

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи
УДК 579/577

Код 1-31 80 01

Акулова Ольга Дмитриевна

Применение информационных технологий для обработки данных, полученных в ходе изучения биоразнообразия и характеристики бактерий, изолированных из временных водоемов на территории восточной Антарктиды

Выпускная работа по
«Основам информационных технологий»

Магистранта кафедры микробиологии
биологического факультета

Специальность: 1-31 80 01 – биология

Рецензент:

Минск, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление	2
Перечень условных обозначений	3
введение.....	4
общая характеристика работы	7
Глава 1 Обзор литературы.....	8
1.1 Преимущества антарктических микроорганизмов	8
1.2 Обзор основных молекулярно-биологических методов исследования разнообразия микроорганизмов	9
Глава 2 Материалы и методы исследования	11
2.1 Объекты исследования	11
2.2 Среда и растворы	12
2.3 Методы исследования	16
2.3.1 Получение бактерий в лиофилизированном состоянии.....	16
2.3.2 Манипуляции с нуклеиновыми кислотами	17
2.3.3 Обработка результатов секвенирования	18
2.3.4 Построение филогенетического дерева	18
2.3.5 Газохроматографический анализ.....	19
2.3.6 Изучение ферментативных активностей	20
Глава 3 Результаты и их обсуждение	22
Заключение	32
библиографический список.....	33
Приложения	35
Приложение А – Презентация защиты выпускной работы	35
Приложение Б – Список публикации.....	42
Приложение В – Скриншот сайта выпускной работы	43

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГХ	– газовая хроматография
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	– додецилсульфат натрия
КА	– кластерный анализ
МАЛДИ	– матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
МС	– масс-спектрометрия
МЭЖК	– метиловые эфиры жирных кислот
ПА	– питательный агар
п. н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
рРНК	– рибосомная РНК
УФ	– ультрафиолетовое излучение
LB	– (от англ. Lysogeny broth – литическая среда) полноценная питательная среда для роста культур бактерий

ВВЕДЕНИЕ

Биология не раз переживала новое рождение: быв сначала «полевой» наукой, изучавшей животных и растения, в XX веке она значительно переместилась в лаборатории, концентрируясь на молекулярных основах жизни и наследственности. В XXI веке история двинулась дальше: многие эксперименты теперь проводятся на компьютере, а материалом для изучения являются последовательности белков и ДНК, а также информация о строении биологических молекул. На сбор и обработку накопленной информации часто уходило много времени и сил. Со времени своего появления, во второй половине 20-го века, наука информатика начала широко внедряться и сотрудничать с другими науками не обошла стороной и биологию.

В конце 60-х – начале 70-х годов прошлого века по мере своего совершенствования ЭВМ стали активно использоваться в биологии что оказалось весьма кстати, учитывая огромное количество экспериментальных данных по биологии, требующих осмысления и обработки. Информации, получаемой в биологических экспериментах, было значительно больше, чем возможности человека к запоминанию фактов и их анализу. Возникла необходимость хранения все быстрее увеличивающегося объема информации. Например, уже к 2003 г. объединенными усилиями ученых многих стран был в общих чертах прочитан геном человека.

Прогресс человечества в 21 веке несомненно будет связан с развитием и взаимодействием таких наук как молекулярная биология, генетика и информатика. Ответы на многие глобальные вызовы, стоящие перед современной цивилизацией, критическим образом зависят от развития этих наук, их взаимодействия и использования их достижений.

Именно поэтому появилась новая наука – информационная биология. Информационная биология занимает в современной биологии ключевую и исключительно важную позицию. К числу ее задач относится создание компьютерных баз данных для хранения экспериментальной информации о структуре и функции ДНК, РНК и белков, и о функционировании молекулярно-генетических систем организмов; разработка теоретических и компьютерных методов анализа геномов; создание компьютерных технологий моделирования молекулярно-генетических систем и процессов, в том числе, фундаментальных: репликации, транскрипции и т.д.; моделирование структурной организации и функции генетических макромолекул, молекулярных взаимодействий между ними; изучение закономерностей эволюции генетических макромолекул и молекулярно-генетических систем.

Таким образом, информационная биология относится к числу высоких технологий современной биологии и обеспечивает информационно-компьютерные и теоретические основы генетики и селекции, молекулярной генетики и биологии, генетической и белковой инженерии, биотехнологии, медицинской генетики, генодиагностики, генотерапии и других биологических наук, благодаря выдающимся достижениям которых биология превратилась в одну из лидирующих наук грядущего столетия.

В биоинформатике используются методы прикладной математики, статистики и информатики. Главная цель биоинформатики — способствовать пониманию биологических процессов. Важное отличие биоинформатики от программирования в том, что биоинформатик должен точно понимать какими данными он оперирует и как их можно обработать что бы не допустить ошибок и расхождений в полученных результатах между разными лабораториями, используемые методы и алгоритмы должны быть стандартизированы. Еще одно, пожалуй, самое видимое отличие биоинформатики от программирования – это исследования и публикации. Биоинформатика – это наука, а значит просто необходимо быть в курсе всего, что происходит в мире. Для этого и существуют многочисленные конференции, сотрудничества с лабораториями из других стран и, банки научных публикаций по биологической тематике. Каждая статья, выходящая в номере любого научного журнала по биологии, помещается в банк и аннотируется так, чтобы любой другой ученый мог легко найти ее через Интернет. Крупнейшая on-line библиотека медико-биологических публикаций PubMed содержит более 16 млн. статей, вышедших в течение последних 50 лет.

Главная задача данного исследования состояла не только в накоплении биологических данных, но и правильной их обработке. Для обработки применялся кластерный анализ – гибкая процедура, позволяющая осуществлять обработку и обобщение данных различными алгоритмами, которые имеют общую задачу, визуализации иерархических отношений между образцами путем группировки их в наглядные структуры. Впервые такой термин ввел Р. Трион (R. C. Tryon) в 1939 г.

Основная задача кластерного анализа заключается в том, чтобы выделить компактные группы объектов по информации о расстояниях или связях (мерах близости) между ними. Техника кластеризации применяется в самых разнообразных областях таких как медицина, психология, маркетинг, экономика и многих других. Плюсом данного метода является то, что он работает даже тогда, когда данных мало и не выполняются требования нормальности распределений случайных величин и другие требования классических методов статистического анализа.

Решением задачи кластерного анализа является разбиение, удовлетворяющие некоторому выбранному критерию оптимальности. Важно

отметить, что полученный при использовании кластерного анализа результат является одним из возможных. Этот результат необходимо сравнить с аналогичными результатами, полученными с применением других комбинаций метрик, алгоритмов объединения и т.д., а также с результатами других методов анализа данных. Наиболее подходящий алгоритм кластеризации для решения определенной задачи часто нужно выбирать экспериментально, если нет математической причины отдавать предпочтение одной модели над другой. Это связано с тем, что в кластерном анализе необходимо использовать определенный способ измерения расстояния между наблюдениями и его выбор будет зависеть от того, какой тип данных подлежит изучению.

В настоящее время кластерный анализ осуществляется с помощью программ которые входят в состав различных статистических пакетов. В данной работе применялась STATISTICA – программный пакет для статистического анализа, разработанный компанией StatSoft, реализующий функции анализа данных, управления данных, добычи данных, визуализации данных с привлечением статистических методов и MEGA – удобный программный пакет для анализа данных ДНК и белковых последовательностей. Обычно данные вносят в уже готовую, либо строят матрицу состоящую из значений признаков, описывающих свойства исследуемой выборки наблюдений. После внесения данных обрабатывают информацию тем или иным методом.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Объекты исследования: 33 изолята бактерий, выделенные В.Е. Мяминым во время 5 Белорусской антарктической экспедиции в районе базирования полевой базы «Гора Вечерняя».

Цель: молекулярно-генетический и физиолого-биохимический анализ бактерий.

Методы: физиолого-биохимические (исследование физиолого-биохимических свойств) и молекулярно-генетические методы (выделение хромосомной ДНК, электрофорез в агарозном геле, ПЦР, трансформация, молекулярное клонирование, секвенирование).

В рамках данной работы:

- идентифицировали 25 бактериальных изолятов с применением метода секвенирования 16S рДНК;
- освоили методики выделения метиловых эфиров жирных кислот и определили качественный состав жирных кислот у антарктических изолятов с использованием метода газовой хроматографии;
- провели анализ метиловых эфиров жирных кислот, не идентифицированных с помощью газовой хроматографии, с помощью масс-спектрометрии;
- посмотрели наличие и разнообразие пигментов каротиноидной природы;
- проверили бактерии на наличие антогонистических свойств и на устойчивость к антибиотикам;
- провели краткую оценку ферментативной активности изолятов по отношению к основным группам ферментов с использованием полуколичественных чашечных методов;
- статистически обработали полученные данные с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0., MEGA7.0.

Исследование физиологических основ выживаемости микроорганизмов, связанное с особенностями их строения и функционирования в условиях вечной мерзлоты, способствует обнаружению биологически активных веществ с новыми свойствами для использования в биотехнологии, например, пигментов, жирных кислот, антимикробных соединений и холодоактивных ферментов, способность микроорганизмов расти при низких температурах может быть использована в биотехнологиях, например, для сокращения затрат на работу термостатных систем.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Преимущества антарктических микроорганизмов

Несмотря на суровые климатические условия, на территории антарктического континента процветают различные микробные сообщества. Некоторые такие сообщества Антарктиды, населяющие почвы, морские или пресные водоемы, достаточно подробно изучены, в то время как другие, например, экосистемы поверхностных снегов или ледниковой толщи, остаются малоисследованными. Изучение бактерий, обитающих в суровых условиях имеет важное теоретическое и практическое значения, связанные с особенностями их строения и функционирования. С появлением методов секвенирования ДНК, появилась возможность провести комплексные исследования таксономического состава и функционального потенциала сообществ микроорганизмов Антарктиды [1].

Бактерии выработали определенные механизмы, позволяющие им выживать в суровых условиях полярного климата. К таким механизмам можно отнести: изменения в белковом составе, изменение в структуре белков (повышение доли незаряженных полярных аминокислот, уменьшение гидрофобных аминокислот) и продукция криопротекторных растворимых веществ (например, глицина, бетаина, трегалозы и др.). Эти бактерии производят ферменты с высокой удельной активностью при низких и умеренных температурах, часто такие ферменты являются термолабильными [2].

Еще одна важная адаптация бактерий к экстремальным условиям среды связана с изменением вязкости мембраны. Имеющиеся исследования в области адаптации бактерий к пониженным температурам свидетельствуют о том, что клетки адаптируются к таким условиям путем изменения текучести мембраны, которая зависит от состава жирных кислот и содержания белка в клетке. Хорошо известным является факт, что понижение температуры в процессе роста бактерий приводит к увеличению моновенасыщенных жирных кислот и уменьшению насыщенных жирных кислот с прямой цепью. Среди жирных кислот полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) играют важную роль в физиологии микроорганизмов, так как помогают поддерживать текучесть мембраны, необходимую для выживания в экстремальных условиях среды. Перечисленные уникальные свойства антарктических бактерий делают их идеальными моделями для фундаментальных исследований и биотехнологии [2].

Большой практический интерес представляют микроорганизмы, обитающие в неблагоприятных условиях. Неуклонно растет с каждым годом интерес к полярным микроорганизмам со стороны научного сообщества, что связано с особенностями их строения и функционирования. Перспективными, но малоизученными являются микроорганизмы, изолированные в Антарктиде, т.к. данный континент характеризуется уникальными условиями, для которого свойственны низкая влажность, пониженные температуры, сильные ветра и переменное УФ-излучение. Исследования данных территорий показали, что они заселены жизнеспособными микроорганизмами, большинство из которых являются облигатными психрофилами.

