирования *MALDI-TOF* масс-спектрометрии 9 изолятов было идентифицировано до вида, среди которых преобладали представители рода *Vibrio*.

4) 50 % изолятов способны секретировать РНКазу. Максимальной РНКазной активностью с коэффициентом 2 обладали *Bacillus altitudinis* / *pumilus* и *Vibrio alginolyticus*.