

Федеральное государственное автономное
Образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

« ____ » _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Идентификация условно-патогенных бактерий методом ARDRA.

06.04.01 - Биология

06.04.01.05 Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель	_____	<u>доцент. к.б.н. О.А.Гусейнов</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>С.В. Зотова</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>О. П. Дубовская</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Идентификация условно-патогенных бактерий методом ARDRA» содержит 70 страниц текстового документа, 22 иллюстрации, 4 таблицы, 84 использованных источника.

Ключевые слова: *Bacillus*, ARDRA, 16S рРНК, условно-патогенные.

Цель данной работы: методом ARDRA идентифицировать виды бактерий рода *Bacillus* среди предоставленных образцов.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести анализ ARDRA *in silico* ампликонов 500F – 1350R и ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК различных видов бактерий рода *Bacillus* с использованием данных GenBank и построить теоретические электрофореграммы.
2. Отобрать среди предоставленных образцов микроорганизмов, бактерии рода *Bacillus*. Выделить ДНК из биомассы образцов бактерий рода *Bacillus*, определить её концентрацию и качество.
3. С помощью ПЦР получить ампликоны 500F – 1350R и ампликоны 8F – 1492R гена 16S рРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза в агарозном геле.
4. Сравнить полученные *in silico* теоретические и практические картины электрофоретического разделения рестриктов и определить виды бактерий.

Бактерии рода *Bacillus* сильно интересуют ученых микробиологов, так как этот род имеет широкое видовое распространение и обладает прекрасной устойчивостью спор к химическому и физическому воздействию.

ARDRA – является полезным методом для идентификации и может быть использован для определения генетической изменчивости и сходства микроорганизмов. Этот метод может быть использован для генетического

анализа и анализа разнообразия многих бактерий, например таких как *Bacillus*.

Поскольку бактерии рода *Bacillus* занимают важное место среди микроорганизмов, существует необходимость уметь идентифицировать их отдельные виды.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Введение в бактериологию	9
1.2 Патогенность и условная патогенность.....	11
1.3 Бактерии рода <i>Bacillus</i>	12
1.4 <i>Bacillus</i> : заболевания и их возбудители.....	13
1.5 Польза <i>Bacillus</i> для человека и животных.....	18
1.6 Биопрепараты на основе бактерий рода <i>Bacillus</i>	21
1.7 Биологически активные добавки.....	22
1.8 ДНК.....	24
1.9 Выделение ДНК	25
1.10 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis).....	26
1.11 16S рРНК.....	27
1.12 ПЦР (Полимеразная цепная реакция)	28
1.13 Детекция результатов ПЦР	32
1.14 Рестриктивный анализ ДНК.....	32
1.15 Электрофорез.....	34
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1 Объекты исследования	38
2.2 Методика выделения ДНК	38
2.3 Методика проведения электрофореза.....	39
2.4 Методика проведения ПЦР	41
2.5 Проведение реакции рестрикции	43

2.6 Проведение анализа <i>in silico</i>	44
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	45
3.1 Проведение анализа <i>in silico</i>	45
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий	45
3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	45
3.4 Проведение реакции рестрикции	46
3.5 Сравнение теоретических и практических данных	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	46
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	49

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии – это одноклеточные микроорганизмы, у которых отсутствует ядерная мембрана, они размножаются путем бинарного деления. С медицинской точки зрения они могут являться одной из основных причин болезней. На первый взгляд бактерии кажутся относительно простыми формами жизни, но на самом деле они могут иметь сложное строение, легко адаптируются. Многие бактерии размножаются с большой скоростью, их разные виды могут использовать огромное количество углеводородных субстратов, включая фенол, каучук и нефть. Эти организмы широко существуют, как в паразитических, так и в свободноживущих формах. Поскольку они распространены повсеместно и обладают замечательной способностью адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, важность идентификации бактерий во всех областях жизни невозможно переоценить.

Способность бактерий вызывать заболевание отражает их относительную патогенность. Исходя из этого, бактерии можно разделить на три основные группы: патогенные, условно-патогенные и непатогенные.

Метод ARDRA – является полезным для идентификации и может быть использован для определения генетической изменчивости и сходства микроорганизмов. Этот метод может быть использован для генетического анализа и анализа разнообразия бактерий, в частности таких как: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*.

Метод рестриционного анализа генов 16S рРНК (ARDRA) широко используется в Европе и Северной Америке для изучения микробного разнообразия, основанного на полиморфизме ДНК.

В данной работе показано использование метода ARDRA для идентификации микроорганизмов на примере бактерий рода *Bacillus*.

Актуальность работы

Бактерии рода *Bacillus* сильно интересуют ученых микробиологов, так как этот род имеет широкое видовое распространение и обладает прекрасной устойчивостью спор к химическому и физическому воздействию.

Бактерии *Bacillus* обычно считаются почвенными организмами, однако некоторые, включая *B.subtilis*, находили в фекалиях и биопсиях подвздошной кишки добровольцев. В связи с этим укрепилось мнение о том, что *B.subtilis* и возможно другие виды, адаптировались к жизни в желудочно-кишечном тракте человека, включая способность образовывать биопленку, анаэробно спорулироваться и продуцировать антимикробные вещества. И их следует рассматривать как кишечные комменсалы, а не исключительно почвенные микроорганизмы.

Сообщалось, что различные штаммы *Bacillus* проявляют антимикробную, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность в организме хозяина.

Эффективность *Bacillus subtilis*, как пробиотика была протестирована на нескольких моделях животных *in vitro* и *in vivo*, а некоторые из них также прошли валидацию в клинических испытаниях на людях. Доступные данные этих исследований показали положительное влияние различных штаммов *Bacillus* на здоровье человека. Например, несколько исследователей признали профилактическую роль пробиотика *Bacillus* при нарушении физиологии кишечника.

Кроме того, компоненты, выделяемые потенциальными пробиотическими штаммами *Bacillus*, обладают противораковой активностью. В исследовании корейских ученых, сурфактиноподобное соединение *Bacillus subtilis* CSY191 может ингибировать рост клеток рака молочной железы человека MCF-7 дозозависимым образом. Кроме того, польза для здоровья от пробиотических штаммов *Bacillus* была также доказана на людях с различным здоровьем и возрастными группами.

Поскольку бактерии рода *Bacillus* занимают важное место среди микроорганизмов, существует необходимость уметь идентифицировать их отдельные виды.

Цель данной работы: методом ARDRA идентифицировать виды бактерий рода *Bacillus* среди предоставленных образцов.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

5. Провести анализ ARDRA *in silico* ампликонов 500F – 1350R и ампликонов 8F – 1492R гена 16S рРНК различных видов бактерий рода *Bacillus* с использованием данных GenBank и построить теоретические электрофореграммы.
6. Отобрать среди предоставленных образцов микроорганизмов, бактерии рода *Bacillus*. Выделить ДНК из биомассы образцов бактерий рода *Bacillus*, определить её концентрацию и качество.
7. С помощью ПЦР получить ампликоны 500F – 1350R и ампликоны 8F – 1492R гена 16S рРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза в агарозном геле.
8. Сравнить полученные *in silico* теоретические и практические картины электрофоретического разделения рестриктов и определить виды бактерий.

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии в Институте Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Введение в бактериологию

Бактерии – это одноклеточные микроорганизмы, у которых отсутствует ядерная мембрана, они метаболически активны и размножаются путем бинарного деления. С медицинской точки зрения они являются основной причиной болезней. На первый взгляд бактерии кажутся относительно простыми формами жизни, но на самом деле они сложны и легко адаптируются. Многие бактерии размножаются с большой скоростью, и разные виды могут использовать огромное количество углеводов субстратов, включая фенол, каучук и нефть. Эти организмы широко существуют, как в паразитических, так и в свободноживущих формах. Поскольку они распространены повсеместно и обладают замечательной способностью адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, важность идентификации бактерий во всех областях жизни невозможно переоценить.

Дисциплина бактериологии возникла из потребности врачей в проверке и применении микробной теории болезней и из экономических соображений, связанных с порчей продуктов питания. Первые успехи в патогенной бактериологии были связаны с идентификацией и характеристикой бактерий, связанных с конкретными заболеваниями. В этот период большое внимание уделялось применению постулатов Коха для проверки предложенных причинно-следственных связей между бактериями и конкретными заболеваниями. Сегодня идентифицировано большинство бактериальных заболеваний человека и их этиологических агентов, хотя важные варианты продолжают развиваться и иногда возникают, например такие болезни как болезнь легионеров, туберкулез и синдром токсического шока.

Основные достижения в области бактериологии за последнее столетие привели к разработке многих эффективных вакцин (например, пневмококковой полисахаридной вакцины, дифтерийного анатоксина и

столбнячного анатоксина), а также других вакцин (например, вакцин против холеры, брюшного тифа и чумы), которые менее эффективны или имеют побочные эффекты.

Еще одним крупным достижением стало открытие антибиотиков. Эти противомикробные вещества не искоренили бактериальные заболевания, но они являются мощными терапевтическими средствами. Их эффективность снижается из-за появления устойчивых к антибиотикам бактерий. На самом деле улучшения в области санитарии и очистки воды в большей степени влияют на заболеваемость бактериальными инфекциями в обществе, чем наличие антибиотиков или бактериальных вакцин. Большинство болезней, которые сейчас существуют, имеют бактериологическую этиологию. Некоторые из них были описаны как заразные в писаниях древнего Китая за несколько столетий до первых описаний бактерий в 1677 году Антони ван Левенгуком.

Остается несколько болезней (хронический язвенный колит) которые, по мнению некоторых исследователей, вызваны бактериями, патоген которых не был идентифицирован. Ранее нераспознанное заболевание связано с новой группой бактерий. Примером может служить болезнь легионеров, острая респираторная инфекция, вызываемая ранее неизвестным родом *Legionella*. Другим важным примером для понимания этиологии является заболевание уретрит у пациентов мужского пола, вызванное *Ureaplasma urealyticum* или *Chlamydia trachomatis*.