Исследование физиологических основ выживаемости микроорганизмов, связанное с особенностями их строения и функционирования в условиях вечной мерзлоты, способствует обнаружению биологически активных веществ с новыми свойствами для использования в биотехнологии, например, пигментов, жирных кислот, антимикробных соединений и холодоактивных ферментов. Способность микроорганизмов, изолированных на территории Антарктиды, расти при пониженных температурах может быть использована в биотехнологиях для сокращения затрат на работу термостатных систем. Особенности биологических мембран бактерий из холодных мест обитания основаны на своеобразии состава их липидов, включающих, в основном, ненасыщенные и разветвленные жирные кислоты. Кроме того, «антарктические» бактерии вырабатывают пигменты, которые уменьшают текучесть мембраны и участвуют в защитных механизмах клетки от ультрафиолетового излучения. В настоящее время растет интерес к получению каротиноидов из биомассы бактерий для применения в пищевой промышленности, в медицине, косметологии и т.д [3].

1.2 Обзор основных молекулярно-биологических методов исследования разнообразия микроорганизмов

Быстрая и точная идентификация бактерий является одной из основных задач микробиологии. Изучение микроорганизмов весьма затруднительно без их предварительной сортировки по биологическим видам, родам и т.д. Процесс молекулярно-генетического и физиолого-биохимического анализа бактерий является одним из самых важных и трудоемких этапов проведения микробиологических исследований. На сегодняшний день разработаны и используются различные методы идентификации. Наряду с секвенированием локусов ДНК, важных для геносистематики, применяются альтернативные методы – одним из таких методов является анализ метиловых эфиров с применением газовой хро-

матографии. Его популярность связана с созданием обширных библиотек с данными по профилям эфиров жирных кислот различных бактерий, на уникальности которых для отдельных видов и построен сам метод идентификации. На основе данных, полученных в ходе типирования бактерий, создаются коллекции.

Начальным этапом микробиологических исследований является идентификация изолятов. За более чем вековую историю изучения микроорганизмов появилось множество подходов для оценки и изучения их разнообразия в естественных сообществах. В течение длительного времени идентификация была основана на проведении большого количества биохимических и физиологических тестов, которые требуют получения бактерий в чистой культуре, продолжительных по времени даже для легко культивируемых штаммов [3]. Кроме того, такие подходы субъективны и не могут быть применены для изучения некультивируемых штаммов, которые по мнению ученых составляют 99% часть природных бактериальных сообществ. Молекулярные подходы, напротив более чувствительны и надежны, и на сегодняшний день, благодаря быстрому техническому развитию, многие из молекулярных методов стали рутинным в лабораториях по всему миру, в том числе и в Беларуси. Согласно многочисленным обзорам последних лет, внедрение в практику современных методов идентификации значительно упрощают работу ученых. Наибольшее распространение наряду с классической оценкой морфологических и биохимических признаков, которую проводят на начальных этапах, получили методы секвенирования ДНК, анализа метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), анализа белков с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). Каждый из перечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать [4]. Поэтому, в настоящее время, при выборе того или иного метода идентификации исходят из его доступности, точности проводимого анализа и затрат в расчете на образец [5].

На сегодняшний день культивируемые и поддерживаемые в коллекциях лабораторий антарктические бактерии были выделены из практически всех доступных сред, таких как воздух, снег, почва, озера, прибрежные воды океана, и др. Несмотря на достаточно большое количество изолятов, микробное сообщество полярных регионов изучено довольно поверхностно. В институте микробиологии НАН Беларуси имеются коллекции антарктических бактерий, большинство из которых не изучены.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись 33 изолята бактерий, выделенных В.Е. Мяминым во время 5 Белорусской антарктической экспедиции (58 Российской антарктической экспедиции) в районе базирования полевой базы «Гора Вечерняя» (Восточная Антарктида, Земля Эндерби, оазис Холмы Тала, участок Вечерний) из временных водоёмов побережья бухты Лазурная, залив Алашеева, море Космонавтов, 67°39' ю. ш., 46°10' в. д. (таблица 2.1.1). Микроорганизмы были получены для работы в чистой культуре и хранились в коллекции лаборатории «Центра аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси.

В качестве контролей использовали: *Bacillus pumilus* P10, *Escherichia coli* XL1-Blue, *Bacillus pumilus* 106, *Pantoea agglomerans* 202, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* 168, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 6531 и *Staphylococcus saprophyticus*, *E. coli* S17-1 [pUT::miniTn5], *Pseudomonas fluorescens* KanR, *E. coli* XL1-Blue [pJQM], *Pseudomonas fluorescens* 31, *Lactococcus lactis*, *Rhodococcus crythropolis*, *Bacillus pumilus* F6.

Таблица 2.1.1 – Фенотипические признаки бактериальных культур, выделенных в районе участка Вечерний оазиса Холмы Тала [6]

№	Название штамма	Рост при +5° С	Рост при +18° С	Рост при +37° С	Каталазная активность	Тест с КОН
1	1т.1.5.1	+/-	+	+/-	+	—
2	1т.3.20.1	+	+	+	+	—
3	2т.2.5.2	+	+	+	+	—
4	2т.5.20.1	+	+	+	+	—
5	2т.5.20.2	+	+	+/-	+	—
6	3т.5.20	—	+	+	+	+
7	5т.1.5	+	+	+/-	—	—
9	5т.2.5.1	+/-	+	+/-	—	—
10	5т.3.20	+	+	+/-	+	+
11	6т.2.5	+	+	+/-	—	—
12	6т.3.5.2	+	+	+	—	+
13	6т.4-2.20	+/-	+/-	—	+	—
14	6т.4.5	+	+	+/-	—	—
15	6т.5.5	+/-	+	—	+	+
17	7т.2.5.1	+/-	+	—	—	—
18	7т.4.20.1	+	+	+/-	—	—
19	7т.4.20.2	+	+	+/-	—	—

Продолжение таблицы 2.1.1

20	9т.2.5	+/-	+/-	-	-	-
21	9т.4.5	+/-	+/-	+	+	+
22	11т.1.5.1	+/-	+	-	+	-
23	11т.4.20.1	+/-	+/-	+/-	+	+
25	11т.2.20	+/-	+	+/-	-	-
26	11т.5.5	+/-	+	-	-	-
27	11т.7.20.1	+	+	-	-	+
28	11т.7.20.2	+	+	-	-	+
29	Хт.6.20.3	+/-	+	+		+
30	Хт.6.20.4	+/-	+/-	-	+	+
31	Керн 2	+	+	+	+	-
32	Зел.сн.1.20	+/-	+	-	-	-
33	Зел.сн.4.5	+/-	+	-	-	-
34	Зел.сн.7.5	+/-	+	-	-	-

Примечание – В графе рост «+» означает, что видны изолированные колонии по штриху, «+/-» - рост только в зоне медальона, «-» - отсутствие роста. Учёт результатов проводился через 6 дней после засева. В тесте с КОН: «+» - грамположительные, «-» - грамотрицательные.

2.2 Среда и растворы

Питательные среды

Полноценный питательный агар (ППА или ПА):

Питательный агар (Cat № 1060, CONDA, Испания)	26 г
NaCl	1,8 г
Питательный бульон (Cat №1216, CONDA, Испания)	11 г
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
Стерилизовали автоклавированием (1,5 атм, 121 °С, 15-20 мин).	

LB-бульон:

LB Broth (Lennox) (Cat № 1231, CONDA, Испания)	30 г
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
рН 7,0 – 7,2. Стерилизовали в автоклаве при 121 °С в течение 15 минут.	

Реактивы для выделения тотальной ДНК

TE:

1 М Трис-HCl рН 8,0	10 мл
0,5 М ЭДТА	2 мл
Дистиллированная (деионизированная вода)	до 1000 мл
Для работы с ДНК использовали раствор рН 8,0. Стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течении 15 минут на 3/4 атм.	

5 М NaCl:

NaCl	292,2 г
Дистиллированная (деионизированная) вода	893,5 мл
Реактивы для гель-электрофореза	
<u>Буфер TAE (50x):</u>	
Трис-ОН	242 г
ледяная уксусная кислота	57,1 мл
0,5 М ЭДТА (pH 8,0)	100 мл
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
<u>Буфер TAE (1x) с бромистым этидием:</u>	
буфер TAE (50x)	20 мл
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
водный раствор бромистого этидия (10 мг/мл)	50 мкл.
<u>0,8% агароза:</u>	
буфер TAE (1x)	100 мл,
агароза	0,8 г.
<u>10% ДСН (додецилсульфат натрия):</u>	
ДСН	10 г
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 100 мл.
Реактивы для газовой хроматографии	
<u>Для методики №1</u>	
Реагент №1 (NaOH-45 г, CH ₃ OH-150 мл, H ₂ O-150 мл)	
Реагент №2 (6 М HCl-325 мл, CH ₃ OH-275 мл)	
Реагент №3 (C ₆ H ₁₄ -200 мл, CH ₃ OC(CH ₃) ₃ -200 мл)	
Реагент № 4 (NaOH-10,8 г, H ₂ O-900 мл)	
<u>Для методики №2</u>	
2% раствор метилата натрия в метаноле	0,5 мл
Гексан	0,5 мл
Дистиллированная (деионизированная) вода	0,5 мл
Реактивы для анализа каротиноидов	
<u>Методика №1</u>	
ДМСО	0,2 мл
Метанол абс.	0,2 мл
<u>Методика №2</u>	
Метанол абс.	5 мл
Реактивы для изучения антагонистической активности	
<u>Солевой концентрат М9 (г/л)</u>	
Na ₂ HPO ₄	60
KH ₂ PO ₄	30
NaCl	5
NH ₄ Cl	10

Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
<u>1М MgSO (г/л)</u>	
MgSO ₄ ×7H ₂ O	246,48
Дистиллированная (деионизированная) вода	865,52 мл
<u>1М CaCl₂ (г/л)</u>	
CaCl ₂	110,98
Дистиллированная (деионизированная) вода	974,52 мл
<u>2% Агар (г/л)</u>	
Питательный агар (Cat № 1060, CONDA, Испания)	20
Дистиллированная (деионизированная) вода	до 1000 мл
pH – 7,2. Для приготовления глюкозо-солевой среды в стерильный флакон добавляли 30 мл солевого концентрата; 6 мл стерильного раствора 20 % глюкозы; 3 мл 0,1 М раствора MgSO ₄ ; 3 мл 0,01 М раствора CaCl ₂ . Полученную смесь доводили до 300 мл 2 % агаром. Для приготовления 0,7 % агаризованной глюкозо-солевой среды полученную смесь доводили до 300 мл 2 % агаром.	

Реактивы для определения ферментативных активностей

<u>Липолитической (г/л)</u>	
13% Твин 80	10
Пептон	10
NaCl	5
CaCl ₂ ×H ₂ O	0,1
Агар-агар	20
pH 7,4. Готовили среду без твина и стерилизовали при 1,0 атм. Водный раствор твина соответствующей концентрации стерилизовали отдельно при 0,5 атм и добавляли к стерильной основной среде.	
<u>Амилолитической (г/л)</u>	
Пептон	10
КН ₂ РO ₄	5
Растворимый крахмал 0,2%	2
Агар-агар	15
pH 6,8-7,0. Среду стерилизовали при 1,5 атм.	
<u>Целлюлолитической (мл/л)</u>	
4х (солевой концентрат)	10
Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) 2%	1
Глюкоза 20%	1
CaCl ₂	200
MgSO ₄	400
Водный агар 2%	до 1000
<u>Протеолитической (Calcium Caseinate Agar) (г/л)</u>	

Са-казеиновый агар (Conda, Cat. №1069)	29,2
Дистиллированная вода	до 1000

pH $7,2 \pm 0,2$ при 25 °C. Разводили 29,2 г среды в 1 литре дистиллированной воды. Тщательно перемешивали и доводили до кипения. Кипятили в течение минуты до полного растворения. Разливали в ёмкости и стерилизовали 15 минут при 121°C. Разливали в чашки Петри, вращая среду для ресуспендирования осадка. Готовую среду хранили при 8–15 °C.

Протеолитической (Обезжиренное молоко) (мл/л)

4x (солевой концентрат)	250
Обезжиренное молоко 5%	100
Глюкоза 20%	10
1M CaCl ₂	200
1M MgSO ₄	400
Водный агар 2%	до 1000

Все компоненты готовились и стерилизовались отдельно, молоко стерилизовалось кипячением в течение 30 минут.

