

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

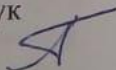
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Салахова Миляуша Нафисовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *nifA* У
КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ**

Научный руководитель:
доктор биологических наук
профессор



Ан.Х. Баймиев

Уфа – 2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1. Азотфиксация.....	4
1.2. Азотфиксирующие бактерии.....	6
1.3. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы (<i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Clostridium</i>).....	7
1.4. Нитрогеназа (строение, принцип работы).....	16
1.5. Происхождение нитрогеназы.....	18
1.6. Структуры и функции нитрогеназы.....	20
1.7. Организация и экспрессия <i>nif</i> -генов.....	21
 ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Компьютерные программы для анализа нуклеотидных последовательностей Lasergene.....	26
2.2. Краткий обзор базы нуклеотидных последовательностей.....	26
2.3. Работа с программой BLAST.....	28
 ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
3.1. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода <i>Rhizobium</i> , построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена <i>nifA</i>	32
3.2. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода <i>Ensifer</i> (<i>Sinorhizobium</i>), построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена <i>nifA</i>	33
3.3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода <i>Mesorhizobium</i> , построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена <i>nifA</i>	33
3.4. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена <i>nifA</i>	34
ВЫВОДЫ.....	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	37
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Почвенные бактерии характеризуются высокой пластичностью генома, рекомбинационной активностью и активной вовлеченностью в процессы горизонтального обмена генами. Одними из часто передаваемых друг другу генов являются гены белков, участвующих в биологической фиксации азота – *nif*-гены. Основным способом горизонтального переноса генов (ГПГ) является конъюгация. Ввиду того, что данный процесс часто прерывается, в клетку не всегда успевают попасть все гены азотфиксирующего кластера и бактерия теоретически недостающие гены может добрать в следующем раунде конъюгации. Поскольку в этом процессе могут участвовать не только представители одного вида, но и бактерии разных фил, то это приводит к рекомбинации *nif*-генов разных бактерий, что является элементом комбинативного эволюционного процесса. Известно, что гены коровых белков нитрогеназы организованы в один оперон и наследуются всегда вместе, что нельзя сказать о генах вспомогательных белков, образующих у многих азотфиксирующих бактерий отдельные опероны. Особенно это характерно для клубеньковых бактерий, для которых характерна разобщенность *nif*-генов по разным оперонам, и в этом плане данные бактерии являются удобным объектом для исследования комбинативной эволюции азотфиксации у бактерий. Одним из наименее сцепленных с генами коровых белков, но тем не менее являющийся неотъемлемой частью нитрогеназной системы является ген *nifA*, кодирующий регуляторный белок NifA, от которого зависит запуск всей нитрогеназной системы микроорганизмов. Данный белок являясь энхансерным элементом и является ключевым белком, запускающим экспрессию всех генов, участвующих в процессе азотфиксации. Поэтому ген *nifA* является удобным объектом для исследования комбинативной эволюции у азотфиксирующих бактерий.

Цель работы

Исследование генетического разнообразия и филогении генов *nifA* у клубеньковых бактерий.

Задачи исследования

1. Сбор последовательностей генов *nifA* азотфиксирующих бактерий из базы нуклеотидных последовательностей.
2. Провести филогенетический анализ собранных последовательностей.
3. Провести сравнение филогении гена *nifA* и 16S рибосомального гена.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Азотфиксация

Азотфиксация—фиксация молекулярного атмосферного азота, диазотрофия. Процесс восстановления молекулы азота и включения её в состав своей биомассы прокариотными микроорганизмами. Важнейший источник азота в биологическом круговороте. В наземных экосистемах азотфиксаторы локализируются в основном в почве.

Биологическая фиксация азота

Усвоение молекулярного азота воздуха является одним из важнейших биологических процессов, от которых во многом зависит жизнь на нашей планете. Азот является важнейшим элементом, оказывающим огромное влияние на плодородие почвы и урожайность сельскохозяйственных культур. Химические азотные удобрения, применяемые обычно в качестве источника азота в сельском хозяйстве, могут быть вредны с точки зрения экологии и, кроме этого, их производство требует значительных затрат энергоресурсов.