Рекомбинантные бактерии, полученные с помощью генной инженерии, чрезвычайно полезны в бактериологических исследованиях и используются для производства дефицитных биомолекул (например, интерферонов), необходимых для исследований и ухода за пациентами. Генетические зонды и полимеразная цепная реакция полезны для быстрой идентификации микробных патогенов в образцах пациентов. Генетические манипуляции с патогенными бактериями необходимы для определения механизмов вирулентности. По мере того, как будет идентифицировано, клонировано и

секвенировано больше защитных белковых антигенов, будут созданы рекомбинантные бактериальные вакцины, которые должны быть намного лучше, чем существующие в настоящее время.

В развитых странах 90 процентов зарегистрированных инфекций у госпитализированных пациентов вызваны бактериями. Эти случаи, вероятно, отражают лишь небольшой процент фактического числа бактериальных инфекций, встречающихся в общей популяции, и обычно представляют собой наиболее тяжелые случаи. В развивающихся странах различные бактериальные инфекции часто оказывают разрушительное воздействие на здоровье жителей. Недоедание, паразитарные инфекции и плохая санитария – это лишь некоторые из факторов, способствующих повышенной восприимчивости этих людей к бактериальным патогенам [1].

1.2 Патогенность и условная патогенность

Способность бактерий вызывать заболевание отражает их относительную патогенность. Исходя из этого, бактерии можно разделить на три основные группы. При выделении от пациента явные или первичные патогены считаются вероятными возбудителями заболевания (например, когда причина диарейного заболевания определяется путем лабораторного выделения *Salmonella* spp. из фекалий). Условно-патогенные это те, которые изолированы от пациентов, у которых механизмы защиты хозяина нарушены. Они могут быть возбудителями заболевания (например, заражение кишечной палочкой при катетеризации пациентов, предрасположенных к инфекциям мочевыводящих путей). Непатогенными считаются, некоторые бактерии, например такие как *Lactobacillus acidophilus*, потому что они редко или никогда не вызывают заболевания человека. Однако их отношение к категории непатогенов может меняться из-за адаптируемости бактерий и пагубного воздействия современной лучевой терапии, химиотерапии и иммунотерапии на механизмы резистентности.

Вирулентность – мера патогенности организма. Степень вирулентности напрямую связана со способностью организма вызывать заболевание, несмотря на механизмы резистентности хозяина, на него влияют многочисленные переменные, такие как количество инфекционных бактерий, путь проникновения в организм, специфические и неспецифические механизмы защиты хозяина и факторы вирулентности бактерий. Вирулентность измеряют экспериментально, определяя количество бактерий, необходимое для того, чтобы вызвать смерть, болезнь или повреждения [2].

1.3 Бактерии рода *Bacillus*

Способность бактерий вызывать заболевание отражает ее относительную патогенность. Исходя из этого, бактерии можно разделить на три основные группы. При выделении от пациента явные или первичные патогены считаются вероятными возбудителями заболевания (например, когда причина диарейного заболевания определяется путем лабораторного выделения *Salmonella* spp. из фекалий). Условно-патогенные это те, которые изолированы от пациентов, у которых механизмы защиты хозяина нарушены. Они могут быть возбудителями заболевания (например, заражение кишечной палочкой при катетеризации пациентов, предрасположенных к инфекциям мочевыводящих путей). Непатогенными считаются, некоторые бактерии, например такие как *Lactobacillus acidophilus*, потому что они редко или никогда не вызывают заболевания человека. Однако их отношение к категории непатогенов может меняться из-за адаптируемости бактерий и пагубного воздействия современной лучевой терапии, химиотерапии и иммунотерапии на механизмы резистентности [3].

Бактерии рода *Bacillus* сильно интересуют ученых микробиологов, так как этот род имеет широкое видовое распространение и обладает прекрасной устойчивостью спор к химическому и физическому воздействию.

Споры являются наиболее устойчивой формой жизни. Они спокойно выдерживают такие воздействия как, влияние влажным паром, обезвоживание, ультрафиолетовое и гамма излучение, вакуум и окисление. Споры, находящиеся в покое обладают особо продолжительной жизнью и могут быть найдены во множестве сред существования [4]. В данный временной промежуток *Bacillus* используют для создания продуктов нескольких типов: ферменты, антибиотики, высокоочищенные биопрепараты и инсектициды.

Бактерии рода *Bacillus* характеризуются несколькими признаками: визуализируются как, ровные или не совсем ровные напоминающие форму палочки организмы с размером 0,3-2,2 x 1,2-7,0 мкм. Обладают активным движением. Жгутики располагаются перитрихально. Могут создавать одну термоустойчивую эндоспору в спорангии. Положительная окраска по Граму. Род *Bacillus* классические хемоорганотрофы, которые не испытывают необходимость в факторе роста и способны использовать минеральные формы азота в качестве единственного источника энергии. Метаболизм дыхательный, бродильный или одновременно дыхательный и бродильный. Молекулярный кислород является конечным акцептором электронов в дыхательном метаболизме, но может быть заменен нитратами для некоторых видов. Большое количество видов образуют каталазу. Они являются облигатными аэробами. При исследовании видов, количество содержащихся GC пар в ДНК находится в диапазоне от 29 до 63% [5].

1.4 *Bacillus*: заболевания и их возбудители

Bacillus – встречается в природе повсеместно. *Bacillus anthracis*, возбудитель сибирской язвы, является единственным облигатным возбудителем *Bacillus* у позвоночных. Виды *B.lentimorbus*, *B.popilliae*, *B.sphaericus* и *B.thuringiensis* являются патогенами личинок определенных групп насекомых. Ряд других видов, в частности *B.cereus*, иногда являются

патогенами людей и домашнего скота, но подавляющее большинство видов *Bacillus* являются безвредными сапрофитами.

Сибирская язва поражала людей на протяжении всей истории человечества. Пятое и шестое бедствия в Египте, описанные в Исходе, по широко распространенному мнению, были сибирской язвой. Заболевание было описано в трудах Вергилия в 25 г. до н.э. и в средние века было известно как Черный Бэйн. Именно на основе исследований сибирской язвы в 1876 году Кох установил свои знаменитые постулаты. Наиболее известная вакцина, это вакцина Пастера (1881 г.), которая была среди первых разработанных бактериальных вакцин.

Сибирская язва наиболее известное заболевание, вызванное *Bacillus*, но в последние годы другие виды *Bacillus* все чаще участвуют в широком спектре инфекций, включая абсцессы, бактериемию, сепсис, раневые и ожоговые инфекции уха, эндокардит, менингит, офтальмию, остеомиелит, перитонит и инфекции дыхательных и мочевыводящих путей. Большинство из них возникают как вторичные или смешанные инфекции или у хозяев с иммунодефицитом или иным образом, ослабленным иммунитетом (например, у алкоголиков и диабетиков). Но значительная часть – это первичные инфекции у здоровых людей. Некоторые из этих инфекций являются тяжелыми или смертельными. Наиболее часто к таким типам инфекции причастен *B.cereus* за которым следуют *B.licheniformis* и *B.subtilis*. Виды *B.alvei*, *B.brevis*, *B.cycleans*, *B.coagulans*, *B.macerans*, *B.pumilus*, *B.sphaericus* и *B.thuringiensis* тоже иногда вызывают инфекции. В качестве вторичных захватчиков виды *Bacillus* могут обострять ранее существовавшие инфекции, продуцируя повреждающие ткани токсины или метаболиты, такие как пенициллиназа, которые мешают лечению. Вид *Bacillus cereus* хорошо известен как возбудитель пищевого отравления.

Сибирская язва

Сибирская язва – это, прежде всего болезнь травоядных. Люди приобретают ее в результате контакта с инфицированными животными или

продуктами животного происхождения. У людей болезнь принимает одну из трех форм в зависимости от пути заражения. Кожная форма сибирской язвы, на которую приходится более 95 процентов случаев во всем мире, возникает в результате инфицирования через кожные поражения. Кишечная форма сибирской язвы возникает в результате попадания спор внутрь инфицированного мяса. Легочная форма сибирской язвы возникает в результате вдыхания спор.

Кожная форма сибирской язвы обычно возникает в результате попадания спор в порезы и ссадины, хотя в некоторых странах через укусы мух также может передаваться болезнь. После 2-3 дневного инкубационного периода на месте посева появляется небольшой прыщик или папула. Развивается окружающее кольцо пузырьков. В течении следующих нескольких дней центральная папула лопаются, сохнут и чернеет, образуя характерный струп. Место поражения безболезненно и окружено заметным отеком, который может распространяться на некоторое расстояние. Гной и боль появляются только в случае заражения очага гноеродным организмом. Точно так же выраженный лимфангит и лихорадка обычно указывают на вторичную инфекцию. В большинстве случаев заболевание остается ограниченным первоначальным поражением и происходит спонтанно. Основная опасность заключается в том, что поражение на лице или шее может опухнуть, закупорив дыхательные пути, или может вызвать вторичный менингит. Однако если защитные силы хозяина не в состоянии сдержать инфекцию, развивается молниеносная септицемия. Около 20 процентов нелеченных случаев кожной сибирской язвы прогрессируют до фатального сепсиса. Однако *B.anthraxis* чувствителен к пенициллину и другим распространенным антибиотикам, поэтому эффективное лечение почти всегда доступно.

Кишечная сибирская язва аналогична кожной, но встречается на слизистой оболочке кишечника. Как и при кожной сибирской язве, микроорганизмы проникают в слизистую оболочку через существующее

поражение. Генерализированное заболевание развивается, когда микроорганизмы распространяются из поражения слизистой оболочки в лимфатическую систему.

При легочной сибирской язве вдыхаемые споры переносятся альвеолярными макрофагами в лимфатические узлы средостения, где они прорастают и размножаются, вызывая системное заболевание. Желудочно-кишечная и легочная форма сибирской язвы более опасны, чем кожная форма, потому что они обычно выявляются слишком поздно, чтобы лечение было эффективным.

