

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА


Магистерская диссертация

Характеристика сидерофор-продуцирующего штамма

Rhodococcus qingshengii S10

Работа завершена:

"__" _____ 20__ г.



(А.В. Сорокина)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., старший преподаватель
кафедры микробиологии

"__" _____ 20__ г.



(И.В. Хильяс)

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор

"__" _____ 20__ г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2018

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	3
Введение.....	7
Выводы	9

Реферат

На сегодняшний день бактерии рода *Rhodococcus* имеют важное промышленное значение благодаря способности использовать в качестве источника углерода и энергии трудно разлагаемые вещества (ароматические соединения, нитрилы, углеводороды и стероиды). Метаболическое разнообразие представителей р.*Rhodococcus* обусловлено формированием гибких путей центрального метаболизма и экспрессией катаболических генов под действием стрессовых факторов среды.

Однако поиск новых продуцентов вторичных метаболитов среди родококков показал, что они способны синтезировать широкий спектр метаболитов благодаря наличию генов нерибосомальных пептидных и поликетидных синтетаз, участвующих в синтезе антибиотиков и сидерофоров. Например, для штаммов *Rhodococcus* было описано четыре группы соединений с антимикробной активностью (лариантиновые пептидные антибиотики, поликетидный аурацин, родопептины и хемомицины) и несколько типов сидерофоров (гетеробактин, родобактин и рехихелин).

Штамм бактерий рода *Rhodococcus* был выделен из минерала серпентинита Халиловского месторождения (Оренбургская область, Россия). Выделение проводили на среде Лурии-Бертани (ЛБ), состоящей (г/л): триптон (10), дрожжевой экстракт (5), NaCl (5), агар (20).

Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора Fast DNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals, USA). Подготовка ДНК-библиотеки проводилась с помощью набора NEBNext Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) согласно инструкциям производителя. Полногеномное секвенирование штамма было выполнено на платформе Miseq (Illumina) в режиме парноконцевого чтения с длиной рида 250 п.о.

Предварительная обработка данных секвенирования включала оценку качества полученных ридов с использованием программы FastQC (v0.11.3) [Andrews, 2010]. Последовательности адаптеров и нуклеотиды низкого

качества были удалены с помощью Trimmomatic (v0.36) [Bolger *et al.*, 2014]. De novo-сборка осуществлялась при помощи программного обеспечения Ray (v2.3.1) с различной частотой k-меров [Pevzner *et al.*, 2001]. Качество полученных сборок оценивалось при помощи инструмента QUASt (v4.6.2) [Gurevich *et al.*, 2013]. Функциональная аннотация генома была проведена с использованием сервера RAST 2.0 и утилиты Proka (v1.13) [Aziz *et al.*, 2008; Seemann, 2014].

Генетическая идентификация штамма была выполнена методом сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК представителей рода *Rhodococcus* алгоритмом BLAST. Филогенетические деревья были построены при помощи метода максимального правдоподобия, реализованного в пакете SeaView (v4.7) и метода присоединения соседей в программе MEGA 7 [Gouy *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2016]. Видовую принадлежность штамма *Rhodococcus* осуществляли с использованием программного обеспечения EDGAR 2.0 на основе матриц средней аминокислотной идентичности (AAI) и средней нуклеотидной идентичности (ANI) [Blom *et al.*, 2016].

Поиск биосинтетических кластеров генов, вовлеченных в синтез вторичных метаболитов, в геноме штамма *Rhodococcus* был выполнен с использованием программного продукта AntiSmash, который путем сканирования генома, детектирует кластеры, содержащие гены модулярных поликетидных синтетаз и нерибосомальных пептидных синтетаз [Weber *et al.*, 2015].

Измерение продукции сидерофоров катехолового типа осуществляли методом Арноу с использованием планшетного спектрофотометра iMark™ (BioRad, USA) при длине волны 490нм [Arnow, 1937; Хиляс с соавт., 2015]. Рост бактериальных клеток детектировали при длине волны 595нм.