Протеолитической (Желатин) (г/л)

NaCl	6
LB-бульон	11,6
Желатин пищевой 15%	150
Пептон	1
NaCl	5
Глюкоза (декстроза)	1
КН ₂ РO ₄	2
Феноловый красный	0,012
Мочевина	20
Агар-агар	20
Дистиллированная вода	до 1000

pH $6,7 \pm 0,2$ при 25 °C. Разводили все ингредиенты в 30 мл дистиллированной воды и пропускали через стерилизующий фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Отдельно готовили минимальный агар на 300 мл дистиллированной воды, кипятили до растворения и автоклавировали при 121 °C в течение 15 минут. Охлаждали агар до 50-55 °C и добавляли 30 мл стерилизованной фильтрацией мочевины, тщательно перемешивали. Готовили скошенный агар по 4-5 мл на стерильную пробирку.

Дезоксирибонуклеазная активность (г/л)

Агар для теста на ДНКазу (CONDA, Cat №1028)	42
Дистиллированная вода	До 1000

pH $7,3 \pm 0,2$ при 25 °C. Хорошо перемешивали и растворяли при нагревании при частом помешивании. Кипятили в течение одной минуты до полного

растворения. Стерилизовали в автоклаве при 121 °С в течение 15 минут. Охлаждали до 45-50 °С, хорошо перемешивали и разливали в чашки Петри. Готовую среду хранили при 8–15 °С. Цвет среды синий (среда содержит краситель толуидиновый синий), немного опалесцирующий.

Пектолитическая активность (г/л)

ПА	до 1000
1 М СаCl ₂	25
Полипектат натрия 2%	20

Готовили питательный агар. Отдельно готовили полипектат натрия и 1 М СаCl₂. Стерилизовали полипектат натрия кипячением 30 минут. В стерильный и охлажденный до 50 °С ПА добавляли соль, заливали среду в чашки Петри. После того как среда застывала, наслаивали стерильный полипектат по 4 мл на чашку.

Реактивы для определения чувствительности к антибактериальным веществам методом бумажных дисков

Ампициллин (Ap), Стрептомицин (Str), Тетрациклин (Tc), Налидиксовая кислота (Nal), Эритромицин (Em), Гентамицин (Gm)	10 000 мкг/мл
Канамицин (Km)	25 000 мкг/мл
Рифампицин (Rif)	34 000 мкг/мл

2.3 Методы исследования

2.3.1 Получение бактерий в лиофилизированном состоянии

Одиночную колонию бактерий вносили в колбу объемом 50 мл заполненную 10 мл LB. Культуру выращивали с умеренной аэрацией при 180 об/мин в течении 12 часов при оптимальной температуре 25-28 °С. Для получения культуры клеток в нужной фазе роста, аликвоту из ночной культуры разбавляли в 250 раз. После разбавления клетки выращивали в течении 7 – 7,5 часов до достижения логарифмической стадии роста. По истечению заданного времени клетки осаждали в центрифужных пробирках на 15 мл в течении 5 мин при 8000 об/мин на центрифуге. Полученный концентрированный препарат клеток хранили при – 80 °С для последующей лиофилизации. Лيوфильная сушка проводилась на приборе ilShinBioBase (Корея) при следующих параметрах: температура -55 °С, вакуум – 0,05 микротор, время – 48 часов.

2.3.2 Манипуляции с нуклеиновыми кислотами

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Расплавленный и остуженный до 50 °С агарозный гель (0,8 %) заливали в форму, куда предварительно была установлена гребенка для формирования лунок. После застывания гель переносили в камеру для проведения горизонтального геля электрофореза и заливали её ТАЕ-буфером (1х) с бромистым этидием. В лунки, расположенные на одинаковом расстоянии от электродов, вносили раствор ДНК, предварительно смешанный с загрузочным буфером (6х). В одну из лунок вносили имеющийся в распоряжении маркер длин ДНК. Электрофорез проводили при градиенте напряжения 10-15 В/см, в течение 30 мин. Для визуализации и документирования результатов электрофореза применяли систему цифровой документации видеоизображения ChemiDoc MP (BioRad). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве маркера молекулярного веса ДНК использовали GeneRuler™ DNA Ladder Mix производства ThermoScientificBio (EU).

Полимеразная цепная реакция

Для амплификации фрагмента 16S рДНК с целью его последующего секвенирования использовали универсальные эубактериальные праймеры 8f (agagtttgatcctg gctcag) и 1492r (ggttacctgttacgactt). Размер получаемого ПЦР продукта составлял \approx 1500 п.н. Для оптимизации температуры отжига праймеров проводили ПЦР с градиентом температур отжига. По результатам подбора температуры отжига для накопления бактериальной ДНК была выбрана программа амплификации для дальнейшей работы (1 цикл – 3 мин при 98 °С; 30 циклов при 98 °С 30 сек, 51 °С 30 сек, 72 °С 1 мин; 1 цикл – 72 °С 4 мин). В качестве отрицательного контроля вместо матрицы вносили деионизованную воду в эквивалентном количестве. Продукты амплификации разделяли в 0,8% агарозном геле.

Лигирование

Лигирование продуктов ПЦР с коммерческим вектором pJET1.2/blunt проводили в реакционной смеси, содержащей буфер для лигирования, 5% полиэтиленгликоль (ПЭГ) 4000, лигазы – 2,5 ед. Вейса при 22 °С в течение 1 часа. **Инактивацию лигазы** проводили смесью хлороформ: изоамиловый спирт в отношении 1:1.

Трансформацию компетентных клеток бактерий *E. coli* XL1-Blue, проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве электропоратора MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad Laboratories, США) [7].

Выделение плазмидной ДНК из бактерий осуществляли методом щелочного лизиса [8]. После подтверждения наличия плазмиды со вставкой из

аналогичной аликвоты клеток выделяли плазмидную ДНК с использованием набора для выделения плазмидной ДНК GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit производства ThermoScientificBio (EU) согласно инструкции производителя. Препарат плазмидной ДНК, выделенный с помощью набора, использовали для секвенирующей реакции.

Рестрикцию плазмидной ДНК осуществляли рестриктазами HindIII и PstI согласно рекомендациям фирмы производителя ThermoScientificBio (EU).

Секвенирование нуклеотидной последовательности проводили по методу Сенгера [9]. Для секвенирования общую реакционную смесь готовили отдельно для каждого праймера. Конечное количество реакционной смеси составляло 20 мкл. Секвенирование осуществляли с помощью набора реактивов «DNA Cycle Sequencing Kit» (Jena Bioscience GmbH, Германия) и меченых флуоресцентной меткой Cy5.5 праймеров pJET1.2/blunt forward (cgactcactatagggagagcggc) и pJET1.2/blunt reverse (aagaacatcgattttccatggcag) («Праймтех», РБ). Продукты секвенирующей реакции детектировали с помощью автоматического секвенатора «4300 DNA Analyzer» (Li-COR Biosciences, США).

2.3.3 Обработка результатов секвенирования

Полученную в ходе секвенирования нуклеотидную последовательность проверяли на принадлежность к определенному бактериальному таксону в базе данных нуклеотидных последовательностей ГенБанк с помощью алгоритма BLAST [10]. Затем сохраняли несколько наиболее схожих последовательностей для каждого образца и выполняли их множественное выравнивание с помощью алгоритма ClustalW, являющегося компонентом программы MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) 7.0. Далее проводили множественное выравнивание для всех полученных выравниваний [11].

2.3.4 Построение филогенетического дерева

В программе MEGA 7.0 для полученного файла со всеми выравненными последовательностями нуклеотидов, анализируемых образцов методом максимального правдоподобия с использованием информационного критерия Байеса (BIC) автоматически была подобрана оптимальная математическая модель нуклеотидных замен с наименьшим значением BIC. При построении

дерева использовали метод присоединения ближайших соседей (neighbour-joining, NJ) [11].

2.3.5 Газохроматографический анализ

Выделение метиловых эфиров жирных кислот и проведение газовой хроматографии

Для исследования состава жирных кислот клеточной стенки бактерий изучаемые штаммы культивировали в LB при 25 °C в течении 24 часов с умеренной аэрацией. Для анализа использовали осажденные из ночной культуры клетки бактерий (влажная биомасса), либо предварительно лиофилизированные (сухая биомасса). Экстракцию метиловых эфиров жирных кислот проводили с использованием двух методик.

1) (Шерлок МИДИ (Sherlock MIDI)) Стандартная методика по выделению метиловых эфиров жирных кислот [5].

2) Этерификация свободных жирных кислот с использованием метилата натрия [12].

Методика №1

К 5-10 мг сухой биомассы или 100 мг сырого веса бактерий добавляли 0,5 мл 1% метилата натрия, встряхивали на вортексе 5-10 сек. Инкубировали 10-20 минут при комнатной температуре периодически слегка перемешивая. Добавляли 0,5 мл воды (деионизированной) и 0,5 мл гексана, встряхивали на вортексе 1-2 мин. Центрифугировали 20 минут на 4000 об/мин. Отбирали верхнюю органическую фазу в вials на хроматографический анализ.

Методика №2 (валидация условий)

К 10 мг сухой биомассы или 100 мг сырого веса бактерий добавляли 0,5 мл 1% метилата натрия, встряхивали на вортексе 40 мин – 1 час. Добавляли 0,5 мл воды (деионизированной) и 0,5 мл гексана, встряхивали на вортексе 1-2 мин. Центрифугировали 20 минут на 4000 об/мин. Отбирали верхнюю органическую фазу в вials на хроматографический анализ.

Газовая хроматография

Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовом хроматографе 7890B (Agilent Technologies), оборудованного пламенно-ионизационным детектором. Капиллярная колонка HP-5 (Agilent Technologies), 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, газ-носитель – гелий, скорость потока – 1,1 мл/мин. Температура испарителя – 250 °C, начальная температура термостата колонки 150 °C 4 мин, затем повышение от 150 °C до 250 °C со скоростью 4 °C в минуту, 250 °C 4 мин. В качестве внешнего стандарта использовалась смесь метиловых эфиров бактериальных жирных кислот, длиной от 10 до 20 атомов углерода

(«Bacterial Methyl Esters Mix», Sigma Aldrich) и однокомпонентные стандарты метиловых эфиров олеиновой, пальмитиновой, стеариновой, линолевой и миристиновой кислот (Sigma Aldrich).

Обработка результатов газовой хроматографии и масс-спектрометрии

Обработку осуществляли в программе STATISTICA 10.0. Для вычисления расстояния между объектами определяли Евклидово расстояние [13]. Для объединения полученных кластеров между собой применялся метод невзвешенного попарного среднего наиболее часто используемый для анализируемого типа данных.

2.3.6 Изучение ферментативных активностей

Для выявления **липолитической** активности исследуемые микроорганизмы высевали на среду содержащую определённый липид [14]. В качестве положительного контроля использовали культуру *B. pumilus* P10, отрицательного *E. coli* XL1-Blue.

При анализе **амилолитической** активности использовали среду с растворимым крахмалом как описано в [14]. В качестве положительного контроля использовали культуру *B. pumilus* 106, отрицательного *E. coli* XL1-Blue.

Для определения **целлюлолитической** активности проводили посев исследуемых микроорганизмов на поверхность минимальной глюкозо-солевой среды, содержащей 0,2% карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) [15]. В качестве контрольных культур, использовали *E. coli* XL1-Blue – отрицательный контроль и *B. pumilus* P10 в качестве положительного контроля.

В качестве субстрата для определения **уреазной** активности использовали агар Христенсена с мочевиной [16]. Положительным контролем для оценки приготовленной среды применяли КОН в первом опыте и далее во втором и последующих использовали штаммы, которые дали положительную реакцию в первом опыте, отрицательным контролем служили бактерии *E. coli* XL1-Blue.

Протеолитическую активность оценивали по способности культур бактерий к разжижению желатина и гидролизу казеина [15]. В качестве положительного контроля использовали культуру *B. pumilus* B-106, отрицательного *E. coli* XL1-Blue.