Травоядные животные, основные хозяева *B.anthraxis*, заражаются инфекцией, поедая споры на кормовых растениях. Если споры попадают в поражение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, то они прорастают и попадают в кровоток и лимфатические сосуды, в конечном итоге вызывая системную сибирскую язву, которая обычно заканчивается летальным исходом.

Симптомы, предшествующие сибирской язве, могут отсутствовать или быть легкими, включая например, недомогание, низкую температуру и легкие желудочно-кишечные симптомы в случае желудочно-кишечного заболевания. Во время этой фазы организм размножается и производит токсин в регионарных лимфатических узлах и селезенке. Выброшенный токсин вызывает разрушение этих органов, в частности селезенки. Это вызывает внезапное начало острой болезни с одышкой, цианозом, высокой температурой и дезориентацией, которые за несколько часов прогрессируют до шока, комы и смерти.

Пищевое отравление

Bacillus cereus – может вызывать два разных типа пищевого травления. Диарейный тип характеризуется диареей и болями в животе, возникающими через 8-16 часов после употребления зараженной пищи. Он ассоциируется с разнообразными продуктами, включая мясные и овощные блюда, соусы, пасты, десерты и молочные продукты. Другой тип характеризуется рвотой и

тошнотой. Рвота начинается через 1-5 часов после употребления зараженной пищи. Симптомы пищевого отравления, вызванные другими видами *Bacillus* (*B.subtilis*, *B.licheniformis* и др.) определены менее четко. Диарея и/или тошнота возникают через 1-14 часов после употребления зараженной пищи.

Эпизод отравления обычно происходит, потому что споры выживают при приготовлении пищи или пастеризации, а затем прорастают и размножаются в готовом блюде. Симптомы пищевого отравления *Bacillus cereus* вызваны токсином или токсинами, которые образуются в пище во время этого размножения. Для других видов *Bacillus*, вызывающих пищевое отравление токсины еще не идентифицированы [6].

- *Bacillus cereus* – у людей вызывает диарею, тошноту, рвоту, а также септицемию, эндокардит, поражения ЦНС. Заболевание непродолжительное и прекращается, без какого-либо лечения, но также зарегистрированы и единичные летальные исходы. Информация о пищевых отравлениях *Bacillus cereus* не регистрируются, так как обнаружено относительно низкое число случаев (менее 1%) [7].

- *Bacillus pumilus* – это фитопатогенные бактерии, которые поражают лен, тыкву, кукурузу, свеклу, кабачки, клубни картофеля, чем наносят огромный ущерб для экономики сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий. Также эти микроорганизмы являются возбудителями порчи пищевого сырья и продуктов питания, которые вызывают отравления, характеризующиеся острым течением болезни по типу отравлений, как вызываемые *Bacillus cereus* [8].

- *Bacillus amyloliquefaciens* – не относятся к патогенным для человека микроорганизмам. Они обладают антибактериальной и фунгистатической активностью в отношении фитопатогенных бактерий и грибов, вызывающих болезни растений семейства пасленовых, тыквенных и зерновых, в частности картофеля, огурца и пшеницы, соответственно [9].

- *Bacillus toyonensis* – согласно санитарно-эпидемиологическим правилам не относятся к патогенным для человека микроорганизмам. Ни один из штаммов *Bacillus toyonensis* не был зарегистрирован в ВКПМ, хотя за рубежом давно известны антогонистические и пробиотические свойства данного вида бактерий [10, 11, 12, 13].

1.5 Польза *Bacillus* для человека и животных

Споры *Bacillus* могут выживать в условиях повышенной кислотности желудка, переносить соли желчных кислот и другие неблагоприятные условия ЖКТ. Кроме того, *Bacillus* более стабильны при переработке и хранении в фармацевтических препаратах, что делает их подходящим ингредиентом для составов, способствующих укреплению здоровья. Штаммы *Bacillus* с пробиотическими свойствами выделяются из ферментированных или неферментированных пищевых источников и коммерциализируются в виде разнообразных пищевых добавок.

Считается, что *Bacillus* не является естественным обитателем кишечника. Они попадают в кишечник после употребления в пищу овощей или пищевых продуктов, загрязненных почвенной микрофлорой, ферментированных злаков или бобов. Результаты исследований *in vitro* утверждают, что вегетативные клетки и споры *Bacillus cereus* могут хорошо защищать ЖКТ и прикрепляться к кишечному эпителию.

Штаммы *Bacillus* также получают признание в качестве потенциальных пробиотиков, которые могут способствовать укреплению здоровья человека за счет прямого потребления высоких концентраций жизнеспособного количества клеток. Несколько пробиотических штаммов *Bacillus* были одобрены регулирующими органами разных стран для использования человеком и популярны на мировом рынке как фармацевтические препараты общего назначения, способствующие укреплению здоровья. До сих пор коммерческие продукты *Bacillus*, входящие в состав функциональных

пищевых продуктов не популярны на рынке из-за дебатов по поводу пробиотических и патогенных меток *Bacillus*. Отсюда следует, что важно четко понимать фенотипические и генотипические характеристики селективных *Bacillus* и их обоснование с теми, кто имеет статус GRAS, для достижения консенсуса по этому поводу.

Bacillus spp. являются преимущественно аэробными, а не факультативно аэробными бактериями. Исходя из этого, прорастание и разрастание спор в кишечнике трудно предвидеть, поскольку кишечник млекопитающих представляет собой анаэробную среду. Чтобы показать себя, как потенциальный пробиотик, штаммы *Bacillus* должны обладать основными требованиями: устойчивость к стрессу со стороны ЖКТ и хорошая адгезия биотерапевтических свойств [14]. Выживание при стрессе со стороны ЖКТ представляет собой еще одну проблему для безопасной локализации в кишечнике. Бактерии *Bacillus* обычно считаются почвенными организмами, однако некоторых, включая *B.subtilis*, находили в фекалиях и биопсиях подвздошной кишки добровольцев [15]. В связи с этим укрепилось мнение о том, что *B.subtilis* и возможно другие виды, адаптировались к жизни в желудочно-кишечном тракте человека, включая способность образовывать биопленку, анаэробно спорулировать и продуцировать антимикробные вещества. И их следует рассматривать как кишечные комменсалы, а не исключительно почвенные микроорганизмы [16].

Сообщалось, что различные штаммы *Bacillus* проявляют антимикробную, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность в организме хозяина. Элементы, лежащие в основе полезных пробиотических свойств *Bacillus*, изучаются в различных исследованиях, в которых обнаружено, что эти активности связаны с их способностью продуцировать антимикробные пептиды, небольшие внеклеточные эффекторные молекулы и их способностью взаимодействовать с хозяином с помощью функций адгезии и прикрепления [17].

Также выделили и охарактеризовали штамм *B.subtilis*, продуцирующий бактериоцин и продемонстрировали высокий уровень антимикробной активности частично очищенного бактериоцина против бактериальных патогенов язвы стопы, причем самый высокий уровень был зарегистрирован против *Klebsiella* spp. [18]. Такие бактериоцин-продуцирующие штаммы *Bacillus* потенциально могут применяться в качестве пищевого биоконсерванта и противомикробного средства при инфекциях человека и животных. Несмотря на условно-патогенный статус *Bacillus cereus*, этот вид также исследовали на предмет наличия пробиотических свойств. Бактерии *Bacillus cereus* продуцируют бактериоцины против различных видов *Bacillus*, и было обнаружено, что он сохраняется в ЖКТ мышей до 18 дней. Однако было также обнаружено, что он продуцирует энтеротоксины. Кроме того, *Bacillus cereus* был изучен на предмет положительного воздействия на домашний скот, включая кроликов и поросят [19].

Эффективность *Bacillus* spp. как пробиотика была протестирована на нескольких моделях животных *in vitro* и *in vivo*, а некоторые из них также прошли валидацию в клинических испытаниях на людях. Доступные данные этих исследований показали положительное влияние различных штаммов *Bacillus* на здоровье человека. Например, несколько исследователей признали профилактическую роль пробиотика *Bacillus* при нарушении физиологии кишечника [20, 21]. Уменьшение дисбактериоза и воспаления кишечника с помощью пробиотических штаммов *Bacillus* было установлено благодаря способности уравнивать кишечную флору по отношению к полезной микробной популяции и связанным с ней противовоспалительным агентом, который помогал восстановить слизистую оболочку кишечника от повреждений, вызванных болезнью. Недавно проведенное исследование *in vivo* показало, что пероральный прием обезжиренного молока, содержащего *Bacillus coagulans* B37 и *Bacillus pumilus* B9, снижает количество колиформных бактерий в кале в группах лечения [22]. Кроме того, также оценивается положительное влияние *Bacillus coagulans* на метаболизм в

кишечнике [23]. Штамм *Bacillus cereus*, продуцирующий EPS, замедляет повреждение ДНК, увеличивает выживаемость клеток и экспрессию глутатиона и каталазы в клетках. Очищенный EPS из *Bacillus cereus* может быть полезен для предотвращения окислительного повреждения ДНК и клеточного окисления в фармацевтических и пищевых продуктах [21]. О защитном эффекте пробиотиков *Bacillus* против токсинов также сообщили Французские ученые в 2016 году [24].

Кроме того, компоненты, выделяемые потенциальными пробиотическими штаммами *Bacillus*, обладают противораковой активностью. В исследовании Корейских ученых, сурфактиноподобное соединение *Bacillus subtilis* CSY191 может ингибировать рост клеток рака молочной железы человека MCF-7 дозозависимым образом. Кроме того, польза для здоровья от пробиотических штаммов *Bacillus* была также доказана на людях с различным здоровьем и возрастными группами [25].

Помимо прямого воздействия на здоровье хозяина, штамм *Bacillus* в настоящее время также используют для защитного терапевтического эффекта против некоторых системных клинических синдромов, в частности, метаболических нарушений. В нескольких исследованиях было установлено, что натуральные продукты с участием *Bacillus* могут быть альтернативной, безопасной и рентабельной терапией для лечений метаболических синдромов. В одном из таких исследований ферментация сои в твердом состоянии с использованием *Bacillus amyloliquefaciens* привела к выработке моранолина, мощного ингибитора альфа-глюкозидазы [26].