Различают три типа азотфиксации:

- Свободноживущими бактериями самых разнообразных таксономических групп.
- Ассоциативная азотфиксация бактериями, находящимися в тесной связи с растениями (в прикорневой зоне или на поверхности листьев) и использующие их выделения (корневые выделения составляют до 30 % продукции фотосинтеза) как источник органического вещества. Азотфиксаторы живут в кишечнике многих животных (жвачные, грызуны, термиты) и человека (род *Escherichia*).
- Симбиотическая. Наиболее известен симбиоз клубеньковых бактерий (семейство *Rhizobiaceae*) с бобовыми растениями. Обычно происходит корневое заражение, но известны растения, образующие клубеньки на стеблях и листьях.

В процессе жизнедеятельности азотфиксаторы связывают атмосферный азот и переводят его в органическую форму, используя солнечную энергию.

Особо значима симбиотическая азотфиксация, осуществляемая клубеньковыми бактериями при помощи бобовых растений. Так, проблема симбиотической азотфиксации привлекает внимание ученых всего мира в связи с возможностью практического применения результатов исследований в данной области, значение которых трудно переоценить.

Симбиотическая фиксация азота, осуществляемая клубеньковыми бактериями совместно с бобовыми растениями, является важным экологическим элементом круговорота азота в экосистеме обогащая почву доступным азотом для большинства растений (Мишустин, 1968). До настоящего времени азотфиксация, биологическая способность редуцировать атмосферный азот до аммиака для использования в дальнейшем в качестве источника пищи для роста, у эукариот не была обнаружена, и рассматривается как характерный признак, присущий исключительно бактериям и археям.

Симбиоз между азотфиксирующими бактериями и бобовыми растениями изучается уже более 100 лет и является классическим примером мутуалистического взаимодействия (Rivas et al., 2009).

С точки зрения эффективности и количества фиксируемого азота, вклад симбиотической азотфиксации в экосистему огромен. Так использование бобовых растений в севообороте обогащает почву азотом. Гектар занятый бобовыми растениями связывает до 400 кг азота в год. Значение этого трудно переоценить, в связи с существенными затратами сельского хозяйства на азотные удобрения.

Нитрогеназа блокируется молекулярным кислородом, поэтому азотфиксация в основном анаэробный процесс. Однако ряд аэробных бактерий выработал механизмы защиты нитрогеназы от блокирования:

- Механизм повышенного уровня дыхания. *Azotobacter chroococcum* при азотфиксации окисляет часть органического вещества, не запасая выделившейся энергии, а только лишь удаляя этим кислород.
- Механизм локализации азотфиксации в гетероцистах характерен для цианобактерий, способных к фотосинтезу с выделением кислорода и создающих для защиты от него нитрогеназы особые, лишенные хлорофилла клетки. Некоторые цианобактерии, не образующие гетероцисты, также способны к азотфиксации. Нитчатая цианобактерия *Plectonemaboryanum* фиксирует азот в микроаэробных условиях (1.5% содержания кислорода в темноте и 0.5% кислорода на свету), нитчатые цианобактерии *Symploca* и *Lyngbya majuscula*, а также одноклеточные цианобактерии родов *Gloeotheca* и *Cyanothece* способны к азотфиксации при отсутствии освещения.
- Механизм симбиотической защиты характерен для клубеньковых бактерий.

1.2. Азотфиксирующие бактерии

Азотфиксирующие бактерии (азотфиксаторы) - бактерии, обладающие способностью усваивать молекулярный азот воздуха и переводить его в доступные для растений формы. Играют важную роль в круговороте азота в природе. Ежегодно вовлекают в азотный фонд почвы планеты 150–180 млн. т азота. Азотфиксирующие бактерии могут быть аэробами и анаэробами, свободно живущими в почве (азотобактер, клостридии, цианобактерии) и живущими в симбиозе с растениями. Впервые анаэробный микроорганизм (клостридии) был выделен из почвы русским учёным С.Н. Виноградским в 1893 г. В 1901 г. голландец М. Бейеринк открыл аэробную азотфиксирующую бактерию – азотобактер.

Источником энергии для восстановления азота у аэробных бактерий служат процессы дыхания, у анаэробных – брожения. На деятельность свободноживущих азотфиксаторов оказывают влияние содержание в почве органического вещества, макро– и микроэлементов, её кислотность, температура и влажность.

1.3. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы.

Азотобактер (AZOTOBACTER)

В 1901 году Бейеринк выделил из почвы аэробную неспорообразующую грамотрицательную бактерию, фиксирующую молекулярный азот, и назвал её *Azotobacter chroococcum* (в родовом названии отражена способность бактерии фиксировать азот, в видовом — способность синтезировать коричневый пигмент — *chroo* и образовывать кокковидные клетки -*coccum*). Азотобактер — представитель свободноживущих микроорганизмов. Свободноживущие — это микроорганизмы, которые живут в почве независимо от того, развивается вблизи растение или нет.

