

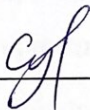
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

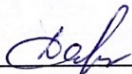
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* C
РЕДУЦИРОВАННЫМИ ГЕНОМАМИ

Обучающийся 4 курса
группы 01-904
"14" июня 2023 г.



Султанов Г. Э.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент
"14" июня 2023 г.



Данилова Ю. В.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор
"14" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 7 |
| 1.1 Характеристика рода <i>Bacillus</i> | 7 |
| 1.2 Характеристика вида <i>B. subtilis</i> | 9 |
| 1.2.1 Штамм <i>B. subtilis</i> 168..... | 10 |
| 1.3 Создание мутантных штаммов на основе <i>B. subtilis</i> | 11 |
| 1.4 Формирование биопленок у бацилл | 14 |
| 1.5 Биохимические характеристики <i>Bacillus subtilis</i> | 17 |
| ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ..... | 20 |
| 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 20 |
| 2.1 Штаммы бактерий | 20 |
| 2.2 Питательные среды | 21 |
| 2.3 Динамика роста..... | 21 |
| 2.4 Определение протеолитической активности..... | 21 |
| 2.5 Динамика спорообразования..... | 22 |
| 2.6 Динамика образования биоплёнок..... | 22 |
| 2.7 Сахаролитическая активность..... | 23 |
| 2.8 Желатиназная активность..... | 23 |
| 2.9 Оксидазная активность | 23 |
| 2.10 Каталазная активность | 23 |
| 2.11 Статистическая обработка результатов..... | 24 |
| 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 25 |
| 3.1 Изучение динамики роста штамма <i>B. subtilis</i> 168 и производных от него мутантных штаммов..... | 25 |
| 3.2 Определение динамики накопления протеолитической активности в культуральной жидкости штаммов <i>B. subtilis</i> | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Образование биопленок штаммом <i>B. subtilis</i> 168 и производных от него мутантных штаммов | 29 |
| 3.4 Динамика спорообразования штамма <i>B. subtilis</i> 168 и производных от него мутантных штаммов | 30 |
| 3.5 Биохимическая и физиологическая характеристика штамма <i>B. subtilis</i> 168 и штаммов с редуцированным геномом | 31 |
| ВЫВОДЫ | 33 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 35 |

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus subtilis – известный грамположительный бактериальный вид, который является важным объектом микробиологии, генетики и биотехнологии. Отмечаются многообразные свойства этого микроорганизма, включая его способность продуцировать множество разнообразных метаболитов и белков, участвовать в круговороте веществ в почве, регулировать рост и развитие растений и многое другое.

В настоящее время *B. subtilis* широко используется в промышленности для производства различных биологически активных веществ, биологической защиты растений и животных, а также препаратов для лечения заболеваний. В связи с этим, изучение и тестирование штаммов с редуцированными геномами для продукции гетерологичных белков является актуальной задачей биотехнологии.

В настоящей работе были изучены штаммы *B. subtilis* с редуцированными геномами: 27-31 и 27-42, в геноме которых инактивированы гены спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ, а также встроена кассета comK/comS для повышения эффективности трансформации (любезно предоставлены проф. J. Altenbuchner). В качестве контрольного штамма использовали *B. subtilis* 168. Полученные данные станут основой для использования штаммов с редуцированными геномами в качестве клеток-реципиентов для получения рекомбинантных белков.

Целью работы являлось изучение мутантных штаммов, производных от штамма *B. subtilis* 168.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

- 1) Определить динамику роста и накопления протеолитической активности штамма *B. subtilis* 168 и производных от него мутантных штаммов.

2) Исследовать динамику образования биопленок *B. subtilis* с редуцированными геномами и штамма *B. subtilis* 168;

3) Определить динамику спорообразования штамма *B. subtilis* 168 и производных от него мутантных штаммов.

4) Исследовать биохимические характеристики штамма *B. subtilis* 168 и штаммов с редуцированным геномом.

ВЫВОДЫ

1) Установлено, что штамм *B. subtilis* 168 достигает максимальной оптической плотности к 24 часу роста культуры. Штаммы *B. subtilis* с редуцированными геномами 27-31 и 27-42 достигают максимальной оптической плотности к 18 и 24 часу роста культуры, соответственно. Штаммы с редуцированным геномом показали более низкую оптическую плотность (OD_{590}), чем родительский штамм на протяжении всех стадий роста культуры.

Максимальная протеолитическая активность *B. subtilis* 168 наблюдалась на 56 час роста культуры и составила 0,81 ед/мл. В штамме *B. subtilis* 27-31 протеолитическая активность составила в среднем 0,0628 ед/мл в процессе роста культуры. Максимальная активность наблюдалась в фазе отмирания культуры на 72 час и составила 0,334 ед/мл. В редуцированном штамме *B. subtilis* 27-42 протеолитическая активность практически отсутствовала. Максимальная активность наблюдалась на 48 час и составила 0,496 ед/мл.

2) Установлено, что образование биопленок исследуемых штаммов начинается на 12 ч роста бактерий и достигает максимума в стационарной фазе роста, дисперсия биопленок происходит, когда наступает фаза отмирания клеточной культуры. Мутантные штаммы *B. subtilis* 27-31 и 27-42, показали снижение уровня образования биопленок в среднем на 30%.

3) Динамика спорообразования контрольного штамма *B. subtilis* 168 характеризуется наличием спор с 15 часа, максимальное количество спор составляет 67 % на 48 час. Мутантные штаммы оказались аспорогенными.

4) Показано, что штамм *B. subtilis* 27-31 проявил положительную реакцию на маннит, и отрицательную на другие сахара – сахарозу, лактозу, глюкозу и мальтозу. Мутантный штамм *B. subtilis* 27-42 оказался способным ферментировать только глюкозу. При исследовании протеолитической, каталазной и оксидазной ферментативной активности исследуемых штаммов

различий не выявлено, так же, как и при исследовании штаммов на способность расти в присутствии NaCl 6,5%.