1.6 Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus*

Виды *Bacillus* используются во многих медицинских, фармацевтических сельскохозяйственных и промышленных процессах, которые используют их широкий спектр физиологических характеристик и их способность продуцировать множество ферментов, антибиотиков и

других метаболитов. Бацитрацин и полимиксин – два хорошо известных антибиотика, полученных из видов *Bacillus*. Некоторые виды используются в качестве стандартов в медицинских и фармацевтических исследованиях.

Споры облигатного термофила *Bacillus stearothermophilus* используются для тестирования процедур тепловой стерилизации, а *Bacillus subtilis* var. *globigii*, устойчивый к теплу, химическим веществам и радиации, широко используется для проверки альтернативных процедур стерилизации и фумигации. Некоторые виды *Bacillus* играют важную роль в естественном или искусственном разложении отходов. Некоторые *Bacillus*, возбудители заболеваний у насекомых, используются в качестве активных ингредиентов инсектицидов [27].

1.7 Биологически активные добавки

Ветом 1.1

Содержит обезвоженную биомассу пробиотических микроорганизмов *Bacillus subtilis* (штамм ВКПМ В-10641), кукурузный экстракт, картофельный крахмал и сахар.

Польза для организма заключается в свойствах *Bacillus subtilis*, которые выделяют протеолитические, амилолитические, целлюлозолитические ферменты, интерферон α -2 лейкоцитарный человеческий, бацитрацины, подавляющие рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. *Bacillus subtilis* размножаются в толстом отделе кишечника. Исходя из этого процесса изменяется микрофлора кишечника. Происходит очищение стенок кишечника от неперевариваемых остатков пищи, что помогает организму, активно избавиться от токсинов. Вследствие этого происходит свободная доставка биологически активных и питательных веществ. Ветом 1.1 приводит в норму пищеварение, метаболизм, и всасывание биологически активных компонентов из пищи в ЖКТ.

Ветом 1.1 применяется в качестве БАД, как источник пробиотиков для лучшей работы ЖКТ и нормализации микробного состава кишечника. Применяется для восстановления микрофлоры после приема антибиотиков, дизбактериозе, цитомегаловирусных инфекциях, герпесе, гриппе, ОРВИ и энцефалите.

Ветом 1.1 вырабатывает интерферон, который препятствует появлению и росту раковых клеток. Препарат применяют в комплексе терапии онкологических новообразований и для устранения негативных последствий при лучевой и химио-терапиях.

Эффект также наблюдается при комплексной терапии гепатитов, миелолейкоза, рака молочной железы, прямой кишки, легких и аллергиях разного происхождения, а также язвах 12-перстной кишки и желудка [28].

Ветом 2

Содержит обезвоженную биомассу пробиотических микроорганизмов *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм ВКПМ В-10642; штамм ВКПМ В-10643), кукурузный экстракт, картофельный крахмал и сахар.

Польза *Bacillus amyloliquefaciens* для организма заключается в протеолитических, амилолитических, целлюлозолитических свойствах ферментов, подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые способствуют нормальному функционированию толстого кишечника и устраняют возможные процессы гниения.

Ветом 2 применяется в качестве БАД для восстановления микрофлоры после приема антибиотиков, дизентерии и запорах, комплексной терапии цирроза печени, язвах желудочно-кишечного тракта, предупреждения почечнокаменной болезни, хронических гепатитах [29].

Ветом 3

Содержит обезвоженную биомассу пробиотических микроорганизмов *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм ВКПМ В-10642), кукурузный экстракт, картофельный крахмал и сахар.

Польза *Bacillus amyloliquefacien* для организма заключается в протеолитических, амилолитических, целлюлозолитических свойствах ферментов, подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые способствуют восстановлению микроценоза в толстом отделе ЖКТ и устранению процессов гниения. Препятствует продолжению возникновения неприятного запаха изо рта и обильного потоотделения.

Ветом 3 применяется в качестве БАД при циррозе печени, гепатитах, колитах, запорах, гастроэнтероколитах, аллергиях, язвах желудочно-кишечного тракта и двенадцатиперстной кишки [30].

Ветом 4

Содержит обезвоженную биомассу пробиотических микроорганизмов *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм ВКПМ В-10643), кукурузный экстракт, картофельный крахмал и сахар.

Польза *Bacillus amyloliquefacien* для организма заключается в протеолитических, амилолитических, целлюлозолитических свойствах ферментов, подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые способствуют восстановлению микроценоза в тонком отделе ЖКТ.

Ветом 4 применяется в качестве БАД при колитах, запорах, циррозе печени, гепатитах, гастроэнтероколитах, аллергиях, язвах желудочно-кишечного тракта и двенадцатиперстной кишки [31, 32].

1.8 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – это молекула (макромолекула), которая состоит из нуклеотидов [33]. Каждая нить ДНК состоит из молекул фосфатов и сахаров. Из нитей торчат химические вещества, называемые нуклеотидами. Их четыре – гуанин (G), цитозин (C), аденин (A) и тимин (T). Эти основания соединяются друг с другом в

двухспиральной цепи с помощью водородных связей [34]. Гуанин всегда связывается с цитозином (Образуется три водородные связи). Аденин всегда связывается с тиминном (образуется две водородные связи), по принципу комплементарности. Это позволяет двум цепям идеально выстроиться в линию, с соответствующими нуклеотидами [35].

Однако ДНК не просто определяет структуру и функции живых существ - она также служит первичной единицей наследственности у организмов всех типов. Другими словами, всякий раз, когда организмы размножаются, часть их ДНК передается их потомству. Эта передача всей или части ДНК организма помогает обеспечить определенный уровень преемственности от одного поколения к другому, в то же время, допуская небольшие изменения, которые способствуют разнообразию жизни [36].

ДНК выполняет две основные функции: она хранит информацию и копирует себя. Информация хранится в коде молекулы ДНК – схеме G, C, A и T. Некоторые комбинации этих молекул определяют, какие белки в конечном итоге образуются в клетке. У людей, многих других животных и растений ДНК упакована в большие фрагменты, хромосомы

1.9 Выделение ДНК

Выделение ДНК – это рутинная процедура, используемая для выделения ДНК из ядра клеток. После извлечения, ДНК можно использовать для молекулярных анализов, включая ПЦР, электрофорез, секвенирование, снятие отпечатков пальцев, клонирование [38].

Синтез ДНК, амплификацию, гибридизацию, сиквенс, не получится выполнить на биологических образцах без предварительной очистки и выделения нуклеиновых кислот. Есть несколько методов получения ДНК из биоматериала. Исходя из поставленной задачи, отбирается подходящая методика. При выборе необходимо знать о требованиях, предъявляемых к

итоговому результату (высокое качество выделенной ДНК, высокий выход ДНК, время, которое потребуется для получения ДНК) [39].

Выделение ДНК и количественная оценка ДНК являются важными этапами подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами для получения надежных и качественных результатов. Основные характеристики, которые требуются в методах выделения ДНК, включают высокое извлечение ДНК, удаление примесей.

Выделение ДНК – это метод очистки ДНК, отделяющий ДНК от клеточных мембран, белков и других клеточных компонентов. Фридрих Мишер в 1869 году впервые выделил ДНК.

Использование метода выделения ДНК должно привести к эффективной экстракции с хорошим количеством и качеством ДНК, которая является чистой и лишенной примесей, таких как белки. Для выделения ДНК используются ручные методы, а также коммерчески доступные наборы. Для выделения ДНК можно использовать различные ткани, включая кровь, биологические жидкости, фиксированные формалином ткани, залитые парафином, замороженные срезы ткани и т.д.

Выделение ДНК включает лизирование клеток и солюбилизацию ДНК, после чего используются химические или ферментативные методы для удаления макромолекул, липидов или белков.

Методы выделения ДНК включают органическую экстракцию (фенол-хлороформный метод), неорганический метод (высаливание и обработка протеиназой K) и метод адсорбции (силикагелевая мембрана) [40].

1.10 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

ARDRA является полезным методом для идентификации и может быть использован для определения генетической изменчивости и сходства микроорганизмов. Этот метод может быть использован для генетического

анализа и разнообразия многих бактерии, таких как: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*.

ARDRA является расширением техники ПДРФ. Техника включает ферментативную амплификацию с использованием праймеров, направленных на консервативные области гена 16S, с последующим расщеплением с использованием рестрикционных ферментов [41].

Амплифицированный рестрикционный анализ рибосомной ДНК (ARDRA) является широко используемым инструментом для изучения микробного разнообразия, основанного на полиморфизме ДНК. Клоны, содержащие фрагменты гена 16S рДНК, полученные с применением универсальных или родоспецифичных наборов праймеров, амплифицируют и переваривают рестрикционными эндонуклеазами (RE) с последующим разделением полученных фрагментов на агарозных или акриламидных гелях высокой плотности. Появляющиеся профили затем используются либо для объединения сообщества в генотипические группы, либо для типирования штаммов [42].

1.11 16S рРНК

Для идентификации микроорганизмов идеально подходящим маркером является ген, который кодирует 16S рРНК [43].

Последовательности 16S рРНК широко используются при классификации и идентификации бактерий и архей. Сравнение почти полных последовательностей гена 16S рРНК используется для установления таксономических взаимоотношений между прокариотическими штаммами, при этом сходство 98,65%. В настоящее время признано пороговым значением для разграничения видов [44].

Ген 16S рРНК кодирует малые субъединицы рибосомных молекул РНК рибосом. Которые ответственны за важный процесс преобразования генетических сообщений в функциональные компоненты клетки посредством

трансляции мРНК в белки. Как таковая рибосомная РНК является компонентом всех самовоспроизводящихся систем, она легко выделяется и ее последовательность медленно меняется со временем, что позволяет выявлять родство между очень далекими видами. Анализ последовательности гена 16S рРНК и структурное моделирование 16S рРНК выявили, что последовательность гена содержит несколько консервативных и переменных областей. Эволюционно консервативные области находятся по направлению к центру рибосомы в функциональных сайтах, тогда как переменные области находятся по направлению к поверхности рибосомы где предполагается, что нуклеотидные замены не будут влиять на функцию рибосомы [45].