Культуры азотобактера в лабораторных условиях отличаются полиморфизмом. Молодые клетки азотобактера подвижны; они имеют многочисленные или единичные жгутики. У азотобактера обнаружены выросты, подобные фимбриям. В старых культурах клетки азотобактера покрываются плотной оболочкой, образуя цисты. Они могут прорасти, давая начало молодым клеткам.

Полиморфизм азотобактера зависит в значительной степени от состава среды, на которой он выращивается. На среде с этиловым спиртом (в качестве единственного источника углерода) азотобактер длительное время сохраняет подвижность и форму палочек. В то же время на многих других средах полиморфизм проявляется очень резко.

На плотных питательных средах, не содержащих азота, азотобактер образует крупные слизистые, иногда морщинистые колонии, окрашивающиеся при старении в желтовато-зеленоватый, розовый или коричнево-черный цвет. Колониям разных видов азотобактера присуща своя специфическая пигментация.

К настоящему времени известен ряд видов азотобактера: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter agilis*, *Azotobacter nigricans*, *Azotobacter galophilum*.

Источником азота для азотобактера служат разнообразные минеральные (соли аммония, азотной и азотистой кислот) и органические (мочевина, различные аминокислоты) соединения. Однако если азотобактер развивается только за счет связанного в среде азота, он не выполняет своей основной функции — фиксации молекулярного азота. Азотобактер обычно фиксирует до 10—15 мг молекулярного азота на 1 г использованного источника углерода (например, глюкозы, сахарозы). Эта величина сильно колеблется в зависимости от условий выращивания культуры, состава питательной среды, ее кислотности, температуры, аэрации.

По отношению к источникам углерода В. Л. Омелянский в 1923 году назвал азотобактер полифагом, то есть всеядным.

Азотобактер хорошо усваивает разнообразные углеводы (моно- и дисахара, некоторые полисахариды), органические кислоты, многоатомные спирты (глицерин, маннит) и другие вещества.

Многим исследователям удавалось выращивать азотобактер в чашках с питательной средой без азота и углерода, если чашки были помещены в камеру, где находились пары ацетона, этилового спирта или некоторых других органических соединений. В присутствии легкодоступных форм углеродсодержащих соединений азотобактер может частично использовать углекислоту из атмосферы. Повышение концентрации углекислого газа до 0,5% в воздухе несколько стимулирует развитие азотобактера. Но азотобактером лучше усваиваются легкодоступные формы углеродсодержащих органических соединений. В почве запас подвижного органического вещества невелик, поэтому именно недостаток легкодоступных соединений углерода в первую очередь ограничивает развитие азотобактера в природных условиях.

Какие же органические соединения может использовать в почве азотобактер? Перегнойные вещества почвы азотобактером практически не усваиваются. Поэтому в почвах, даже очень богатых перегноем, при отсутствии свежих органических остатков интенсивного размножения азотобактера не происходит.

Однако, если в почве имеются органические соединения и продукты распада растительных и животных клеток, азотобактер развивается хорошо. В частности, он усиленно размножается в почвах, удобренных соломой и соломистым навозом, а также в разнообразных компостах, содержащих

целлюлозу. Азотобактер хорошо ассимилирует вещества, образующиеся при распаде целлюлозы.

Развитие азотобактера и фиксация им азота в значительной степени зависят от наличия в среде фосфора. Источником фосфора могут служить как органические, так и минеральные фосфорсодержащие соединения. Высокая чувствительность азотобактера к фосфору позволила разработать микробиологический метод определения потребности почв в фосфорных удобрениях.

В качестве тест-организма в этом методе используется азотобактер. Микробиологические методы определения потребности почвы в удобрении имеют ряд преимуществ перед химическими анализами, хотя, безусловно, уступают в точности.

Важную роль в обмене веществ азотобактера играет кальций. Этот элемент необходим азотобактеру при питании как молекулярным, так и аммонийным азотом. Недостаток кальция в среде приводит к сильной вакуолизации клеток и их вздутию.

Высокая чувствительность азотобактера к кальцию, так же как и к фосфору, используется для определения потребности почв в известковании.

