

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

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (магистерская программа): Микробиология и вирусологи

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА СИНТЕЗ
ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ, В ГЕНОМЕ *PANTOEA BRENNERI*

Обучающийся 2 курса
группы 01-240-2



Егорова Е.А.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Сулейманова А.Д.

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Биологическое значение фосфора.....	8
1.2 Круговорот фосфора в почве	8
1.3 Минерализация фосфоорганических соединений.....	10
1.4. Мобилизация минерального фосфора.....	10
1.4.1 Бактериальный синтез глюконовой кислоты.....	11
1.5 Фосфат солибилизирующие бактерии (PSB)	12
1.6 Бактерии рода <i>Pantoea</i>	14
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	17
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	17
2.1 Используемые штаммы и плазмиды.....	17
2.2 Питательные среды	19
2.3 Молекулярно-биологические методы	19
2.3.1 Выделение ДНК.....	19
2.3.2 Полимеразная цепная реакция	19
2.4 Получение мутантного штамма <i>P. brenneri</i> 3.2 с deletированным геном <i>gcd</i>	21
2.5 Фосфатмобилизирующая способность	24
2.5.1 Количественная оценка солибилизации фосфатов.....	24
2.6 Биохимические способности штаммов <i>P. brenneri</i>	26
2.7. Изучение общей характеристики морфологических и физиологических свойств штаммов <i>P. brenneri</i>	26
2.7.1 Динамика роста.	26
2.7.2 Подвижность.....	26
2.7.3 Биоплёнообразование.....	26

2.7.4	Определение способности секретировать сидерофоры	27
2.7.5	Определение способности продуцировать биосурфактанты	27
2.7.6	Определение продукции индол-3-уксусной кислоты	27
2.8	Статистическая обработка результатов.....	28
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1	Получение мутантного штамма <i>P. brenneri</i> 3.2 с делетированным геном <i>gcd</i>	29
3.2	Изучение динамики роста дикого и мутантного штаммов.....	32
3.3	Изучение способности штаммов <i>P. brenneri</i> к мобилизации неорганических почвенных фосфатов	33
3.3.1	Определение уровня свободных фосфатов	34
3.4	Изучение биохимических способностей штаммов <i>P. brenneri</i>	36
3.5	Определение продукции индол-3-уксусной кислоты	37
3.6	Изучение морфологических и физиолологических свойств мутантного штамма <i>P. brenneri</i> 3.2.....	38
3.6.1	Изучение подвижности	38
3.6.2	Определение способности к формированию биоплёнок	39
3.6.3	Определение способности продуцировать биосурфактанты.....	40
3.6.4	Определение способности секретировать сидерофоры	41
	ВЫВОДЫ.....	43
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Фосфор является одним из главных макроэлементов для растений. Повышение урожайности сельскохозяйственных культур невозможно без применения фосфорных удобрений. Использование таких агрохимических препаратов оказывает негативное влияние на экологическое состояние почвы. В почве фосфор представлен в неорганической и органической форме, в виде таких минералов, как фосфориты, апатиты, фторапатиты и оксиапатиты, а также в форме фосфатов алюминия, железа и марганца. Такие формы фосфатов мало подвижны и не доступны для вовлечения в метаболизм растений [Baumann *et al.*, 2020].

Альтернативой химическим удобрениям считается применение биопрепаратов на основе почвенных микроорганизмов, обладающие рядом полезных свойств, способствующих стимуляции роста и развитию сельскохозяйственных культур. Внесение в почву фосфатсоллюбилизирующих бактерий (PSB) способствует улучшению фосфорного питания растений. Попадая в почву, PSB переводят недоступный почвенный фосфор в доступный путем соллюбилизации неорганических фосфатов или минерализации фосфатов из фосфорорганических соединений. Одним из механизмов соллюбилизации фосфатов считается продукция органических кислот, среди которых основной является глюконовая кислота.

Несмотря на то, что фосфор присутствует в почвах в виде смеси неорганических и органических соединений, до сих пор только несколько исследований описывают P-соллюбилизирующие микроорганизмы, способные соллюбилизировать как органические, так и минеральные источники фосфора [Malboobi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2019]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что выделенные почвенные изоляты *Pantoea brenneri* обладают множеством PGP-свойств: целлюлазной и протеазной активностью, способны фиксировать азот, образовывать биопленки, обладают антагонистической активностью против фитопатогенов [Бульмакова с соавт., 2023; Иткина с соавт.,

2021]. Кроме того, была показана способность изолятов *P. brenneri* гидролизовать как органические соединения фосфора, фитаты, за счет ферментов фитаз, так и широкий спектр неорганических труднорастворимых почвенных соединений путем продукции органических кислот [Suleimanova *et al.*, 2023]. Секрция *P. brenneri* глюконовой кислоты является одним из основных механизмов мобилизации неорганических почвенных фосфатов бактериями. Ключевой фермент, ведущий этот процесс – глюкозодегидрогеназа (*gcd*).

Цель работы – оценка влияния глюкозодегидрогеназы на способность штаммов *P. brenneri* к солюбилизации фосфатов

В работе решались следующие задачи:

- 1) Получить мутантный штамм *P. brenneri*, с делетированным геном глюкозодегидрогеназы.
- 2) Оценить способности нативного и мутантного штаммов *P. brenneri* к мобилизации неорганических почвенных фосфатов.
- 3) Охарактеризовать морфологические и физиологические свойства нативного и мутантного штаммов *P. brenneri*.

ВЫВОДЫ

1) Получили безмаркерный штамм *P. brenneri* 3.2, с делетированным геном глюкозодегидрогеназы.

2) Установили, что инактивация гена глюкозодегидрогеназы у штамма *P. brenneri* 3.2 приводила к снижению способности высвобождать фосфаты на 7.6%.

3) Установили, что инактивация гена глюкозодегидрогеназы способствовала увеличению формирования биоплёнок. Делеция гена *gcd* не оказывала влияния на продукцию сидерофоров, биосурфактантов, продукцию индол-3-уксусной кислоты и подвижность штамма.