Ген 16S рРНК распространен абсолютно везде, он находится в геноме бактерий и архей, но исключен у вирусов и в ядрах эукариот (присутствует в митохондриальной ДНК эукариот) [46]. Ген 16S рРНК используется для идентификации бактерий из-за наличия консервативных областей гена [47].

Видоспецифичные участки гена используют для определения видов бактерий. Схожесть видоспецифичной области показывает эволюционное родство различных видов. Консервативные участки используют для ПЦР. В первом этапе происходит присоединение праймеров к исследуемой ДНК [48].

Для большого количества бактерий известны последовательности гена 16S рРНК и они представлены в свободном доступе в генетических базах данных (GenBank). Что позволяет нам сравнивать последовательности, которые мы получаем с уже имеющимися последовательностями. Так происходит идентификация микроорганизмов [49].

1.12 ПЦР (Полимеразная цепная реакция)

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – это метод амплификации последовательностей ДНК *in vitro* путем разделения ДНК на две нити с помощью фермента ДНК-полимеразы. Где матрицей в последующем цикле

служат продукты из предыдущего. Может амплифицировать определенную последовательность ДНК в миллиард раз [50].

ПЦР – это революционный метод, разработанный американским биохимиком Кэри Муллисом в 1983 году [51]. В 1993 году он получил Нобелевскую премию за разработку этого метода [52]. ПЦР основана на использовании способности ДНК-полимеразы синтезировать новую цепь ДНК, комплементарную предлагаемой цепи матрицы. Поскольку ДНК-полимераза может добавлять нуклеотид только к уже существующей 3'-ОН группе, ей нужен праймер, к которому она может добавить первый нуклеотид. Это требование позволяет очертить конкретную область матричной последовательности, которую исследователь хочет амплифицировать. В конце реакции ПЦР, конкретная последовательность будет накоплена в миллиардах копий (ампликонов) [53].

Реакция, лежащая в основе метода - репликация ДНК. Репликация ДНК - это комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью ДНК-полимеразы.

Полимеразная цепная реакция – это искусственный процесс множественного амплифицирования ДНК последовательности [54].

Для проведения Полимеразной цепной реакции потребуются такие компоненты как:

- **Анализируемый образец** – препарат, который содержит исходную ДНК [55].
- **ДНК-матрица** – препарат, содержащий участок для амплифицирования. В большинстве случаев используют всю геномную ДНК.
- **Праймеры** – это искусственно созданные одноцепочечные последовательности ДНК (длиной 10-35 нуклеотидов), комплементарные конкретному участку анализируемой ДНК. Один праймер подходит к началу амплифицируемого участка, другой же к

его концу, но на противоположной цепи. У праймеров есть 3'- и 5'-концы. Прямой обозначается буквой F – forward. А обратный обозначается буквой R – reverse [56].

- **Термостабильная ДНК-полимераза** – фермент, который имеет функцию катализирования реакции полимеризации ДНК по принципу комплементарности. Для использования в ПЦР, полимераза должна сохранять активность долгое время и при большой температуре. Для ПЦР используют ферменты, выделенные из термофилов: Taq-полимераза (*Thermus aquaticus*) – самая производительная, а Pfu-полимераза (*Pfurococcus furiosus*) и Pwo-полимераза (*Pfurococcus woesei*) – более точные, Tth-полимераза (*Thermus thermophilus*).
- **Дезоксинуклеозидтрифосфаты** – «кирпичики», которые Taq-полимераза использует их как строительный материал для синтеза второй цепи ДНК. Их четыре:
 - (dATP) дезоксиаденозинтрифосфата;
 - (dGTP) дезоксигуанозинтрифосфата;
 - (dCTP) дезоксицитозинтрифосфата;
 - (dTTP) дезокситимидинтрифосфата.
- **Ионы Mg^{2+}** - нужны для обеспечения работы Taq-полимеразы. Образуют растворимые комплексы с dNTP. Оптимальная концентрация находится в пределах 1-5мМ. [57].
- **Буферный раствор** – раствор, содержащий анионы и катионы определенной концентрации, которые поддерживают требуемый pH. Соли Mg, которые нужны для работы полимеразы. BSA (бычий сывороточный альбумин), Tris-HCl, обеспечивает стабильность pH раствора. ПАВ предотвращает налипание компонентов реакции на стенки пробирки, стабилизирует фермент. Минеральные соли для обеспечения ионной силы [57].

При проведении ПЦР, обычно выполняется 20-35 циклов, каждый из циклов состоит из трех этапов:

1. Денатурация

Для работы полимеразы нужно разъединить две цепи ДНК-матрицы. Чтобы это сделать, смесь нагревают до 94-98°C, в течении 0,5-2 минут. При прохождении этого этапа между двумя цепями ДНК происходит разрушение водородных связей. Для полной денатурации перед первым циклом проводят долгий прогрев смеси в течение 2-5 минут.

2. Отжиг

После того, как цепи разошлись, понижают температуру, для того, чтобы праймеры связались с одноцепочечной матрицей. Если неправильно подобрать температуру отжига, то связывание произойдет в другом месте и появятся нехарактерные продукты (низкая температура). Или к слабому связыванию праймеров с матрицей (высокая температура). Температуру подбирают исходя из состава праймера, но всегда на 3-5°C ниже температуры его плавления. Стадия длится 0,5-2 минуты.

3. Элонгация.

На стадии элонгации в качестве затравки используется праймер и с его помощью происходит репликация матричной цепи ДНК-полимеразой. Начинается рост второй цепи от 3'-конца и двигаясь по матрице в направлении к 3'-концу [57].

Самые используемые полимеразы Taq и Pfu, они работают при 72°C. Температуру выбирают исходя из полимеразы.

При окончании всех основных этапов часто применяют еще одну элонгацию. Для того чтобы были достроены все фрагменты. Длительность этапа составляет 7-10 минут [58].

ПЦР проводят в термоциклере или амплификаторе – прибор, обеспечивает амплификацию изменяя температуру. Производит нагрев и охлаждение пробирок. Его точность не менее 0,1°C. Единицей амплификации является – ампликон [59].

1.13 Детекция результатов ПЦР

Для подтверждения приумножения нужных участков ДНК после завершения ПЦР, состав пробирок проходит детекцию с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. После завершения электрофореза гель проходит этап окрашивания и благодаря этому молекулы ДНК можно увидеть. Полиакриламидный гель плотнее, чем агарозный. Из-за этого он подходит для разделения очень коротких фрагментов. Будет видно отличие, даже если разница будет составлять один нуклеотид.

Для визуализации результата используется трансиллюминатор. Детекцию можно осуществить визуально и используя автоматизированные системы обработки изображения – гелъдокументирующие системы.

Существуют различные виды детекции результатов:

- Электрофоретический (агарозный или полиакриламидный гель)
- Гибридизационно-ферментный анализ (ГИФА)
- Флуоресцентная ментка [60].

1.14 Рестриктный анализ ДНК

Рестриктазы, эндонуклеазы рестрикции – это группа ферментов, которые относятся к классу гидролаз. Рестриктазы катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных молекул ДНК прокариот и в других организмах. Так осуществляется «иммунная» функция [61]. Рестриктазы – ферменты, «опознающие» конкретные сайты рестрикции в ДНК. Рестриктазы – получают при выделении из бактериальных организмов [62].

Отличительной особенностью экзонуклеаз от эндонуклеаз является расщепление нуклеиновых кислот в центре, а не по краям молекулы. Рестриктаза узнает конкретную область ДНК, размером от 4 пар нуклеотидов [63]. К 2020 году выявлено около 3 тысяч рестриктаз. Около 600 рестриктаз

можно получить в виде коммерческих препаратов. Их постоянно используют в лабораторной практике для решения генетических задач [64].

Эффективными инструментами исследования являются ферменты рестрикции, позволяющие преобразовывать молекулы ДНК в набор фрагментов с определенной длиной. Используя электрофорез в агарозном геле, можно разделить ДНК на фрагменты, которые будут отличимы по размеру и после этого можно изучить отдельно каждый фрагмент.

Длинные фрагменты намного медленнее мигрируют, чем короткие. Если концентрация агарозы высокая, то большие фрагменты не смогут пройти в гель. Мигрирующие через гель фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании бромистым этидием, можно наблюдать набор полос, которые соответствуют рестрикционному фрагменту конкретной длины [65].

Существуют три класса рестриктаз:

- Рестриктазы I типа (EcoR bp *Escherichia coli* K12) определяют нужную последовательность и разрезают ДНК, около этой последовательности.
- Рестриктазы II типа (EcoRI) определяют конкретную последовательность и режут ДНК в точном месте внутри этой конкретной последовательности. Эти рестриктазы определяют палиндромные последовательности, обладающие серединной точкой, читающиеся идентично в обе стороны.
- Рестриктазы III типа (EcoPI) определяют конкретную последовательность и режут ДНК на различном расстоянии от сайта узнавания. Образующие фрагменты имеют тупые (ровные) или липкие (выступающие) концы. Такие рестриктазы определяют ассиметричные сайты [66, 67].

Более часто используют рестриктазы II-го типа. Они состоят из модифицирующей метилазы и рестрицирующей эндонуклеазы. В качестве кофакторов необходимы ионы Mg^{2+} .

В данный момент выявлено более 450 рестриктаз II-го типа. Но существуют и такие, которые узнают на ДНК одинаковые последовательности, хотя были выделены из разных бактерий. Подобные группы имеют название – изошизомеры. Существует истинная изошизомерия – ферменты разрывают ДНК в одинаковых местах, при узнавании одинаковых последовательностей. И ложная – при узнавании один и тот же сайт, ферменты разрывают ДНК в разных местах в пределах того же сайта [68].