Микроэлементы (молибден, бор, ванадий, железо, марганец) необходимы азотобактеру в первую очередь для осуществления процесса азотфиксации. Потребность в микроэлементах определяется в значительной степени геохимическими условиями существования азотобактера в почвах. Штаммы микроорганизма, выделенные из почв с высоким естественным содержанием того или иного микроэлемента, нуждаются, как правило, в более высоких концентрациях этих элементов.

Радиоактивные элементы (радий, торий, уран) оказывают стимулирующий эффект на развитие азотобактера и процесс азотфиксации.

Азотобактер чрезвычайно чувствителен к реакции среды. Оптимальная для его развития область pH 7,2—8,2. Однако азотобактер способен развиваться и на средах с pH от 4,5 до 9,0; кислая реакция среды неблагоприятно действует на его развитие. Из кислых почв выделяются неактивные формы азотобактера, утратившие способность связывать молекулярный азот.

Большое влияние на развитие азотобактера оказывает влажность почвы. Клетки азотобактера имеют меньшее осмотическое давление, чем клетки грибов и актиномицетов; потребность во влаге аналогична потребности высших растений. Азотобактер распространен в пресных водоемах, илах,

затопляемых рисовых полях, сточных водах, сильно увлажненных почвах, на водных растениях в прудах и водохранилищах. Это свидетельствует о его высокой степени гидрофильности. На основании высокой потребности во

влаге почвенных форм азотобактера предполагается, что предки некоторых морских и почвенных видов азотобактера могли быть общими.

В отношении температуры азотобактер является типичным мезофильным организмом, с оптимумом развития около 25—30 °С. Понижение температуры азотобактер переносит хорошо, поэтому зимой даже в северных широтах численность его клеток в почве заметно не уменьшается.

Из биологических факторов, влияющих на развитие азотобактера - это почвенные микроорганизмы. Они могут оказывать влияние на жизнедеятельность азотобактера в почве косвенно, изменяя, например, pH или окислительно-восстановительные условия, и непосредственно, вырабатывая питательные и биологически активные вещества. Так, активирующее влияние целлюлозоразрушающих и маслянокислых микроорганизмов на развитие азотобактера и его антагонистические отношения с представителями почвенной микрофлоры отмечали многие советские и зарубежные исследователи. Биоценоз микроорганизмов, формирующийся в условиях той или иной почвы, меняется в значительной степени под влиянием растительного покрова. И азотобактер как член биоценоза также зависит от этого фактора. С помощью метода радиоавтографии установлено, что при нанесении меченных по фосфору клеток азотобактера на семена зерновых культур клетки обычно концентрируются вокруг растущей корневой системы проростков.

Имеются данные, что клеток азотобактера в ризосфере растений очень мало. В самом лучшем случае (при полном отсутствии антагонистов и благоприятных окружающих условиях) их количество не превышает 1 % от общего числа ризосферной микрофлоры.

Культуры азотобактера, образуют значительное количество биологически активных веществ: витамины группы В, никотиновую и пантотеновую кислоты, биотин, гетероауксин и гиббереллин. Однако, несмотря на то что культуры азотобактера вырабатывают целую серию биологически активных веществ, внесение витаминов, гиббереллина и гетероауксина в среду ускоряет рост азотобактера. Реакция на дополнительное внесение витаминов в среду является индивидуальной особенностью штаммов.

Азотобактер продуцирует ростовые вещества типа ауксинов. Это подтверждается опытами, в которых было установлено образование дополнительных корешков у черенков фасоли под влиянием ауксинов,

вырабатываемых азотобактером. Биологический тест — карликовая форма гороха сорта Пионер — позволяет определить в культуре азотобактера гиббереллиноподобные соединения.

Все эти соединения в совокупности способны стимулировать прорастание семян растений и ускорять их рост в тех, конечно, случаях, когда на корневой системе растений находится достаточное количество клеток азотобактера.

Кроме того, была обнаружена антагонистическая активность азотобактера по отношению к возбудителям бактериальных болезней растений. Азотобактер синтезирует *фунгистатический* (задерживающий развитие грибов) антибиотик группы анисомицина. Ряд грибных организмов, встречающихся на семенах и в почве (виды из родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*), может угнетать развитие многих видов растений, особенно в холодную погоду. Азотобактер, продуцируя противогрибные антибиотические вещества, помогает растениям развиваться, что имеет особенно большое значение в ранние фазы развития.