Дезоксирибонуклеазная активность была проверена на коммерческой среде по инструкции, представленной на сайте производителя [17]. В качестве отрицательного контроля использовали культуру *E. coli* XL1-Blue.

Экстракцию пигментов каротиноидной природы проводили двумя разными методами, которые были использованы авторами для извлечения пигментов разных цветов. **Метод №1** (для экстракции красно-оранжевых пигментов) осуществляли по инструкции описанной в [18]. Отфильтровывали супернатанты (экстракты каротиноидов), используя 0,45 мкм фильтр из генерированной целлюлозы. **Метод №2** (для выделения желтых пигментов) [19]. Полученную окрашенную надосадочную жидкость отделяли, затем фильтровали с помощью шприцевого фильтра с регенерированной целлюлозой. Полученные в ходе обоих методов экстракты изучали спектрофотометрически, на приборе Implen NanoPhotometer P-Class 330 при длинах волн 190-800 нм и хранили при -70 °С для последующих анализов. Бактерии *Pantoea agglomerans* 202 использовали как положительный контроль заведомо содержащий β-каротин.

Определение продукции антибактериальных веществ методом «отсроченного» антагонизма осуществляли по методике [20] в соответствии с техникой предложенной в 1957 году П.Фредериком для определения продукции бактериоцинов. В качестве культур-продуцентов антибиотических веществ выступали антарктические изоляты, а в качестве тест-культур использовали *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* 168, *E. coli* XL1-Blue, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 6531 и *Staphylococcus saprophyticus*.

Для определения чувствительности к антибактериальным веществам с помощью бумажных дисков исследуемые штаммы бактерий высевали газоном в чашке Петри на поверхность полноценного питательного агара. Чашки, с засеянной тест культурой, подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. На одной чашке одновременно проверяли устойчивость к 9 антибактериальным веществам. Диски из фильтровальной бумаги диаметром 8 мм заранее стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течении 15 минут. Стерильный диск фильтровальной бумаги располагали на поверхности питательного агара, засеянного тест-культурой. На каждый диск наносили по 3 мкл раствора антибактериального вещества. Чашку с тест организмом и бумажными дисками инкубировали при температуре, оптимальной для роста тест-организма, в течение как минимум 48 часов. При наличии чувствительности к антибактериальным веществам вокруг диска образуется зона задержки роста тест-микроорганизма.

ГЛАВА 3

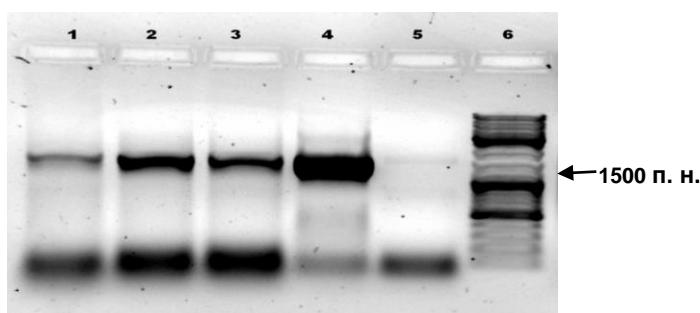
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы высевали бактерии, подлежащих дальнейшему изучению, на полноценный питательный агар. После восстановления роста и деления клеток, длительно хранившихся в замороженном состоянии и получении изолированных колоний, визуально оценивали чистоту культуры. На следующей стадии культивировали бактерии для последующих физиологических и генетических анализов.

С целью молекулярно-генетической идентификации бактерий была запланирована постановка ряда секвенирующих реакций. На начальной стадии выделяли тотальную ДНК бактерий с использованием коммерческого набора «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-206S, Jena Bioscience, Германия). На матрице ДНК получали целевой фрагмент путем амплификации гена 16S рРНК с использованием пары праймеров 8f и 1492r. В результате проведения ПЦР были получены продукты размером 1500 п. н, которые соответствуют по размеру искомому продукту. (рисунок 3.1).

Было решено в качестве матрицы для секвенирующей реакции использовать не ПЦР-продукт, а плазмиду со вставкой целевого фрагмента ДНК, так как такая стратегия обеспечивает наилучшее прочтение. Однако данный подход более трудозатратен и содержит ряд генно-инженерных стадий, описанных далее.

Все операции с ДНК представлены только для четырех изолятов: 7т.1.5, 11т.4.20.1, 11т.2.20, Зел.сн.1.20 в силу схожести получаемых данных.



№ лунки/название изолята:

1 – 16 (7т.1.5);

2 – 23 (11т.4.20.1);

3 – 25 (11т.2.20);

4 – 32 (Зел.сн.1.20);

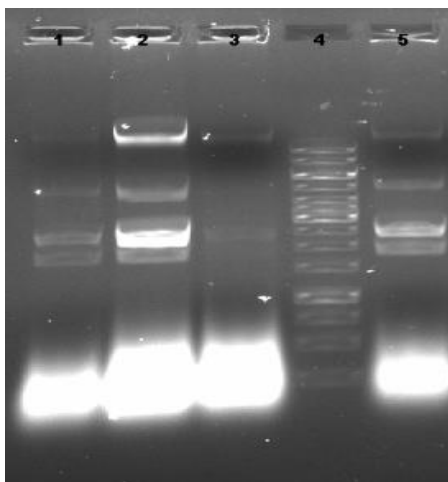
5 – отрицательный контроль (матрица – вода);

6 – маркер размерности ДНК (1 kb #SM0311, Fermentas)

Рисунок 3.1 – Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 16S рРНК антарктических бактерий с использованием пары праймеров 8f и 1492r

ПЦР продукт подвергали очистке, определяли его концентрацию и проводили лигирующую реакцию с вектором рJET1.2. Затем очищали смесь от ДНК-лигазы T4 и оценивали результат – размер полученных фрагментов, с помощью гель-электрофореза.

Продуктами лигазной реакции трансформировали клетки бактерий *E. coli* XL1-Blue, с последующим высевом на селективную среду – чашки с ПА и ампициллином в концентрации 100 мкг/мл. Далее трансформантов пересевали на свежую питательную среду и выделяли из них методом щелочного лизиса плазмидную ДНК с целью проверки плазмид на наличие искомой вставки. Ночные культуры бактерий осаждали и выделяли плазмиды. Оценивали качество полученных препаратов ДНК с помощью гель-электрофореза (рисунок 3.2).



№ лунки/название изолята:

1– 16 (7т.1.5)

2– 23 (11т.4.20.1)

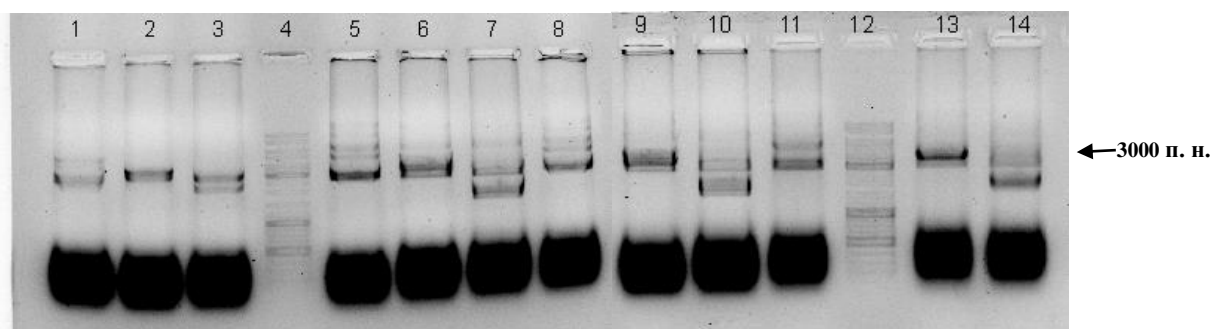
3– 25 (11т.2.20),

4 – маркер размерности ДНК (1 kb #SM0311, Fermentas)

5 – 32 (Зел.сн.1.20)

Рисунок 3.2 – Электрофореграмма плазмидной ДНК, выделенной щелочным лизисом

Затем проводили аналитическую рестрикцию плазмидной ДНК и оценивали размер полученных фрагментов путем проведения гель-электрофореза (рисунок 3.3).



Трансформант 16 (7т.1.5)
 1 – без рестриктазы; 2 – после HindIII; 3 – после HindIII и PstI
 Трансформант 23 (11т.4.20.1)
 5 – без рестриктазы; 6 – после HindIII; 7 – после HindIII и PstI
 Трансформант 25(11т.2.20)
 8 – без рестриктазы; 9 – после HindIII; 10 – после HindIII и PstI
 Трансформант 32 (Зел.сн.1.20)
 11 – без рестриктазы; 13 – после HindIII; 14 – после HindIII и PstI
 4, 12 – маркер размерности ДНК (1 kb #SM0311, Fermentas)

Рисунок 3.3 – Электрофореграмма продуктов рестрикции вектора pJET1.2 со вставкой фрагмента гена 16S рРНК

Пробы, для которых по результатам рестрикции выявляли наличие вставки в векторе, в дальнейшем подвергались очистке для последующего использования в качестве матрицы для реакции секвенирования.

Используя базы данных ГенБанка на сайте NCBI с помощью программы BLASTN2.2.1, проводили поиск последовательностей, схожих с полученными последовательностями фрагментов гена 16S рРНК. Полученные данные сравнили с данными идентификации МАЛДИ Biotyper. (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Сравнительная характеристика результатов идентификации изолятов, полученных с помощью секвенирования участка гена 16S рРНК и «МАЛДИ Биотайпер» (Брукер Дальтоник, Германия)

№	Изоляты	Секвенирование участка гена 16S рРНК	Идентичность (фрагментов с праймеров 8F и 1492R)	МАЛДИ Biotyper	Достоверность идентификации
1	1т.1.5.1	<i>Shewanella baltica</i>	541/606 (89%)	<i>Shewanella baltica</i>	2.05
2	1т.3.20.1	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1433/1450 (99%)	<i>Pseudomonas lundensis</i>	2.072
3	2т.2.5.2	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1470/1483(99%)	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1.886
4	2т.5.20.1	<i>Pseudomonas lundensis</i>	1469/1483(99%)	<i>Pseudomonas lundensis</i>	2.043
5	2т.5.20.2	<i>Shewanella baltica</i>	1479/1501(99%)	<i>Shewanella baltica</i>	1.996
6	3т.5.20	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	8F-748/756 (99%) 1492R - 708/719 (98%)	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1.878

Продолжение таблицы 3.1

7	5т.1.5	<i>Pseudomonas guineae</i>	717/724 (99%) 683/691 (99%)	<i>Pseudomonas veronii</i>	1.47
9	5т.2.5.1	<i>Pseudomonas peli</i> или <i>guinea</i>	1452/1475(98%) 1448/1475(98%)	не достоверная идентификация	1.402
11	6т.2.5	<i>Shewanella baltica</i>	1485/1503(99%)	не достоверная идентификация	1.644
12	6т.3.5.2	<i>Carnobacterium inihbens</i>	1500/1520(99%)	не достоверная идентификация	1.345
13	6т.4-2.20	<i>Flavobacterium degerlachei</i>	1423/1443(99%)	не достоверная идентификация	1.392
14	6т.4.5	<i>Shewanella baltica</i>	1464/1501(98%)	<i>Shewanella baltica</i>	2.122
16	7т.1.5	<i>Brachybacterium conglomeratum</i>	1452/1458 (99%)	<i>Brachybacterium faecium</i>	1.874
17	7т.2.5.1	<i>Pseudomonas peli</i> или <i>guinea</i>	1466/1475(99%) 1462/1475(99%)	не достоверная идентификация	1.546
19	7т.4.20.2	<i>Pseudomonas guinea</i> или <i>peli</i>	1460/1475(99%) 1450/1475(98%)	не достоверная идентификация	1.573
21	9т.4.5	<i>Micrococcus luteus</i>	1471/1482 (99%)	<i>Micrococcus luteus</i>	1.866
23	11т.4.20.1	<i>Agrococcus sp.</i> (<i>jenensis</i> или <i>citreus</i>)	1451/1461 (99%) 1411/1415 (99%)	не достоверная идентификация	1.403
25	11т.2.20	<i>Pseudomonas peli</i> или <i>guinea</i>	1468/1475 (99%) 1464/1475 (99%)	не достоверная идентификация	1.539
26	11т.5.5	<i>Pseudomonas peli</i> или <i>guinea</i>	1464/1476 (99%)	не достоверная идентификация	1.519
28	11т.7.20.2	<i>Carnobacterium iners</i>	1509/1511 (99%)	не достоверная идентификация	1.431
30	Хт.6.20.4	<i>Leifsonia rubra</i>	1507/1528 (99%)	не достоверная идентификация	1.351
31	Керн 2	<i>Pseudomonas libanensis</i>	1487/1488 (99%)	<i>Pseudomonas orientalis</i>	1.861
32	Зел.сн.1.20	<i>Pseudomonas peli</i> или <i>guinea</i>	1349/1357 (99%) 1344/1356 (99%)	не достоверная идентификация	1.510

Примечание – 2.300 ... 3.000 – высокая вероятность идентификации вида; 2.000 ... 2.299 – идентификация до рода, возможная идентификация вида; 1.700 ... 1.999 – не достоверная идентификация [21].