Рестриктазы II-го типа определяют последовательности от 4 до 6 н.п., так происходит деление на крупно- и мелкощепящие рестриктазы. Крупнощепящие рестриктазы определяют последовательности состоящие из 6 н.п. и вносят в молекулу меньше разрывов, чем мелкощепящие, которые обнаруживают тетра-нуклеотид. Встречаемость последовательности, содержащей 4 нуклеотида выше, чем из 6 нуклеотидов. Мелкощепящие рестриктазы – Hpa II и Alu (*Arthrobacter luteus*), крупнощепящие – Eco RI (*E. coli*) и Hind III [69]. Рестрикция ДНК используется в большинстве молекулярно-биологических исследованиях и является важнейшим инструментом в изучении ДНК. С помощью рестриктаз проводят изучение ДНК вирусных, бактериальных, животных и растительных организмов [70, 71, 72, 73].

1.15 Электрофорез

Электрофорез – это метод разделения, основанный на миграции заряженных частиц в поддерживающей среде (жидкости или гидрофильном геле) под действием электрического поля. Способность электрофореза разделять заряженные частицы варьируется от небольших неорганических или органических ионов до заряженных биополимеров (таких как ДНК или белки) или даже хромосом, микроорганизмов или целых клеток. Хотя электрофорез был разработан более 100 лет назад, это важный метод даже

сегодня. В виде геля электрофореза это практически единственный метод, используемый для решения сложных задач разделения в геномике и протеомике, где необходимо разделить тысячи и тысячи видов. Из-за быстрого распространения новых электрофоретических методов, многие из старых терминов имеют несколько иное значение [74].

Способность разделять очень похожие вещества, включая различные белки, для аналитических и препаративных целей увеличилась, особенно с 1950 года, благодаря введению зонного электрофореза в бумагу, а затем и в гели полиакриламида или агарозы. После 1960 года, дисковый и смещающий электрофорез (изотахофорез) и изоэлектрическая фокусировка позволили значительно повысить разрешение. Электрофоретические методы в настоящее время способствуют прогрессу в биохимии и молекулярной биологии и будут по-прежнему иметь большое значение в науке и для многочисленных приложений в генетике, генной технологии, секвенировании нуклеиновых кислот и белков, исследованиях заболеваний и нарушений, включая рак, например в судебной медицине [75].

В 1809 году впервые открыли электрофорез - П.И. Страхов и Ф.Ф. Рейсс (Московский университет) [76].

В 1970 году был проведен эксперимент, которым было показано, что при помощи электрофореза возможно проводить определение длины, чистоты ДНК, а еще разделить конкретные фрагменты. Все нуклеотиды в молекуле ДНК имеют отрицательный заряд, он под действием электрического поля провоцирует движение молекул к аноду.

В полиакриламидном геле очень малы поры для больших молекул ДНК и поэтому для разделения таких молекул разработали подходящий агарозный гель (агароза – полисахарид, который получили из водорослей) [77].

Электрофорез в агарозном геле – эталонный метод, который используют для идентификации, разделения и очистки ДНК. С использованием этого метода возможно быстрое разделение смеси фрагментов ДНК, которые невозможно разделить другими методами [78].

Результаты визуализируют в агарозном геле. Он является застывшей пластиной в последствие нагрева агарозы (конц. 1-2,5%) в электрофорезном буфере при добавлении бромистого этидия.

Перед заливкой геля, в форму устанавливают гребенку, которая формирует лунки при заливке геля. После застывания геля, гребенку извлекают.

Форму перемещают в прибор для горизонтального гель-электрофореза, заливают буфером и вносят образцы в лунки. ДНК движется от катода к аноду, так как заряжена отрицательно. Большие молекулы движутся медленнее, чем короткие [79].

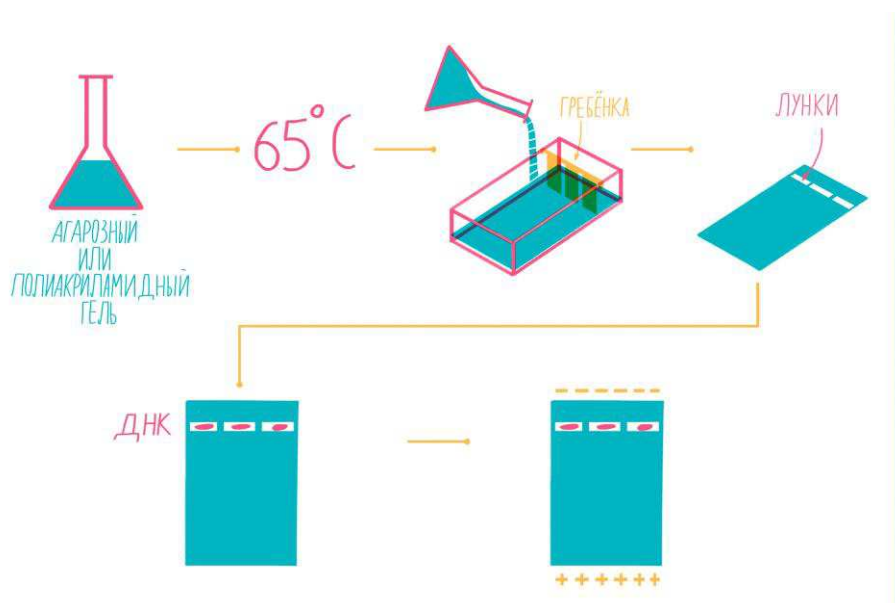


Рисунок 1 – Электрофорез в агарозном геле.

Скорость миграции фрагментов ДНК через агарозный гель при электрофорезе зависит от нескольких показателей: размер молекулы, напряжение, концентрация агарозы, буфер.

Электрофорез длится от 15 минут до 4 часов. Форму с гелем вынимают из прибора и перемещают для окрашивания на вортекс в бромистый этидий на 30 минут. Затем гель достают из формы и помещают в трансиллюминатор, который излучает ультрафиолет (диапазон 250-300нм). Энергия ультрафиолетового света поглощается ДНК в районе 260 нм. И заставляет краситель флуоресцировать [80].

Бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) – интеркалирующий краситель, применяется в молекулярной биологии для обнаружения нуклеиновых кислот при электрофорезе в агарозном геле. При ультрафиолете, бромистый этидий имеет красно-оранжевое свечение [81].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Идентифицируемые образцы биомассы бактерий были любезно предоставлены Ольгой Кондратенко, магистром кафедры биотехнологии Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ.

2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводим с использованием набора AxuPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit производства компании Axugen (производства КНР).

Выделение бактериальной геномной ДНК с использованием этого набора основано на высвобождении геномной ДНК при помощи лизирующего буфера, Buffer G-A. После этого быстрое отделение геномной ДНК от белков, полисахаридов и липидов достигается за счет уникального этапа разделения фаз. В нижней фазе находится – высокоочищенная геномная ДНК, в средней – разрушенные клетки и денатурированные белки, а в верхней – органика. Затем высокоочищенная геномная ДНК в нижней фазе выборочно связывается со специальной колонкой Miniprep. После тщательной промывки Buffer W1 и Buffer W2 для удаления остаточных примесей и соли очищенная бактериальная геномная ДНК элюируется из колонки Miniprep в Трис-буфере или воде.

Этот набор предназначен для быстрого выделения до 20 мкг геномной ДНК из $1.0 \cdot 10^9$ бактериальных клеток. Очищенная ДНК имеет преимущественно ≥ 30 т.п.н. в длину и подходит для различных целей, требующих высокоочищенной геномной ДНК с высокой молекулярной массой, таких как ПЦР и др. [82].

2.3 Методика проведения электрофореза

Провоизводили проверку качества выделенной ДНК спектрофотометрически и электрофоретически с использованием электрофореза.

Перед постановкой электрофореза необходимо подготовить все оборудование и реактивы.

Необходимое оборудование:

- Штатив
- Автоматические пипетки
- Наконечники
- Встряхиватель типа Vortex
- Центрифуга
- стакан
- Мерный цилиндр
- Фильтр
- Шпатель
- Подложка
- СВЧ печь
- Ванночка для горизонтального электрофореза
- Гребенка
- Источник питания Bio-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500мА, 20-5000В).
- Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad.
- Гель - документирующая система Bio-Rad Gel Doc XR с компьютером.

Реактивы:

- Порошок агарозы

- Бромистый этидий: интеркалирующий краситель, для визуализации ДНК в УФ свете.
- Буферы для электрофореза (трис-ацетатные, трис-боратные, трис-фосфатные)
- Днк-маркер
- 6-тикратный буфер для нанесения (ксиленцианол FF, метиленовый синий, сахароза и вода).

Ход работы:

Перед смешиванием ДНК с буфером нанесения, пробы необходимо перемешать на вортексе, а затем открутить на центрифуге.

1. Взвешиваем агарозу и добавляем ее к соответствующему количеству 0.5X TAE буфера.
2. Помещаем в микроволновую печь на 45-60 сек., до получения однородной суспензии, затем остужаем до 60°C.
3. Устанавливаем гребенку в форму для агарозы (форму выставляем по уровню, для получения равномерно залитого геля).
4. Заливаем раствор в форму для агарозы. Оставляем гель на 25-30 минут для застывания.
5. Удаляем гребенку и помещаем гель в электрофоретическую кювету.
6. Покрываем гель слоем электрофоретического буфера (гель должен быть покрыт буфером, толщина которого 1см).
7. Смешиваем пробы ДНК с буфером нанесения, который содержит глицерин и красители, в соотношении 5:1. Вносим смесь в лунки геля под электрофоретический буфер с помощью автоматического дозатора. Наносим маркер (в первую и последнюю лунки).
8. Подсоединяем электроды, устанавливаем нужное напряжение и время, запускаем электрофорез. Сверху кладем хладоген.
9. После окончания электрофореза достаем гель и помещаем его в бромистый этидий для окрашивания и ставим на вортекс, на 25-30 минут.

10. Промываем гель, помещая в емкость с дистиллированной водой.
11. Окрашенный гель помещаем в трансиллюминатор.
12. Смотрим гель в ультрафиолетовом свете и документируем полученные изображения.

2.4 Методика проведения ПЦР

Перед постановкой ПЦР необходимо подготовить все оборудование и реактивы.