К сожалению, способность азотобактера активно размножаться в почве и проявлять многогранные качества весьма ограничена за дефицитом легкодоступных органических веществ в почве и высокой требовательности микроорганизма к окружающим условиям. Поэтому стимулирующий эффект азотобактера проявляется лишь на плодородных почвах.

Распространение азотобактера в почвах Советского Союза имеет определенные закономерности. В целинных подзолах и дерново-подзолистых почвах, характеризующихся кислой реакцией, условия для развития азотобактера неблагоприятны. Только окультуривание таких почв создает возможности для его развития. В почвах с повышенным увлажнением и преобладанием луговой растительности (почвы пойм) азотобактер обычно встречается в течение всего вегетационного периода в больших количествах. В торфяниках азотобактер или отсутствует, или развивается очень слабо. В зоне достаточно увлажненных северных мощных черноземов азотобактер развивается хорошо, а в зоне обычных и южных черноземов при отсутствии орошения, а также в целинных и неполивных окультуренных каштановых почвах только как весенний эфемер. Максимальное развитие азотобактера в весенний период наблюдается и в целинных и в богарных почвах сероземной зоны. В солонцах и солончаках распространены преимущественно солестойкие расы азотобактера. В основном в почвах нашей страны доминирует *Azotobacter chroococcum*.

Бейеринкия (BEIJERINCKIA)

Впервые аэробные бактерии рода *Beijerinckia* были выделены из кислых почв рисовых полей в Индии в 1939 году. Г. Деркс в 1950 году, обнаружив эту бактерию в почве Ботанического сада в Богоре (Ява), предложил назвать ее именем М. Бейеринка — одного из первых исследователей фиксаторов азота.

Клетки бактерий рода *Beijerinckia* имеют круглую, овальную или палочковидную формы; палочки иногда искривлены. Размеры молодых клеток 0,5—2,0 X 1,0—4,5 мкм. Встречаются подвижные и неподвижные формы. Цист и спор не образуют. Культуры характеризуются медленным ростом. Типичные колонии формируются обычно через 3 недели при 30 °С. Большинство культур *Beijerinckia* образует на безазотном агаре с глюкозой выпуклые, нередко складчатые, блестящие слизистые колонии очень вязкой консистенции. При старении культуры, образуют темноокрашенный пигмент.

На 1г использованного энергетического материала организмы рода *Beijerinckia* фиксируют 16—20 мг молекулярного азота. Спектр углеродсодержащих соединений, доступных бейеринкии, значительно уже, чем у азотобактера. Хорошо используются моно- и дисахариды, хуже — крахмал, органические кислоты, ароматические вещества не усваиваются. Минеральный азот и многие аминокислоты бактерии рода *Beijerinckia* предпочитают молекулярному азоту.

Основные отличия бейеринкии от азотобактера — высокая кислотоустойчивость (могут расти даже при pH 3,0), кальцефобность (ничтожные дозы кальция подавляют рост), устойчивость к высоким концентрациям железа, алюминия.

Бактерии рода *Beijerinckia* широко распространены в почвах южной и тропической зоны, реже встречаются в зоне умеренного климата. *Beijerinckia* часто встречается на поверхности листьев тропических растений в Индонезии.

Раньше полагали, что бактерии рода *Beijerinckia* могут существовать только в кислых почвах. Сейчас установлено, что они неплохо развиваются и в нейтральных и щелочных почвах. Тем не менее следует полагать, что *Beijerinckia* играют значительную роль в азотном балансе главным образом кислых почв (латеритах, красноземах), не имея существенного агрономического значения для нейтральных почв.

Клостридиум (CLOSTRIDIUM)

Первый анаэробный микроорганизм, усваивающий молекулярный азот, был выделен и описан С. Н. Виноградским в 1893 г. Он оказался спорообразующей бактерией, которой было дано наименование *Clostridium pasteurianum* (родовое название происходит от латинского слова *clostrum* — веретено; видовое — *pasteurianum* — дано в честь Луи Пастера).

Клетки *Clostridium pasteurianum* крупные, их длина 2,5—7,5 мкм, ширина 0,7—1,3 мкм. Располагаются они поодиночке, парами или образуют короткие цепочки. Молодые клетки подвижны, имеют перитрихально расположенные жгутики, плазма их гомогенна. При старении клетки плазма становится гранулированной, в ней накапливается гранулеза (вещество типа крахмала). В центре клетки или ближе к ее концу формируется спора, которая в поперечнике значительно шире, чем вегетативная клетка, и поэтому клетка в этот период приобретает форму веретена. Размер спор 1,3 x 1,6 мкм.