Для определения степени сходства секвенированных последовательностей осуществляли построение филогенетического дерева в программе MEGA 7.0. На полученном филогенетическом дереве можно выделить условные кластеры – два представлены грамотрицательными бактериями и два грамположительным бактериям (рисунок 3.4).

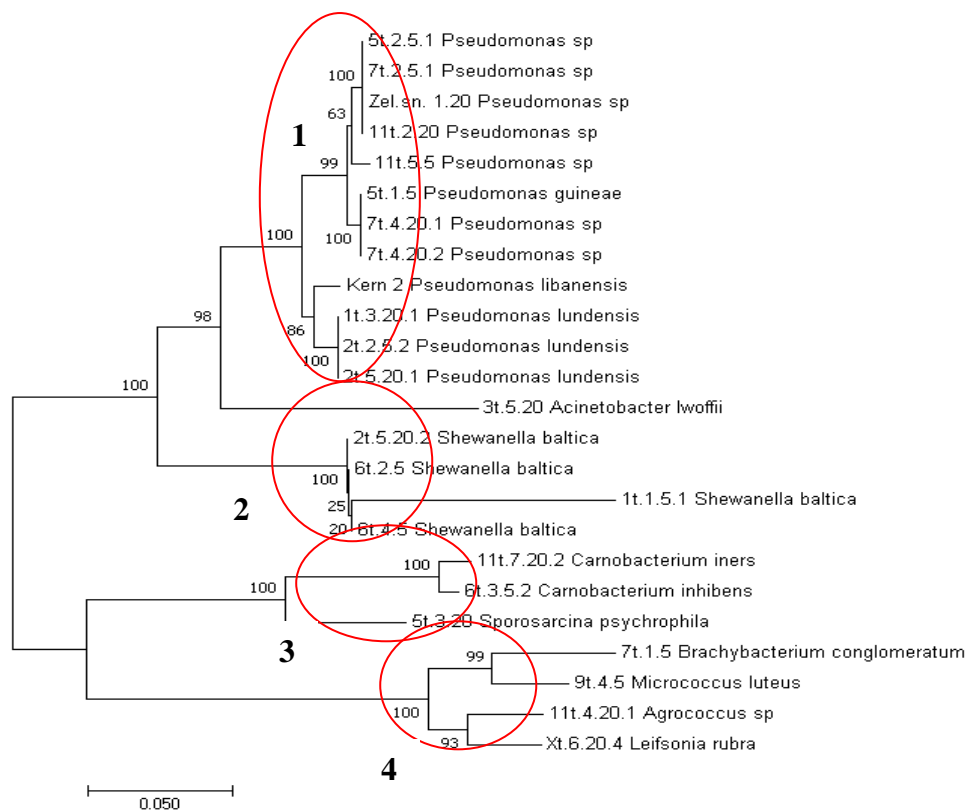


Рисунок 3.4 – Филогенетическое дерево фрагментов гена 16S рРНК антарктических изолятов и ближайших гомологов

Для идентификации бактерий, а также для их сравнительной характеристики используется метод ГХ МЭЖК. Так как у нас нет специализированного программного обеспечения и доступа к базам данных спектров МЭЖК различных бактерий, то для нас было интересно посмотреть, возможно ли только по результатам анализа метиловых эфиров жирных кислот разделить их на родственные группы, а заодно посмотреть и сравнить качественный состав жирных кислот различных психротолерантных бактерий. Поэтому, на следующем этапе работы проводили оптимизацию процедуры выделения метиловых эфиров жирных кислот и выбор методики, позволяющей получить наиболее развернутый профиль жирных кислот.

На начальных этапах выполнения процедуры оптимизации была проверена зависимость выделения метиловых эфиров жирных кислот от исходного состояния клеток бактерий, для этого использовали лиофилизированную культуру клеток (сухую биомассу) и биомассу, полученную в результате осаждения ночной культуры. Исходя из полученных данных можно отметить, что наиболее развернутый профиль жирных кислот получался с применением метилата натрия (методика №2) при экстрагировании жирных кислот из лиофилизированных клеток.

По выбранной методике проводили газовую хроматографию метиловых эфиров жирных кислот, для всех изучаемых изолятов бактерий. Дополнительно анализу подвергали контрольные микроорганизмы в качестве которых

выступили такие культуры, как *Lactococcus lactis*, *Rhodococcus crythropolis*, *Bacillus pumilus* F6, *Bacillus subtilis* 168.

Профили изучаемых бактерий состояли из 3-20 жирных кислот, большинство из которых были насыщенными. Количественные и качественные различия по жирным кислотам между изолятами позволили на основании полученных данных провести кластерный анализ в программе STATISTICA 10.0. (рисунок 3.5). Для обработки результатов и объединения кластеров использовали метод невзвешенного попарного среднего, который проявил себя как более подходящий для имеющегося типа данных. Формировались кластеры, сходные с кластерами, построенными на основе результатов секвенирования.

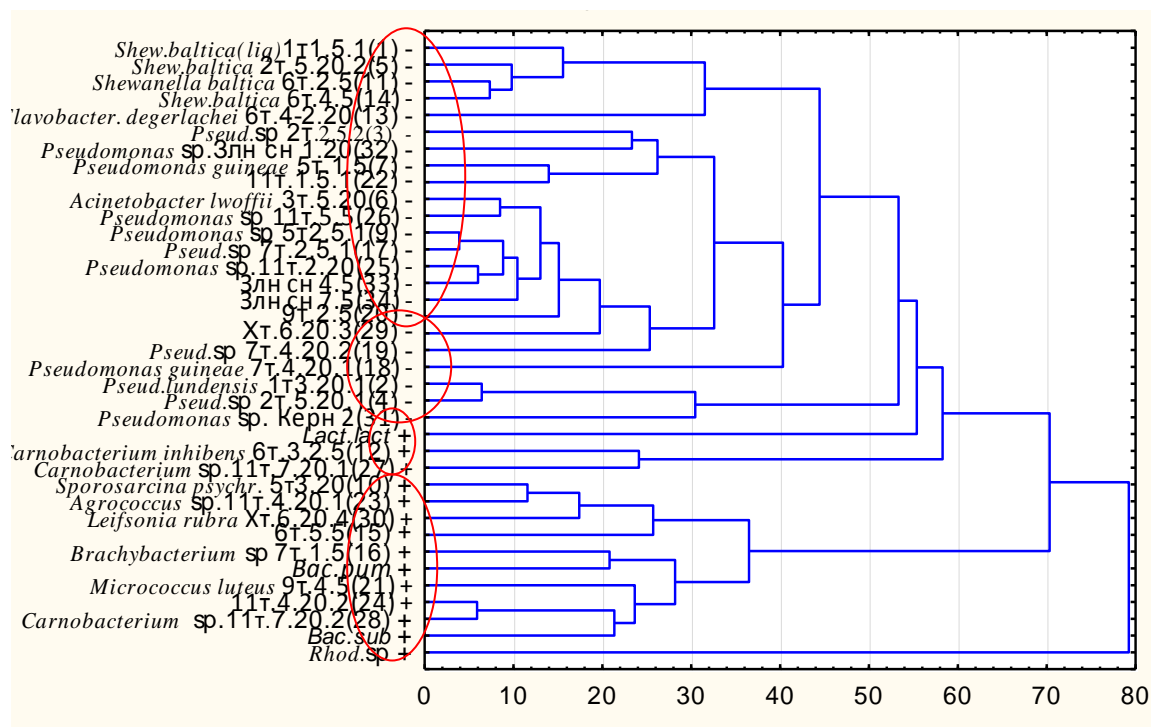


Рисунок 3.5 – Дендрограмма для 37 переменных по данным газовой хроматографии построенная на основании метода кластеризации путем определения Евклидова расстояния и объединения кластеров методом невзвешенного попарного среднего

С помощью газовой хроматографии не удалось идентифицировать многие метиловые эфиры жирных кислот, т.к. они не соответствовали по времени выхода с колонки доступным нам стандартам. Поэтому нами были проведены дополнительные исследования метиловых эфиров жирных кислот с использованием газовой хроматографии с масс-детекцией.

Масс-спектрометрия позволяет определить соединение с определенным процентом достоверности. Необходимо отметить, что психрофильные антарктические изоляты характеризуются большим разнообразием метиловых эфиров жирных кислот чем контрольные мезофильные организмы. Данные

полученные с помощью масс-детектора также подвергали кластерному анализу в программе STATISTICA 10.0 (рисунок 3.6).

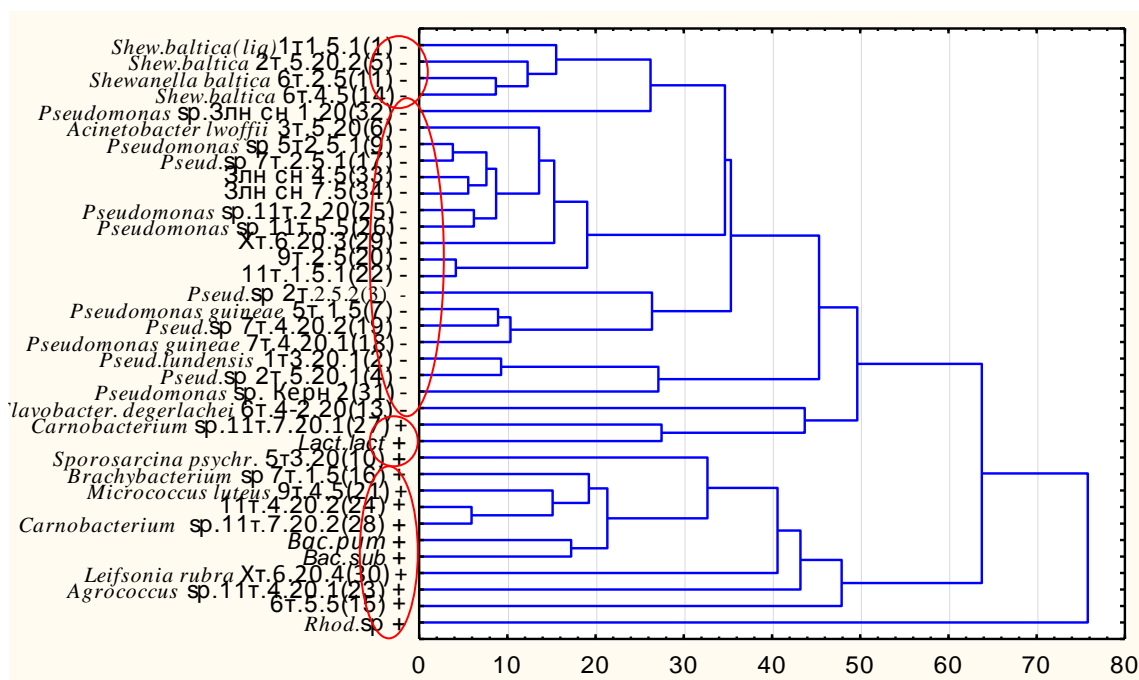


Рисунок 3.6 – Дендрограмма для 37 переменных по данным газовой хроматографии с масс-детектором построенная на основании метода кластеризации путем определения Евклидова расстояния и объединения кластеров методом невзвешенного попарного среднего

Можно отметить что независимо от прибора для анализа проб, на основе получаемых данных, формируются относительно устойчивые кластеры, что свидетельствует об удовлетворительной воспроизводимости и соблюдении всех условий при выделения метиловых эфиров жирных кислот и их анализе. Метод кластеризации на основе данных по газовой хроматографии с пламенно ионизационным детектором является достаточно быстрым, что позволяет использовать его для разделения большого количества микроорганизмов по группам в соответствии с качественными и количественными различиями в составе жирных кислот бактерий.