Бактерию *R. qingishengii* S10 выращивали в 5мл среды ЛБ в течение 24ч при интенсивном перемешивании (250rpm) и при температуре +30°C. После осаждения клетки промывали фосфатным буфером и вносили в минеральную

среду M9, содержащую (г/л): Na_2HPO_4 (6.77); KH_2PO_4 (3); NaCl (0.5); NH_4Cl (1); pH 6.9-7.0. В качестве единственного источника углерода использовалась глюкоза в конечной концентрации 100 mM. В минеральную среду M9 вносили растворы $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и CaCl_2 в конечной концентрации 246 и 100 μM , соответственно. В качестве основного хелатора ионов железа использовался 2.2-бипиридил (BIP) в конечной концентрации 50 μM . Контрольные эксперименты проводили с добавлением в среду FeCl_3 в конечной концентрации 100 mM.

Клетки *R. qingishengii* S10 культивировали в 1 л минеральной среды M9 в течение 48 ч в условиях аэрации (200 rpm) и температуре +30 °C. После осаждения клеток *R. qingishengii* S10, полученную культуральную жидкость (КЖ) пропускали через картриджи C18. Элюцию метаболитов проводили 100% метанолом и 75% ацетонитрилом (ACN). Элюат высушивали и концентрировали на вакуумном испарителе Concentrator plus (Eppendorf, Germany).

Хроматографический анализ тотальной метанольной фракции *R. qingishengii* S10 осуществляли методом ВЭЖХ на хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA) с использованием обратнофазной C18 колонки (Polar Advantage II, Thermo Scientific) с детекцией при 220, 260 и 280 нм. Подвижная фаза: вода/ацетонитрил с 0.01% ТФУ (A=99.99% вода/0.01% ТФУ; B=80% ацетонитрил/19.99% вода/0.01% ТФУ). Скорость потока 1 мл/мин, температура разделения 22 °C.

Для идентификации химической структуры сидерофоров использовали Maxis impact LC-MS (Maxis Impact, Bruker), комбинированный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр с ионизацией электроспреем для определения точной массы и неискаженного изотопного распределения в режимах MS и MS/MS

В качестве источника новых вторичных метаболитов был выделен из минерала серпентинита изолят бактерии S10, отнесенный по результатам филогенетического анализа к виду *R. qinshengii* S10. Аннотирование генома

R. qinshengii S10 и поиск биосинтетических кластеров генов, вовлеченных в синтез вторичных метаболитов, позволил обнаружить два NRPS кластера, имеющих высокую гомологию последовательностей с генами, ответственных за синтез сидерофоров гетеробактина и альбахелина *R. qingshengii* BKS 20-40.

Кластер NRPS-независимого биосинтеза гетеробактина *R. qingishengii* S10 состоит из трех главных, трех дополнительных, четырех транспортных и одного регуляторного биосинтетического генов. Кластер NRPS-независимого биосинтеза альбахелина *R. qingishengii* S10 состоит из двух главных, пяти дополнительных и двух транспортных биосинтетического генов. Функции других генов, входящих в кластер, остаются неидентифицированными

В ходе экспериментов было показано, что *R. qingishengii* S10 продуцирует максимальное количество сидерофоров катехолового типа в концентрации 400мкМ на 48ч культивирования в среде, содержащей 100mM глюкозы. В случае добавления в среду культивирования 50mM глюкозы максимальная продукция сидерофоров приходилась на 78ч роста бактерии и составила 300мкМ

Спектрометрическое исследование сидерофоров *R. qingshengii* S10 обнаружило продукцию катехоловых сидерофоров с химическими формулами $C_{17}H_{32}N_3O_4$, $C_{54}H_{67}N_{14}O_{20}$, которые могут соответствовать гетеробактину и дигетеробактину. Структуру, остальных сидерофоров, продуцируемых штаммом *R. qingishengii* S10 еще предстоит окончательно установить.

Введение

Бактерии рода *Rhodococcus* представляют собой метаболически разнородные актинобактерии, широко распространенные в окружающей среде и нашедшие применение в процессах биоремедиации, биотрансформации и биокатализа. Родококки, населяя экстремальные экологические ниши, имеют ряд преимуществ, поскольку целый спектр стрессовых факторов способствует развитию у них уникальных метаболических путей.