Необходимое оборудование:

- Штатив
- Эппиндорфы
- Автоматические пипетки
- Наконечники
- Встряхиватель типа Vortex
- Центрифуга

Реактивы:

- ДНК-матрица: матрица для синтеза дочерних цепей.
- Таq-полимераза: термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.
 - dNTPs: «строительный материал», используемый Таq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
 - Праймеры (прямой и обратный): искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации.
 - Ионы Mg²⁺: являются кофакторами для ДНК-полимеразы.

- ПЦР-буфер: смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающие оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

- Дистиллированная H₂O: среда для протекания реакции, доведение до необходимого объема реакционной смеси.

Реакцию ПЦР проводим в приборе Thermal Cycler C1000. Предварительно включили амплификатор, чтобы он прогрелся. Перед использованием реактивов их необходимо открутить на вортексе, а затем в центрифуге (кроме дистиллированной воды).

На одну пробу объемом 50 мкл требуется:

- 32 мкл дистиллированной воды
- 5 мкл 10x буфера
- 5 мкл dNTPs
- 3 мкл MgCl₂ с концентрацией 2,5 mM
- 1 мкл +1 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (500L - 1350R, 8F – 1492R)
- 1 мкл Hot Start Polymeras (Taq - полимераз)

Все вещества смешиваем в 1 пробирке объемом 1,5 мл. В каждую пробирку добавляем по 48 мкл данной смеси и по 2 мкл. исследуемой ДНК.

При проведении ПЦР выставляем следующую программу:

1. 95°C – 5:00 мин.
2. 95°C – 0:15 сек
3. 56°C – 0:20 сек.
4. 72°C – 1:36 сек.
5. Go to 2:35 times
6. 72°C for 7: 00 мин.
7. 4°C – 18:00:00

Для визуализации результатов амплификации используем электрофорез.

2.5 Проведение реакции рестрикции

Перед постановкой рестрикции необходимо подготовить все оборудование и реактивы.

Оборудование:

- Штатив
- Эппиндорфы
- Автоматические пипетки
- Наконечники
- Встряхиватель типа Vortex
- Центрифуга
- Термомиксер

Реактивы:

- 10x буфер
- BSA: (бычий сывороточный альбумин): используется для стабилизации фермента. Предотвращает адгезию фермента к стенкам сосуда.
- Дистиллированная H₂O
- Исследуемый образец ДНК
- Фермент (активность фермента 10000 е.а/мл)

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводим в течение 2 ч. в приборе Thermomixer comfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходит при определенной температуре, которая зависит от используемого фермента (оптимальная температура указывается на упаковке фермента) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы.

Перед проведением реакции пробы необходимо открутить на центрифуге. Постановка реакции рестрикции, для 1 пробы объемом 50 мкл необходимо:

- 5 мкл 10x буфер
- 10 мкл разб. BSA

- 25 мкл дист. H₂O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента (активность фермента 10000 е.а/мл)

Все вещества смешиваем на холоде в 1 пробирке объемом 2 мл, затем в каждую пробирку добавляем по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК.

Для визуализации результатов рестрикции используем электрофорез [83].

2.6 Проведение анализа *in silico*

В базе данных GenBank производим поиск последовательности гена 16S рРНК интересующей нас бактерии. Используя праймеры 500F-1350R и 8F и 1492R получаем ампликоны. Далее с помощью программы pDRAW32 проводим виртуальную рестрикцию, что бы узнать какие рестриктазы лучше использовать для идентификации того или иного микроорганизма. Затем строим теоретическую электрофореграмму [84].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Проведение анализа *in silico*

[изъято 2 страницы]

3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий

[изъято 1 страница]

3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК

[изъято 2 страницы]

3.4 Проведение реакции рестрикции

[изъято 1 страница]

3.5 Сравнение теоретических и практических данных

[изъято 10 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был применен метод ARDRA *in silico* ампликонов 8F-1492R и 500F-1350R гена 16S рРНК бактерий рода *Bacillus* с использованием данных GenBank для рестриктаз: Fat I, Hae III, Rsa I, Msp I, Tru9 I и были построены теоретические электрофореграммы.

Производился отбор образцов биомассы бактерий рода *Bacillus*. Из них получили препараты ДНК хорошего качества.

Затем были получены ампликоны 8F-1492R и 500F-1350R гена 16S рРНК взятых образцов бактерий и проанализированы методом ARDRA.

Основываясь на сравнение теоретических и экспериментальных данных, сделали вывод, что: образцы 1, 6 и 8 это представители *Bacillus cereus*; образцы 2 и 9 это *Bacillus pumilus*; образцы 3,4 и 10 это *Bacillus amyloliquefaciens*; а образцы 5 и 7 это *Bacillus toyonensis*. Образцы 11, 12, 13, 14 – *Bacillus siamensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus methylotrophicus* и *Bacillus subtilis* соответственно.

Было установлено, что рестриктаза Tru9 I является самой информативной для идентификации различных видов бактерий рода *Bacillus*.

Применение рестриктаз Hae III и Rsa I не позволяет выявить определенный вид бактерий рода *Bacillus*, а выявляет только две отличающиеся по сиквенсу гена 16S рРНК группы бактерий этого рода. Если

существует необходимость идентифицировать только род бактерий, то использование этих рестриктаз наиболее выгодно. Эти рестриктазы позволяют выявить сразу принадлежность образцов бактерий именно к роду *Bacillus*.

Метод ARDRA, в дополнение к классическим методам микробиологии при условии оптимального подбора рестриктаз, является дешевым и скорым способом для идентификации микроорганизмов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ARDRA – Amplified rDNA Restriction Analysis

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

BSA – бычий совороточный альбумин

dATP – дезоксиаденозинтрифосфат

dGTP – дезоксигуанозинтрифосфат

dCTP – дезоксицитозинтрифосфат

dTTP – дезокситимидинтрифосфат

dNTPs – дезоксинуклеозидтрифосфаты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.о. – пары оснований

b.p. – base pairs

УФ – ультрафиолетовое излучение

НК – нуклеиновые кислоты

E. coli – *Escherichia coli*

spp. – speciales (множественное число)

ЦНС – центральная нервная система

ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных организмов

GRAS – Generally recognized as safe (общепризнан безопасным)

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

EPS – экзополисахарид

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Davis, C. P. Introduction to Bacteriology / C. P. Davis, G. Woods, D. Niesel // Medical Microbiology. 4th edition / S. Baron, editor. The University of Texas Medical Branch. – Galveston. – 1996. – p. 1273.
2. Peterson, J. W. Bacterial Pathogenesis / J. W. Peterson // Medical Microbiology. 4th edition / S. Baron, editor. The University of Texas Medical Branch. – Galveston. – 1996. – Ch.7. – p. 1273.
3. Elshaghabe, F.M.F. *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives / F.M.F. Elshaghabe, N. Rokana, R.D. Gulhane [et al] // Frontiers in Microbiology. – 2017. – V. 8:1490.
4. Nicholson, W. L. Resistance of *Bacillus* Terrestrial and Extraterrestrial Environments / W. L. Nicholson [et al] // Microbiology and Molecular biology reviews. – 2000. – V. 64. – № 3. – P. 584-572.
5. Краткий определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулт, Г. А. Заварзина. – Москва: Мир, 1980. – Изд. 7. – 495 с.
6. Turnbull, P. C. B. *Bacillus* / P. C. B. Turnbull // Medical Microbiology. 4th edition / S. Baron, editor. The University of Texas Medical Branch. – Galveston. – 1996. – Ch.15. – p. 1273.
7. *Bacillus cereus* [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://mibio.ru/contents.php?id=93>.
8. Феоктистова, Н.А. Биотехнологические параметры конструирования биопрепарата на основе фагов для индикации и идентификации *Bacillus pumilus* в пищевом сырье и продуктах питания / Н.А. Феоктистова, Лыдина М.А, Васильев Д.А, [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6.
9. Штамм *Bacillus amyloliquefaciens*, обладающий антибактериальной и фунгистатической активностью, и микробиологический препарат на его основе против болезни растения, вызываемой фитопатогенным микроорганизмом [Электронный ресурс] – Режим доступа:

<https://patentimages.storage.googleapis.com/f4/c2/48/e96d4e043d2940/RU2673155C1.pdf>.

10. Kantas, D. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets / D. Kantas, V. G. Papatsiros, P. D. Tassis [et al] // Journal of Applied Microbiology. – 2015. – V. 3. – №118. – P. 727-738.
11. Santos, F. D. S. *Bacillus toyonensis* improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5 / F. D. S. Santos, Y. A. Menegon, R. E. A. Piraine [et al] // Beneficial Microbes. – 2017. – V. 1. – №9. – P. 133-142.
12. Roos, T.B. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in Sheep / T. B. Roos, C. M. de Moraes, R. T. Sturbelle [et al] // Research in Veterinary Science. – 2018. – №117. – P. 260-265.
13. Choudhury, P. Optimization of phytostimulatory potential in *Bacillus toyonensis* isolated from tea plant rhizosphere soil of Nilgiri Hills, India / P. Choudhury, A. Jawed, P. Saha // International Journal of Engineering Science Invention. – 2017. – V. 6. – I. 11. – P. 13-18.
14. Thakur, N. Probiotics: selection criteria, safety and role in health and disease / N. Thakur, N. Rokana, H. Panwar // Journal of Innovative Biology. – 2016. – V. 3. – I. 1. – P. 259-270.
15. Fakhry, S. Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract / S. Fakhry, I. Sorrentini, E. Ricca [et al] // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – V. 105. – I. 6. – P. 2178-2186.
16. Hong, H. A. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract / H. A. Hong, R. Khaneja, N. M. K. Tam, A. Cazzato, S. Tan, M. Urdaci [et al] // Research in Microbiology. – 2009. – V. 160. – I. 2. – P. 134-143.
17. Khochamit, N. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKKU213: potential as a probiotic strain / N. Khochamit, S. Siripornadulsil, P. Sukon, W.