Для изучения ферментативной активности бактерий были выбраны наиболее распространённые группы ферментов: протеолитические, липолитические, эндонуклеазные и др. Все опыты были проведены дважды. В ходе исследования ферментативных активностей были получены результаты по различным группам ферментов для всех изолятов. Среди них высокой липолитической активностью обладали в основном грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas* и *Shewanella*. Согласно литературным данным, наличие данной группы ферментов может быть связано с адаптацией к низкотемпературным условиям существования. Несколько грамположительных

бактерии продуцируют амилалитические и целлюлолитические ферменты: *Micrococcus luteus*, *Carnobacterium iners*, *Agrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. Различные группы протеолитических ферментов хорошо выражены у *Pseudomonas lundensis*, *Shewanella baltica*. Некоторые бактерии *Sporosarcina psychrophila*, *Brachybacterium* sp. и представители рода *Pseudomonas* оказались уреазоположительные – это свидетельствует о том, что данные изоляты расщепляют мочевину и хорошо растут при pH среды, близкой к 11. Такая адаптивная способность может быть связана с условиями окружающей среды обитания (типом водоема или почвы). У представителей *Shewanella baltica* была обнаружена нуклеазная активность как возможный механизм защиты от фагов или чужеродных нуклеиновых кислот. Пектолитическая активность не обладал ни один из исследуемых изолятов.

Как указывалось, в литературном обзоре, одной из адаптаций бактерий к повышенному УФ излучению и холоду является продукция каротиноидов. Отбор изолятов для определения наличия каротиноидов проводили визуально, по цвету колоний, образуемых на плотных питательных средах. В качестве контрольного образца использовали культуру *Pantoea agglomerans* 202 продуцирующую β-каротин (рисунок 3.7).

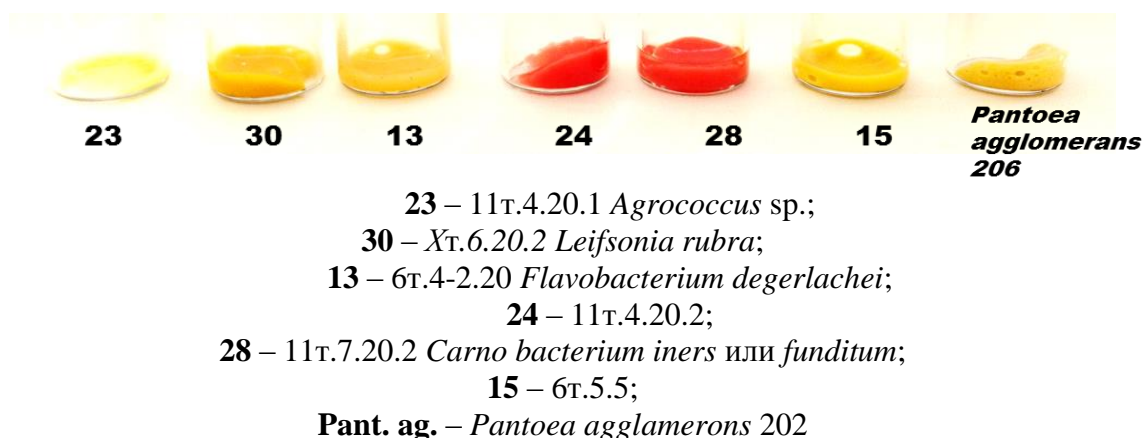


Рисунок 3.7 – Изюляты бактерий с предполагаемой способностью к продукции каротиноидов

На основании общего вида полученных спектров можно выделить две основных группы – с диапазоном поглощения в видимой области спектра 400-500 нм и 450-550 нм. (рисунок 3.8). Согласно литературным данным это могут быть каротиноиды (каротины и ксантофилы) представляющие собой ненасыщенные углеводороды и антоцианы, относящиеся к ароматическим соединениям. У изучаемых бактерий данные пигменты не выделялись в среду, что говорит об их нерастворимости в воде.

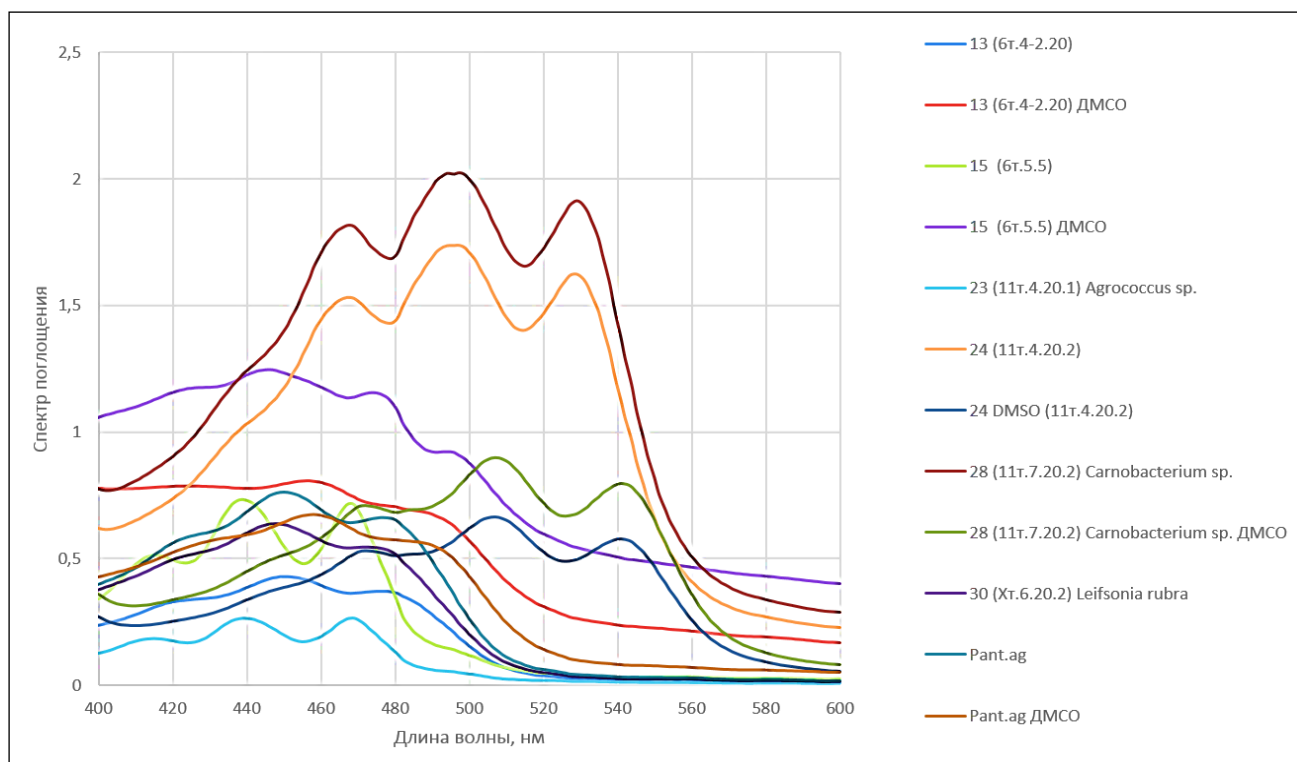


Рисунок 3.8 – Спектры поглощения пигментных экстрактов, выделенных из бактерий разными методами

В результате проведенных исследований было показано, что спектральные характеристики, а, следовательно, состав и структура пигментов, извлеченных из бактерии зависят от природы экстрагирующих агентов, что должно учитываться при их извлечении из сырья и дальнейшем определении. При использовании метода с ДМСО лучше выделялись пигменты желтого цвета у изолятов 13 и 15, а с помощью методики без использования данного реагента спектры поглощения были выше у изолятов 24 и 28, содержащих оранжево-красные пигменты.

Важным этапом изучения бактерий является определение их устойчивости к антибиотикам и способности к продукции антимикробных соединений. Была проверена антагонистическая активность изолятов в отношении шести тест-культур: *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* XL1-Blue, *Bacillus subtilis* 168, *Staphylococcus aureus* 25925, *Staphylococcus aureus* 6531, *Staphylococcus saprofiticus* (рисунок 3.9). Изучаемые изоляты проявили активность только в отношении четырех тест-культур. Не наблюдалось активности в отношении *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* XL1-Blue. Наиболее активными оказались бактерии *Pseudomonas lundensis* в отношении представителей рода *Staphylococcus*, что представляется нам очень интересным и требует скорейшего дальнейшего изучения.

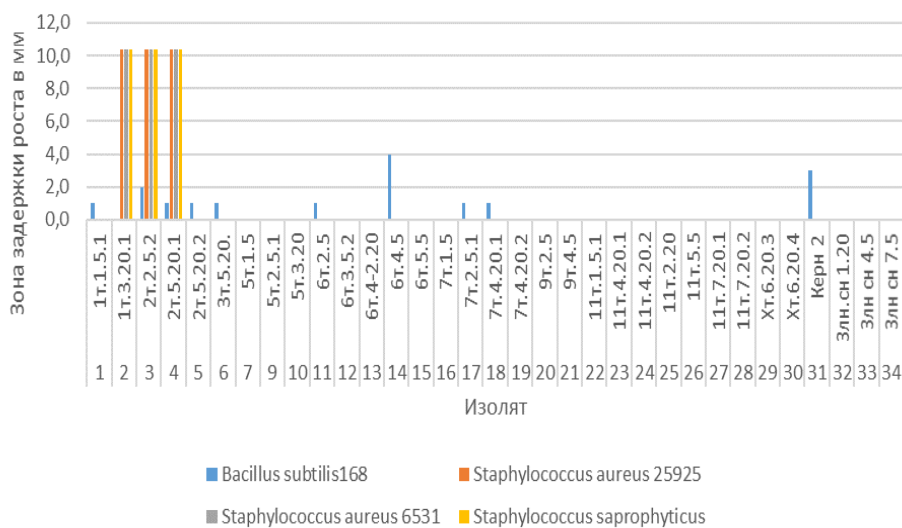


Рисунок 3.9 – Результаты определения продукции антибактериальных веществ методом «отсроченного» антагонизма

Следующим этапом стало определение антибиотикорезистентности (и не только антибиотико-) изучаемых изолятов. Результаты устойчивости к антибактериальным веществам были получены для одиннадцати изолятов из 34, что обусловлено медленным ростом клеток ряда изолятов в виде газона на твердой питательной среде.