Несмотря на значительный прогресс в изучении бактерий рода *Rhodococcus*, совсем недавно начались исследования, посвященные исследованию разнообразия синтезируемых ими вторичных метаболитов. Возрастающий интерес к микробным вторичным метаболитам обусловлен тем, что именно к ним относятся известные классы антибиотиков (пенициллин и ванкомицин), противоопухолевые соединения и цитостатики (блеомицин), противовоспалительные средства и иммунодепрессанты (циклоспорин А), токсины и сидерофоры [Rausch *et al.*, 2007].

Синтез широкого спектра вторичных метаболитов родококками обусловлен наличием нерибосомальных пептидных и поликетидных синтетаз. В частности, биоинформатический анализ впервые просеквенированного генома *R. jostii* RHA1 позволил обнаружить 24 нерибосомальные пептидные синтетазы и 7 поликетидных синтетаз, участвующих в синтезе сидерофоров, пигментов и антибиотиков [McLeod *et al.*, 2006]. Среди вторичных метаболитов особое положение занимают низкомолекулярные хелаторы железа – сидерофоры. Сидерофоры выполняют не только функцию доставки железа в клетку, но также обеспечивают защиту бактериальных клеток от окислительного стресса, выполняют функции сигнальных молекул и антимикробных агентов. Ранее была продемонстрирована способность продукции нескольких типов сидерофоров родококками: рехихелина, гетеробактина и родохелина [CasoLuengo *et al.*, 2008; 2012; Bosello *et al.*, 2011; 2013].

Целью настоящей работы явилась характеристика штамма *Rhodococcus qingishengii* S10 как источника новых вторичных метаболитов.

В ходе данной работы решались следующие задачи:

- 1) Просеквенировать и аннотировать геном выделенного изолята S10.
- 2) Определить таксономическую принадлежность изолята S10.
- 3) Идентифицировать генные кластеры биосинтеза сидерофоров в геноме *R. qingishengii* S10.
- 4) Исследовать продукцию сидерофоров штаммом *R. qingishengii* S10 калориметрическим и спектрометрическим методами анализа.

Выводы

1. В результате сборки генома *R. qingishengii* S10 был получен 81 отдельный непрерывный фрагмент (контиг) размером 7 184 029 п.о. и 33 скаффолда общей длиной последовательности 6 442 213 п.о. Общее число предсказанных белок-кодирующих генов в зависимости от использованного способа аннотации составило 6895 и 7000 последовательностей.
2. Выделенный изолят бактерии S10 на основании сравнения последовательностей гена 16S рРНК был отнесен к роду *Rhodococcus*. По результатам ANI анализа была определена 98.59% идентичность выделенного изолята *Rhodococcus sp.* S10 к представителю *R. qinshengii* CS98
3. Поиск биосинтетических кластеров генов, вовлеченных в синтез вторичных метаболитов, в геноме штамма *R. qingishengii* S10 обнаружил два NRPS кластера, имеющих высокую гомологию последовательностей с генами, ответственных за синтез сидерофоров гетеробактина (100%) и альбахелина (50%).
4. Калориметрическое исследование продукции сидерофоров *R. qingishengii* S10 показало, что максимальное количество сидерофоров катехолового типа (400мкМ) образуется на 48ч культивирования в среде с добавлением 100mM глюкозы. Спектрометрический анализ тотальной метанольной фракции вторичных метаболитов *R. qingishengii* S10 позволил идентифицировать пик с массами 616.2403 и 1231.464, с химическими формулами $C_{27}H_{34}N_7O_{10}$, $C_{54}H_{67}N_{14}O_{20}$, которые соответствуют гетеробактину А и дигетеробактину.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Сорокина А.В.
Факультет, кафедра, номер группы	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Характеристика сидерофор-продуцирующего штамма Rhodococcus qingshengii S10
Название файла	Сорокина Алена_магистерская.docx
Процент заимствования	3,15%
Процент цитирования	0,53%
Процент оригинальности	96,32%
Дата проверки	11:25:52 30 мая 2018г.
Модули поиска	Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Цитирование; Коллекция РГБ
Работу проверил	Зеленихин Павел Валерьевич
	ФИО проверяющего
Дата подписи	01.06.18

Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.