Азотфиксирующая функция выявлена у многих представителей рода *Clostridium*: *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium beijerinckia*, *Clostridium pectinovorum*, *Clostridium acetobutylicum* и других видов. Наиболее энергичный азотонакопитель — *Clostridium pasteurianum* — фиксирует 5—10 мг азота на 1 г потребленного источника углерода.

Наряду с молекулярным азотом бактерии рода *Clostridium* хорошо усваивают минеральные и органические азотсодержащие соединения. В качестве источника углеродного питания бактерии рода *Clostridium* используют различные соединения, которые обычно одновременно служат для них и источником энергии. К фосфору, калию и кальцию они значительно менее чувствительны, чем азотобактер. Однако удобрение почв фосфорно-калийными солями, известкование почв или компостов всегда приводит к возрастанию численности.

Клостридии относительно устойчивы к кислой и щелочной реакции среды. Область pH, при которой их развитие протекает нормально, довольно широка; минимальное значение pH ниже 4,5, максимальное — выше 8,5.

Влияние воздушно-водного режима на развитие бактерий рода *Clostridium* изучено достаточно полно. Будучи анаэробными, они хорошо переносят высокое насыщение почвы влагой. Однако оптимальная степень увлажнения для них определяется типом почвы и обеспеченностью органическим веществом. Лучше всего клостридий развивается при влажности почвы, равной 60—80% от полной влагоемкости.

Больше всего бактерий рода *Clostridium* в верхних слоях почвы, которые богаты органическими веществами.

Бактерии рода *Clostridium* поразному относятся к температуре, встречаются как мезофильные, так и термофильные бактерии. Молекулярный азот фиксируют лишь мезофилы.

У мезофильных форм оптимальная температура развития чаще всего находится в диапазоне 25—30 °С. Предел максимальных температур 37—45 °С.

Споры клостридиев устойчивы к высоким температурам. Они выдерживают нагревание при 75 °С в течение 5 ч и в течение 1 ч нагревание при 80 °С. Споры термофильных клостридиев погибают при кипячении через 30 мин. Более высокая температура (110 °С) быстро убивает их.

Со многими микроорганизмами в почве *Clostridium* находится в метабиотических отношениях, при которых предполагается обмен продуктами метаболизма. Так, азотобактер улучшает условия жизни клостридия, поглощая кислород, а клостридий вырабатывает из органических соединений, недоступных азотобактеру, органические кислоты, которые может ассимилировать азотобактер.

«Всеядность» *Clostridium*, малая взыскательность к условиям внешней среды, а также способность в неблагоприятных условиях переходить в состояние спор объясняют их широкое, практически повсеместное распространение.

Накопления азота в почвах за счет деятельности *Clostridium* невелики и не превышают нескольких килограммов на один гектар почвы.

Другие роды азотфиксирующих бактерий

До недавнего времени считалось, что монополия азотфиксации принадлежит только представителям родов *Azotobacter*, *Clostridium* и *Rhizobium*.

Еще до выделения М. Бейеринком в 1901 году азотобактера и почти одновременно с С. Н. Виноградским в 1895 году клостридия, французский исследователь Бертло в 1885—1892 годах описал большое количество разнообразных почвенных микроорганизмов, обладающих азотфиксирующей функцией. Некоторые из них повышали содержание азота в среде на 80%. Однако отсутствие в ряде случаев идентификации выделенных культур и несовершенство используемых Бертло методик не давали права согласиться с утверждениями о значительной широте распространения азотфиксирующей функции среди почвенных микроорганизмов.

За последнее время использование высокочувствительного изотопного метода и других точных приемов исследования позволило установить способность многих почвенных микроорганизмов связывать атмосферный азот. Список азотоусвоителей пополнился новыми видами бактерий: *Azotomona sinsolita*, *Azotomonas fluorescens*, *Pseudomonas azotogensis*. Установлена азотфиксирующая способность у ряда известных бактерий, таких, как актиномицеты (*Actinomycetes*), фотосинтезирующие бактерии (*Rhodospirillum rubrum*), представители эубактерий (семейств *Thiorhodaceae*, *Athiorhodaceae*, а также родов: *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Bacillus*). Выявлено, что некоторые виды микроорганизмов, не фиксирующие азот в обычных условиях культивирования, могут стать энергичными азотфиксаторами в ассоциациях с другими видами микроорганизмов.