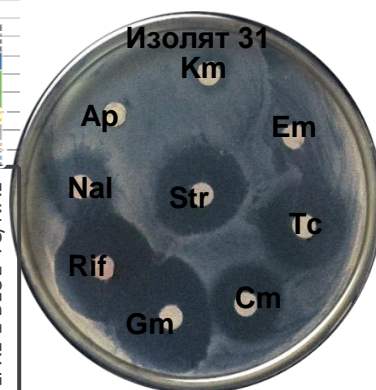
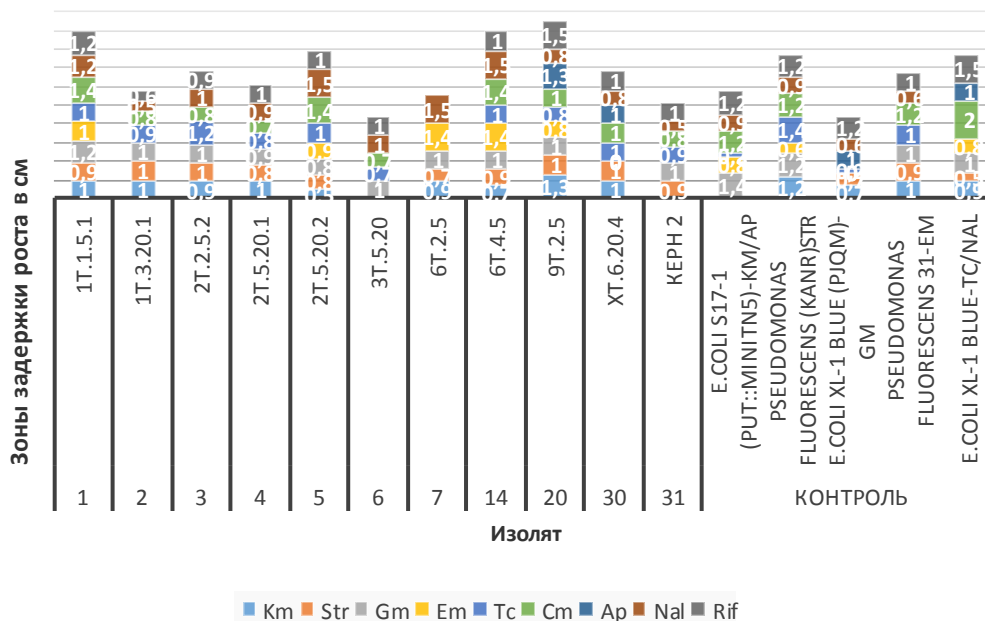


Рисунок 3.10 – Результаты определения чувствительности антарктических изолятов к антибактериальным веществам

Антарктические изоляты в разной степени чувствительны к различным группам антибактериальных веществ (рисунок 3.10). Все изоляты были чувствительны к антибиотикам группы аминогликозидов, также большинство чувствительны в отношении хлорамфеникола и рифампицина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В настоящей работе было идентифицировано 25 изолятов с применением метода секвенирования участка гена 16S рРНК.

2. Проведенное построение филогенетического дерева на базе последовательности гена 16S рРНК позволило выявить 4 условных кластера, два кластера включали грамотрицательных бактерий и два содержали представителей ветви грамположительных бактерий.

3. Дополнительный анализ метиловых эфиров жирных кислот, не идентифицированных с помощью газовой хроматографии, с помощью масс-спектрометрии позволил определить жирные кислоты, которые выделились в небольших количествах.

4. Метод кластеризации на основе данных метода газовой хроматографии МЭЖК достаточно быстрый, что позволяет использовать его для разделения большого количества микроорганизмов по группам в соответствии с качественными и количественными различиями в составе жирных кислот бактерий и соотносим по чувствительности с кластеризацией на основании построения филогенетического дерева на базе последовательности части гена 16S рРНК.

5. Выявлено, что пигменты антарктических изолятов разделяются на две основных группы – с диапазоном поглощения в видимой области спектра 400-500 нм и 450-550 нм. В результате проведенных исследований было показано, что спектральные характеристики, а, следовательно, состав и структура пигментов, извлеченных из бактерии зависят от природы экстрагирующих агентов.

6. Был проведен первичный качественный анализ ферментативной активности изолятов.

7. Была обнаружена повышенная антагонистическая активность представителей *Pseudomonas lundensis* в отношении представителей рода *Staphylococcus*.

8. Был проведен первичный анализ чувствительности к веществам антибактериальной природы.

Все задачи, поставленные в рамках данной работы, были выполнены. Предварительный анализ биотехнологического потенциала бактерий, изолированных на территории Антарктиды, свидетельствует о наличии перспективных свойств, которые могут быть детально изучены в дальнейших работах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest / I. Ferrés [et al.] // Chin. J. Polar Sci. – 2015, № 1 – P. 71-79.
2. Vipra Jadhav, A.Y. Isolation and cellular fatty acid composition of psychrotrophic Halomonas strains from Antarctic sea water / A.Y. Vipra Jadhav // Songklanakarin J. Sci. Technol. – 2013. – Vol. 35, № 3 – P. 58-76.
3. Amann, R.I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer // Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 59, № 1 – P. 143-169.
4. Phumudzo Tshikhudo, Ronald Nnzeru, Khayaletu Ntushelo and Fhatuwani Mudau. Bacterial species identification getting easier / Phumudzo Tshikhudo, Ronald Nnzeru, Khayaletu Ntushelo and Fhatuwani Mudau. – 2013. – Vol. 12, № 41 – P. 5975-5982.
5. Sasser, M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids [Электронный ресурс]. – Режим доступа: – <http://www.midi-inc.com/>– Дата доступа: 01.12.2017.
6. Мямин, В.Е. Физиолого-биохимическая характеристика бактерий, изолированных в участке вечерний оазиса холмы тала (восточная Антарктида) / В.Е. Мямин, С.К. Лозюк, А.В. Сидоренко, Л.Н. Валентович // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: мат. I международной науч.-практ. конф., к.п. Нарочь, 26 – 29 мая 2014 г. / Национальная академия наук Беларуси; редкол.: О.И. Бородин [и др.]. к.п. Нарочь, 2014. – С.193-197.
7. MicroPulser Electroporator | Научные исследования | Bio-Rad [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bio-rad.com/en-cn/product/micropulser-electroporator>. – Дата доступа: 15.11.2017.
8. Engebrecht, J. Minipreps of Plasmid DNA / J. Engebrecht, R. Brent, M.A. Kaderbhai // Current Protocols in Molecular Biology. – John Wiley & Sons, Inc., 2001.
9. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1977. – Vol. 74, № 12 – P. 5463-5467.
10. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch. – Дата доступа: 01.12.2017.



11. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28MEGA5, № 10 – P. 2731-2739.
12. Sasser, M. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids [Электронный ресурс]. – Режим доступа: – <http://www.midi-inc.com>. – Дата доступа: 01.12.2017.
13. A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition / N. Rozès [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1993. – Vol. 17, № 3 – P. 126-131.
14. Мандель, И. Кластерный анализ / И. Мандель. – Москва: Финансы и статистика, 1988. –176 с.
15. Биологический каталог. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://biocat.ru/ebook.php?file=egorov.djvu&page=36>. – Дата доступа: 01.12.2017.
16. Лысак, В.В. Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. Физиология микроорганизмов / В.В. Лысак, Е.И. Игнатенко. – Минск : БГУ, 2016. –96 с.
17. Методы идентификации грам (-) бактерий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://kbmk.kirov.ru/library/7/doc/1/index1.12.htm>. – Дата доступа: 15.11.2017.
18. Laboratorios CONDA: DNase Agar with Toluidine Blue [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.condalab.com/products/microbiology/condaproduct/microbiology/dehydrated-culture-media-for-microbiology//show/Categoria/2028/>. – Дата доступа: 15.11.2017.
19. Isolation, characterization, and diversity of novel radiotolerant carotenoid-producing bacteria / D. Asker [et al.] // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. – 2012. – Vol. 892 – P. 21-60.
20. Screening of Yellow Pigment Producing Bacterial Isolates from Various Eco-climatic Areas and Analysis of the Carotenoid Produced by the Isolate / I.A. P [et al.] // *J. Food Process. Technol.* – 2014. – Vol. 5, № 1 – P. 1-4.
21. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.bio.bsu.by/microbio/files/kurs_antibiotics_Zheldakova.pdf. – Дата доступа: 15.11.2017.
22. Bruker Corporation: Learn more MALDI Biotyper - Identifying Microorganisms by Their Molecular Fingerprint [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.bruker.com> – Дата доступа: 01.12.2017.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Презентация защиты выпускной работы

ТАЦОГРНПС




**БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ
ИЗ ВРЕМЕННЫХ ВОДОЕМОВ НА
ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ**

Акулова Ольга Дмитриевна,
магистрант биологического факультета БГУ

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Валентович Леонид Николаевич


Лаборатория «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»
Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, 2017



ТАЦОГРНПС

Содержание

- [Тема и руководитель](#)
- [Актуальность](#)
- [Поставленные цели и задачи](#)
- [Объект исследования](#)
- [Научная гипотеза](#)
- [Основные результаты](#)
- [Научная новизна](#)
- [Положения, выносимые на защиту](#)
- [Публикации](#)
- [Спасибо за внимание](#)



2

Актуальность

ТАЦОГРНИПСС



Исследование физиологических основ выживаемости микроорганизмов, связанное с особенностями их строения и функционирования в условиях вечной мерзлоты, способствует обнаружению биологически активных веществ с новыми свойствами для использования в биотехнологии, например, пигментов, жирных кислот, антимикробных соединений и холодоактивных ферментов

3

Цели и задачи исследования

ТАЦОГРНИПСС

Цель: изучение таксономического разнообразия и биотехнологического потенциала 33 бактериальных изолятов

• **Методы:** физиолого-биохимические (исследование физиолого-биохимических свойств) и молекулярно-генетические методы (выделение хромосомной ДНК, электрофорез в агарозном геле, ПЦР, трансформация, молекулярное клонирование, секвенирование).

• В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Идентификация бактерий с применением метода секвенирования фрагментов 16S рДНК.
2. Подбор методики выделения метиловых эфиров жирных кислот и дальнейшее качественное определение состава жирных кислот у антарктических изолятов бактерий с использованием метода газовой хроматографии.
3. Анализ метиловых эфиров жирных кислот, не идентифицированных с помощью газовой хроматографии, с помощью масс-спектрометрии.
4. Изучение ферментативных активностей изолятов антарктических бактерий.
5. Проверка антарктических изолятов на содержание пигментов каротиноидной природы.
6. Проверка антагонистических свойств у изучаемых бактерий.
7. Проверка антибиотикорезистентности бактериальных изолятов.

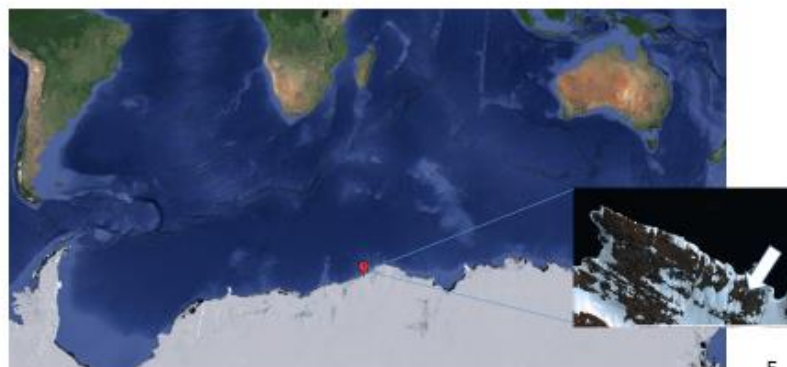
4

Объекты исследования

ТАЦОГРНИПСС

33 изолята бактерий, выделенных во время 5 Белорусской антарктической экспедиции (58 Российской антарктической экспедиции) в районе базирования полевой базы «Гора Вечерняя».

Район участка Вечерний оазиса Холмы Тала (стрелкой указана область мыса бухты Лазурная, из временных водоемов которой выделялись культуры микроорганизмов) (снимок Landsat, 2017)



5

Научная гипотеза

Исследование разнообразия и физиологических основ выживаемости микроорганизмов, изолированных на территории Антарктиды, связанное с особенностями их строения и функционирования в условиях вечной мерзлоты, может способствовать обнаружению биологически активных веществ с новыми свойствами для использования в биотехнологии, например, пигментов, жирных кислот, антимикробных соединений и холодоактивных ферментов и других перспективных способностей.