- Siripornadulsil [et al] // Microbiological Research. – 2015. – V. 170. – Pages 36-50.
18. Duc, L. H. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use / L. H. Duc, H. A. Hong, T. M. Barbosa, A. O. Henriques, S. M. Cutting [et al] // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 4. - №70. – P. 2161–2171.
19. Li, J. Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka) / J. Li, Y. Xu, L. Jin, X. Li // Aquaculture Research. – 2015. – V. 46. – I. 12. – P. 3008-3019.
20. Lopetuso, L. R. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives / L. R. Lopetuso, F. Scaldaferri, F. Franceschi, A. Gasbarrini [et al] // Expert Review of Gastroenterology and Hepatology. – 2016. – V. 10. – I. 8. – P. 943-948.
21. Zhang, H. L. Mucosa-repairing and microbiota-balancing therapeutic effect of *Bacillus subtilis* alleviates dextrate sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice / H. L. Zhang, W. S. Li, D. N. Xu, W. W. Zheng, Y. Liu, J. Chen [et al] // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2016. – V. 4. – №12. – P. 2554–2562.
22. Haldar, L. Effect of oral administration of *Bacillus coagulans* B37 and *Bacillus pumilus* B9 strains on fecal coliforms, *Lactobacillus* and *Bacillus* spp. in rat animal model / L. Haldar, D. N. Gandhi // Veterinary World. – 2016. – V. 7. – №9. – P. 766-772.
23. Lee, Y. Combination of soya pulp and *Bacillus coagulans* lilac-01 improves intestinal bile acid metabolism without impairing the effects of prebiotics in rats fed a cholic acid-supplemented diet / Y. Lee, R. Yoshitsugu, K. Kikuchi, G. H. Joe, M. Tsuji, T. Nose [et al] // British Journal of Nutrition. – V. 116. – I. 4. – P. 603 – 610.
24. Ripert, G. Secreted compounds of the probiotic *Bacillus clausii* strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus*

- cereus toxins* / G. Ripert, S. M. Racedo, A. M. Elie, C. Jacquot, P. Bressollier, M. C. Urdaci [et al] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2016. – V. 6. – №60. – P. 3445-3454.
25. Lee, J. H. The production of surfactin during the fermentation of *cheonggukjang* by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells / J. H. Lee, S. H. Nam, W. T. Seo, H. D. Yun, S. Y. Hong, M. K. Kim [et al] // *Food Chemistry*. – 2012. – V. 131. – I. 4. – P. 1347-1354.
26. Cai, D. Use of *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12 for high-level production of the blood glucose lowering compound, 1-deoxynojirimycin (DNJ), and nutraceutical enriched soybeans via fermentation / D. Cai, M. Liu, X. Wei, X. Li, Q. Wang, C. T. Nomura [et al] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – V. 181. – P. 1108-1122.
27. Turnbull, P. C. B. *Bacillus* / P. C. B. Turnbull // *Medical Microbiology*. 4th edition / S. Baron, editor. The University of Texas Medical Branch. – Galveston. – 1996. – Ch.15. – p. 1273.
28. Баширова, Э. М. Терапевтическая эффективность пробиотика Ветом 1.1 при гепатозе коров / Э. М. Баширова, И. Ф. Хазимухаметова // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*. – 2010. – Т. 203. – С. 30-35.
29. Федорова, О.В. Пробиотические препараты на основе микроорганизмов рода *Bacillus* / О.В. Федорова, А.И. Назмиева, Э.И. Нуретдинова, Р.Т. Валеева // *Вестник Технологического университета*. – 2016. – Т. 19. – № 15. – С. 170-174.
30. Ветом 1.1, 2, 3, 4 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://apteka.ru/search/?q=ветом&page=1>.
31. Эффективность Ветом [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://biofam.ru/blog-ru/kak-prinimat-vetom-probiotik-dlya-vsey-semi>.
32. Официальный сайт производителя Ветом [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://vetom.ru/index.php/informatsiya-po-preparatam>.

33. Панчин, А. Ю. Сумма биотехнологии / А. Ю. Панчин. – Москва: АСТ, 2015. – 432 с.
34. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
35. DNA [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.sciencenewsforstudents.org/article/lets-learn-about-dna>.
36. What Is DNA [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/introduction-what-is-dna-6579978/>.
37. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин. – Москва: Мир, 1987. – 1064 с.
38. DNA extraction [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/2036-dna-extraction#:~:text=DNA%20extraction%20is%20a%20routine,see%20a%20stringy%20white%20mass>.
39. Copeland, W. C. Mitochondrial DNA Methods and Protocols / W. C. Copeland // MMB. – 2002. – V. 197. – P. 199-212.
40. Gupta, N. DNA extraction and polymerase chain reaction / N. Gupta // Journal of Cytology. – 2019. – V. 36. – I. 2. – P. 116-117.
41. Wahyudi, A. Diversity of Antifungal Compounds-Producing *Bacillus* spp. Isolated from Rhizosphere of Soybean Plant Based on ARDRA and 16S rRNA / A. Wahyudi // Bogor Agricultural University. – 2010. – V. 17. – P. 145–150.
42. Sklarz, M. Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities / M. Sklarz // Zuckerberg Institute for Water Research. – 2009. – P. 659–664.
43. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2003. – 480 с.
44. Kim, M. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server / M. Kim, J. Chun // Methods in Microbiology. – 2014. – V. 41. – Ch. 4. – P. 61-74.

45. Byrne, S. J. Taxonomy of Oral Bacteria / S. J. Byrne, C. A. Butler, E. C. Reynolds, S. G. Dashper // *Methods in Microbiology*. – 2018. – V. 45. – Ch. 7. – P. 171-201.
46. Woese, C. R. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA / C. R. Woese, G. E. Fox, L. Zablen // *Nature*. – 1975. – V. 254. – P.83–86.
47. Патрущев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрущев. – Москва: Наука, 2004. – 530 с.
48. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. – Москва: Наука, 2010. – 31 с.
49. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
50. ПЦР [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://bigenc.ru/biology/text/3153433>.
51. Ребриков, Д. В. ПЦР в реальном времени: учебник / Д. В. Ребриков, Д. В. Саматов, Д. Ю. Трофимов. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
52. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно-методическое пособие / А. Д. Перенков [и др.] – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.
53. Polymerase Chain Reaction (PCR) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.
54. Проведение ПЦР [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://bio.sfu-kras.ru/files/1901_SD.F.11_MY_LR_Metodi_biohimicheskikh_issledovaniy_VN_20_09.doc.
55. Воробьев, А. А. Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии: учебник / А. А. Воробьев. – Медицинское информационное агентство, 2004. – 72 с.

56. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований: учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. – Красноярск: СФУ, 2012. – 46 с.
57. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/MMoB/10.pdf.
58. McPherson, M. J. PCR / M. J. McPherson [et al] // Book. – 2006. – p. 292.
59. Vondrejs, V. Genové inženýrství I / V. Vondrejs. – 1997.
60. Детекция результатов ПЦР [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf>.
61. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – V. 62. – №6. – P. 685-707.
62. Чмуж, Е. В. Новая эндонуклеаза рестрикции *Bis 1* из *Bacillus subtilis* Т30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)>1'NGC-3' / Е. В. Чмуж [и др.] // Биотехнология. – 2005. – № 3. – С. 22-26.
63. Рестриктазы [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/4597142/>.
64. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm.
65. Пунина, Н. В. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК / Н. В. Пунина, В. С. Зотов, А. Л. Пархоменко // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2013. – Т. 5. – № 1. – С. 93–103.
66. Рестрикция [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/4597142/>.
67. Oller, A. R. Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species / A. R. Oller [et al] // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – I. 9. – P. 2543-2549.

- 68.Классификация рестриктаз [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://studopedia.su/8_1987_restriktazi.html.
- 69.Slaymaker, I. M. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity / I. M. Slaymaker [et al] // Science. – 2016. – V. 351. – P. 84-88.
- 70.Чернухин, В. А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* и *in silico* / В. А. Чернухин [и др.] // Вестник биотехнологии, 2006. – Т. 2. – №. 3. – С. 38-39.
- 71.Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г. Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач, 2006. – Т. 2. – С. 76-79.
- 72.Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом γ облучении семян / А. П. Кравец [и др.] // Цитология и генетика, 2010. – №. 5. – С. 18-22.
- 73.Зернов, Ю. П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолабильной щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология, 2005. – №6. – С. 3-11.
- 74.Gas, V. Electrophoresis | Principles / Gas V. // Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition) / Prague. – 2005. – P. 363-370.
- 75.Vesterberg, O. History of electrophoretic methods / O. Vesterberg // Journal of Chromatography A. – 1989. – V. 480. – P. 3-19.
- 76.Сова, В. В. Введение и очистка белков. Методическое пособие по курсу / В. В. Сова, М. И. Кусайкин // Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
- 77.Поляничко, А. М. Электрофорез в агарозном геле: учебно-методическое пособие / А. М. Поляничко. – Москва: Наука, 2007. – 157 с.
- 78.Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. – Красноярск: СФУ, 2011. – 48 с.

- 79.Короткевич, О. С. Молекулярная биология: методические разработки по выполнению лабораторных работ / О. С. Короткевич, О. И. Себежко, М. П. Люханов. – Новосибирск: НГАУ, 2017. – С.19.
- 80.Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул: учебник / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи // Москва: Мир, 1982. – 447 с.
- 81.Бромистый этидий [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://memtrick.com/set/krasiteli_9941.
- 82.Выделение ДНК [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axyprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf>.
- 83.Rashid, Z. Benchmark taxonomic classification of chicken gut bacteria based on 16S rRNA gene profiling in correlation with various feeding strategies / Z. Rashid, A. Ashraf // Journal of King Saud University – Science. – 2020. – № 32. – С. 1034-1041
- 84.GenBank [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е. И. Шишацкая

« 24 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Идентификация условно-патогенных бактерий методом ARDRA

06.04.01 – Биология

06.04.01.05 – Реконструктивная Биоинженерия

Научный руководитель



доцент, к.б.н

О. А. Гусейнов

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник



С. В. Зотова

подпись, дата

инициалы, фамилия

Рецензент



профессор, д.б.н

О. П. Дубовская

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Красноярск 2021