Сейчас известно свыше 80 видов и разновидностей бактерий, несколько видов актиномицетов, дрожжей, дрожжеподобных организмов и плесневых грибов, способных фиксировать азот. Они населяют почву, дно морей и пресных водоемов.

Способность фиксировать азот присуща ряду представителей семейства *Pseudomonadaceae*. К наиболее интересным представителям этого семейства относится несколько видов: *Azotomonas insolita*, фиксирующий до 12 мг азота на 1 г использованного сахара и встречающийся нередко не только в почве, но и как эпифит на растениях; *Azotomonas fluorescens*, выделенный впервые из компостов Н. А. Красильниковым в 1945 году, продуктивность азотфиксации которого не меньше, чем у первого вида; *Pseudomonas azotocolligans*, населяющий кислые и щелочные почвы Америки; *Pseudomonas azotogensis*, распространенный в почвах Канады и легко выделяющийся из парниковых почв, и *Pseudomonas methanitricifens*, который встречается в почвах, имеющих выход источников природных газов. Последняя бактерия особенно интересна тем, что она использует метан и другие газообразные углеводороды в качестве единственного источника углерода, за счет энергии разложения которых она усваивает азот атмосферы.

Представители семейства *Spirillaceae*, фиксирующие молекулярный азот, распространены в рыбоводных прудах, озерах, морской воде и отложениях. Возможно, они играют немаловажную роль в фиксации азота в водоемах.

Не только азотобактеру, как члену семейства *Azotobacteriaceae*, свойственна азотфиксирующая функция. В почвах Индии встречаются еще два представителя этого семейства — *Derxiagummosa* и *Derxiaindica* — активные, хотя и медленнодействующие, азотфиксаторы. В азотном балансе почв они, как и бактерии *Agrobacterium radiobacter* из семейства *Rhizobiaceae*, по-видимому, не играют сколько-нибудь значительной роли. Молекулярному

азоту они предпочитают связанные источники азота, такие, как мочевина, пептон, аминокислоты и минеральные соединения.

Среди спорообразующих грамположительных бактерий семейства *Bacillaceae* азотфиксирующая способность выявлена у факультативных анаэробов *Bacillus polymyxa*, аэробов *Bacillus megaterium* и *Thermobacillus azotofigens*. Последняя бактерия, выделенная из удобренной навозом дерново-карбонатной почвы Эстонской ССР, оказалась термофильной с оптимумом роста 45—50 °С и максимумом 60—65 °С. При температурах ниже 20 °С она не развивается.

Распространение функции азотфиксации в ряде семейств фотосинтезирующих бактерий (семейства *Thiorhodaceae*, *Athiorhodaceae*, *Chlorobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae*) не случайно, так как они являются представителями одной из древнейших групп азотфиксаторов на Земле.

Небольшие количества молекулярного азота способны усваивать почвенные микобактерии. Усвоенный микобактериями азот в сочетании с азотом, ассимилированным другими олигонитрофильными микроорганизмами, сине-зелеными водорослями, лишайниками и мхами, настолько обогащает примитивную почву азотом, что ее могут заселять высшие растения.

1.4. Нитрогеназа

Нитрогеназа — комплекс ферментов, осуществляющий процесс фиксации атмосферного азота. Широко распространён у бактерий и архей, в то время как все эукариоты его лишены.

Строение

Комплекс состоит из двух ферментов: собственно нитрогеназы и дегидрогеназы. После разделения они теряют свои каталитические свойства. Ферментативной активностью, однако, обладают «гибриды», например, Мо-Fe-белка азотобактера с Fe-белком клубеньковых бактерий.

- Мо-Fe-белок имеет массу порядка 230 кДа и состоит из 4 субъединиц двух типов. В состав его кофактора входят 2 атома молибдена.
- Fe-белок имеет массу 64 кДа и состоит из двух одинаковых субъединиц.

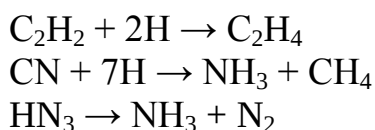
Нитрогеназа необратимо окисляется молекулярным кислородом, что заставляет азотфиксаторов искать способы защиты фермента.