6

Основные результаты



Рисунок 1 – Филогенетическое дерево фрагментов гена 16S рРНК антарктических изолятов и ближайших гомологов

7

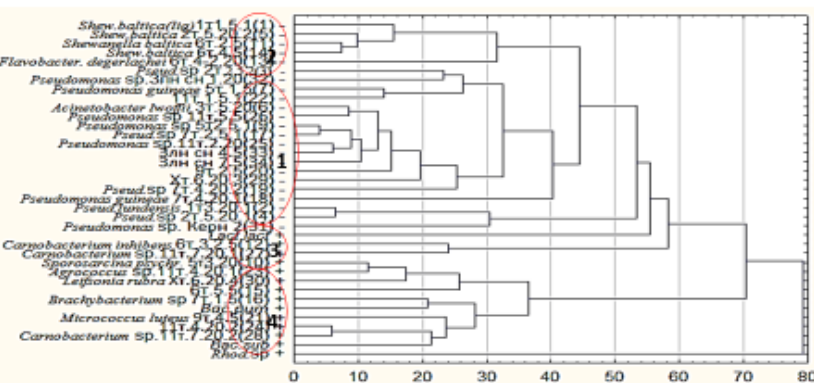


Рисунок 2 – Дендрограмма для 34 переменных по данным газовой хроматографии построенная на основании метода кластеризации путем определения Евклидова расстояния и объединения кластеров методом невзвешенного попарного среднего

➤ Количественные и качественные различия по жирным кислотам между изолятами позволили на основании полученных данных газовой хроматографии провести кластерный анализ в программе STATISTICA 10.0. Формировались кластеры, сходные с кластерами, построенными на основе результатов секвенирования, 2 и 1 представленными грамотрицательными бактериями а 3 и 4 грамположительными.

8

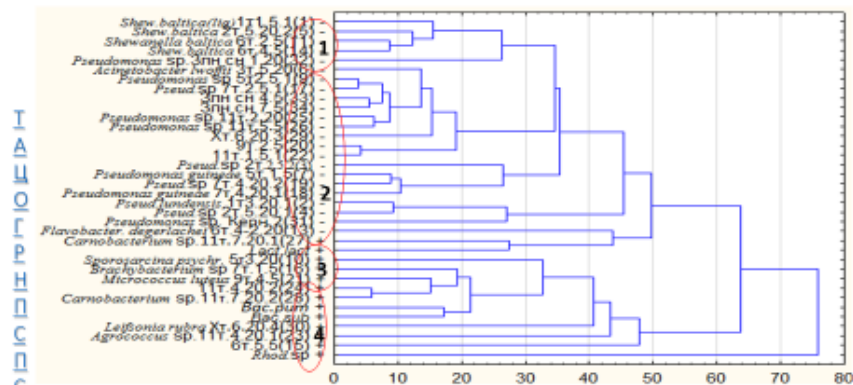


Рисунок 3 – Дендрограмма для 37 переменных по данным газовой хроматографии с масс-детектором построенная на основании метода кластеризации путем определения Евклидова расстояния и объединения кластеров методом невзвешенного попарного среднего

➤ Было отмечено что психрофильные антарктические изоляты характеризуются большим разнообразие метиловых эфиров жирных кислот чем контрольные мезофильные организмы. Данные полученные с помощью масс-детектора также подвергали кластерному анализу в программе STATISTICA 10.0. Формировались кластеры, сходные с кластерами, построенными на основе результатов секвенирования, 2 и 1 представлены грамотрицательными бактериями а 3 и 4 грамположительными как и по результатам обычной газовой хроматографии

9

➤ Для изучения ферментативной активности бактерий были выбраны наиболее распространённые группы ферментов: протеолитические, липолитические, эндонуклеазные и др. Среди них высокой липолитической активностью обладали в основном грамотрицательные бактерии родов *Pseudomonas* и *Shewanella*. Несколько грамположительных бактерий продуцируют амилолитические и целлюлолитические ферменты: *Micrococcus luteus*, *Carnobacterium iners*, *Agrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. Различные группы протеолитических ферментов хорошо выражены у *Pseudomonas lundensis*, *Shewanella baltica*. Некоторые бактерии *Sporosarcina psychrophila*, *Brachybacterium* sp. и представители рода *Pseudomonas* оказались уреазоположительные. У представителей *Shewanella baltica* была обнаружена нуклеазная активность как возможный механизм защиты от фагов или чужеродных нуклеиновых кислот.

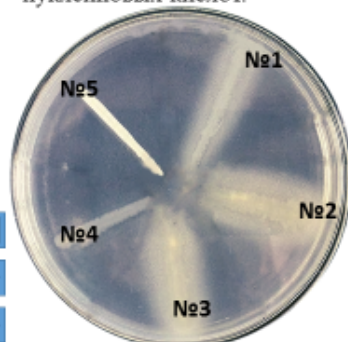


Рисунок 4 – Наглядная фотография наличия (№1,2,3) и отсутствия (№4,5) липолитической активности у некоторых изучаемых бактерий

10

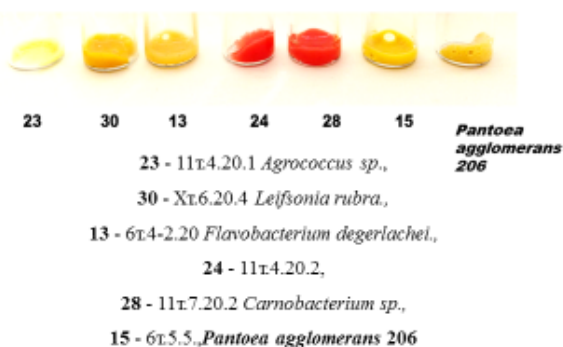


Рисунок 5 – Пигментный экстракт бактерий

➤ У шести антарктических изолятов были выявлены пигменты на основании общего вида полученных спектров поглощения которых можно выделить две основных группы – с диапазоном поглощения в видимой области спектра 400-500 нм и 450-550 нм. Согласно литературным данным это могут быть каротиноиды (каротины и ксантофилы). В результате проведенных исследований было показано, что спектральные характеристики, а, следовательно, состав и структура пигментов, извлеченных из бактерии зависят от природы экстрагирующих агентов, что должно учитываться при их извлечении из сырья и дальнейшем определении.

11



Рисунок 6 - Результаты определения продукции антибактериальных веществ методом «отсроченного» антагонизма

➤ Было установлено, что изоляты проявляют антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий. Высокую активность проявил штамм *Pseudomonas lundensis* (№2, 3, 4) в отношении представителей рода *Staphylococcus*, что представляется нам очень интересным и требует дальнейшего изучения

12



Рисунок 7 - Результат определения чувствительности антарктического изолята №31 к антибактериальным веществам

Изоляты обладали разной степенью устойчивости к различным группам антибактериальных веществ. Все изоляты были чувствительны к антибиотикам группы аминогликозидов, так же выражена чувствительность в отношении хлорамфеникола и рифампицина.

13

Научная новизна

На сегодняшний день культивируемые и поддерживаемые в коллекциях лабораторий антарктические бактерии были выделены из практически всех доступных сред, таких как воздух, снег, почва, озера, прибрежные воды океана, и др. Несмотря на достаточно большое количество изолятов, микробное сообщество полярных регионов а частности временных водоемов, изучено довольно поверхностно. Нами изучалась часть ,хранящейся в Институте микробиологии НАН Беларуси, коллекции антарктических бактерий, большинство из которых до этого были не изучены. Была найдены бактерии с перспективными биотехнологическими свойствами.

14

Положения, выносимые на защиту

- Идентифицировано 25 изолятов с применением метода секвенирования участка гена 16S рРНК. Многие из идентифицированных бактерий изолировались ранее на территории Антарктиды и другими исследователями и представляют собой адаптированные к холоду психрофильные бактерии.
- Проведен качественный анализ метиловых эфиров жирных с помощью газовой хроматографии и газовой хроматографии с масс спектрометром и сделан вывод что метод кластеризации на основе данных метода газовой хроматографии МЭЖК достаточно быстрый, что позволяет использовать его для разбивки большого количества микроорганизмов по группам в соответствии с качественными и количественными различиями в составе жирных кислот бактерий и соотносим по чувствительности с кластеризацией на основании построения филогенетического дерева на базе последовательности части гена 16S рРНК.
- Проведена первичная оценка ферментативной активности изолятов.

15

Положения, выносимые на защиту

- Были найдены пигменты у шести изолятов и показано, что спектральные характеристики, состав и структура пигментов, экстрагированных из бактерий зависят от природы экстрагирующих агентов, что должно учитываться при их извлечении из сырья и дальнейшем определении.
- Было установлено, что изоляты проявляют антагонистическую активность в отношении грамположительных бактерий. Высокую активность проявил штамм *Pseudomonas lundensis* в отношении представителей рода *Staphylococcus*, что представляется нам очень интересным и требует дальнейшего изучения.
- Изоляты обладали разной степенью устойчивости к различным группам антибактериальных веществ. Все изоляты были чувствительны к антибиотикам группы аминогликозидов, так же выражена чувствительность в отношении хлорамфеникола и рифампицина.

16

ПУБЛИКАЦИИ

1. Акулова, О.Д Типирование бактерий, изолированных на территории Антарктиды / О. Д. Акулова, О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин // Молодежь в науке: материалы XIII Международной конференции Академии наук-конференции молодых ученых, Минск, 22-25 ноября 2016 г. / НАН Беларуси – Минск, 2016. – С 111-112.
2. Акулова, О.Д Поиск биотехнологически значимых бактерий среди микроорганизмов, изолированных на территории Антарктиды / О.Д. Акулова, О.В Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы X Международной научной конференции, Минск, 5-7 июня 2017 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2017.



17

ПУБЛИКАЦИИ

- ТАЦОГРНПСС
3. Акулова, О.Д. Биотехнологический потенциал бактерий, изолированных на территории Антарктиды как продуцентов холодоактивных ферментов / О. Д. Акулова, О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Биологическая осень 2017: материалы международной научной конференции молодых ученых, Минск, 9 ноября 2017 г. / БГУ, Биологический факультет – Минск, 2017. – С 4-5.
 4. Акулова, О.Д. Биоразнообразие и характеристика бактерий, изолированных из временных водоемов на территории восточной Антарктиды / О.Д. Акулова, О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Актуальные аспекты современной микробиологии: материалы XII Молодежной школы-конференции с международным участием, Москва, 9-10 ноября 2017 г. / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН – Москва, 2017. – С 9-12.



Спасибо за внимание!

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Список публикации

1. Акулова, О.Д Типирование бактерий, изолированных на территории Антарктиды / О. Д. Акулова, О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин // Молодежь в науке: материалы XIII Международной конференции Академии наук-конференции молодых ученых, Минск, 22-25 ноября 2016 г. / НАН Беларуси – Минск, 2016. – С 111-112.
2. Акулова, О.Д Поиск биотехнологически значимых бактерий среди микроорганизмов, изолированных на территории Антарктиды / О.Д. Акулова, О.В Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы X Международной научной конференции, Минск, 5-7 июня 2017 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2017. – С 16-19.
3. Акулова, О.Д Биотехнологический потенциал бактерий, изолированных на территории Антарктиды как продуцентов холодоактивных ферментов / О. Д. Акулова, О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Биологическая осень 2017: материалы международной научной конференции молодых ученых, Минск, 9 ноября 2017 г. / БГУ, Биологический факультет – Минск, 2017. – С 4-5.
4. Акулова, О.Д Биоразнообразие и характеристика бактерий, изолированных из временных водоемов на территории восточной Антарктиды / О.Д. Акулова, О.В Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Актуальные аспекты современной микробиологии: материалы XII Молодежной школы-конференции с международным участием, Москва, 9-10 ноября 2017 г. / Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН – Москва, 2017. – С 9-12.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Скриншот сайта выпускной работы

Акулова Ольга Дмитриевна



В 2017 закончила биологический факультет БГУ, специальность "микробиология". В настоящее время магистрант БГУ. Тема дипломной работы

"Молекулярно-генетический и физиолого-биохимический анализ бактерий изолированных, на территории Антарктиды из временных водоемов" [[elib.bsu](#)].

Тема магистерской работы "Разнообразие и характеристика бактерий, изолированных на территории Антарктиды из временных водоемов".

Работа выполняется в лаборатории ЦАГИИ Института микробиологии НАН Беларуси под руководством Валентовича Леонида Николаевича [[bio.bsu](#)].

Контактная информация

Телефон: +375(25)5335598;

email: olya-akylova@mail.ru

Ссылки на

- [Выпускная работа](#)
- [Список публикаций](#)

Примечание – ссылка на сайт: <https://oliaakylova.github.io/BSUmaster/>