Принцип работы

Реакция, катализируемая мультиферментом, выглядит следующим образом:



Нитрогеназа обладает низкой субстратной специфичностью и вместо азота может восстанавливать другие соединения с тройной связью: ацетилен, цианиды и азиды:



Донором электрона в реакции служит восстановленные ферридоксин или флаводоксин. Электрон с затратой энергии АТФ переносится Fe-белком с донора на Mo-Fe-белок, который, в свою очередь, трижды отдаёт пару электронов двум атомам азота, восстанавливая связанную в активном центре молекулу N_2 до двух NH_3 через следующие стадии:



В последнее время обнаружены различные альтернативные нитрогеназы:

- Ванадий-содержащая, генерирующая до 5 молекул аммиака на одну молекулу водорода, однако до 3 раз менее активная. Обнаружена у представителей рода *Clostridium*, *Azotobacter* и *Anabaena*.
- Fe-содержащая. Генерирует 10 молекул аммиака на одну молекулу водорода, не требует молибдена для синтеза, однако в 20 раз менее активная чем обычная нитрогеназа. Обнаружена у представителей р. *Azotobacter*, *Rhodobacter* и *Rhodopseudomonas*.
- Супероксид-содержащая. Нитрогеназная активность нечувствительна к кислороду (Романовский, 2000).

Атмосферный азот в форме N_2 относительно инертный благодаря своей тройной связи, поэтому фермент требует много химической энергии, освобождается за счет гидролиза АТФ и восстановления таких агентов, как дитионит (обычно *in vitro*) или ферродоксин *in vivo*. Продуктом реакции обычно является аммиак, который сразу объединяется с глутаматом, формируя глутамин. Фермент состоит из гетеротетрамер белка MoFe, который на короткое время связывается с гомодимерным белком Fe. Гетерокомплекс проходит через цикл ассоциации и диссоциации, чтобы перенести один электрон, является ограничивающим шагом процесса.

Процесс требует много энергии, требуя наличия донора электрона и АТФ для обеспечения восстановительных свойств. Точный механизм катализа все еще неизвестен из-за трудностей в получении кристаллов нитрогеназы со связанным азотом, так как в свободном состоянии белок MoFe не связывает азот, а сам процесс работы фермента требует как минимум трех переносов электрона на один катализ. Нитрогеназа может связывать ацетилен и угарный газ, которые являются неконкурентным субстратом и ингибитором фермента соответственно. Газообразный азот, однако, является конкурентоспособным субстратом для ацетилена, так как он предотвращает и 'связыванию ацетилена и, кроме того, ацетилен требует только один электрон для восстановления. Все нитрогеназы имеют кофакторы с атомами серы и железа, которые включает гетерометал в активном сайте. В большинстве, гетерометалом есть молибден, хотя в некоторых видах вместо него используется ванадий или железо. Благодаря окислительным свойствам кислорода, большинство нитрогеназы безвозвратно ингибируются кислородом (O₂), который навсегда окисляет Fe-S кофакторы. Поэтому фиксация азота требует механизмов избежания кислорода *in vivo*. Несмотря на эту проблему, многие организмы используют кислород как терминальный акцептор электрона для дыхания.

1.5. Происхождение нитрогеназы

Нитрогеназа обнаружена у представителей всех основных групп бактерий и архей, и были выдвинуты две гипотезы о происхождении этого фермента. В соответствии с первой из них *nif*-гены возникли до дивергенции основных групп прокариот (3,5-3,8 млрд лет назад), однако к настоящему времени сохранились лишь у некоторых из них. Согласно второй гипотезе *nif*-гены возникли после дивергенции прокариот (не ранее чем 2,2-2,5 млрд лет назад) и распространились среди них путем горизонтального переноса.

Первое время после открытия нитрогеназы предпочтение отдавалось второй гипотезе, так как представлялось очевидным, что приобретение бактериями *nif*-генов в условиях дефицита азота обеспечивает большое селективное преимущество – к diaзотрофному росту. В качестве подтверждения гипотезы о горизонтальном переносе *nif*-генов рассматривали их плазмидную локализацию, выявленную у ряда свободнодвижущих и симбиотических азотфиксаторов. Альтернативная гипотеза о раннем происхождении нитрогеназы противоречила представлениям о том, что древние организмы обитали в условиях избытка связанного азота. Более обоснованным выглядело предположение о том, что возникновение нитрогеназы

обусловлено дефицитом азота, образовавшимся в биосфере после появления фотосинтеза (3,0-3,5 млрд лет назад) и обострившимся после возникновения наземных растений (400-500 млн лет назад). Для подтверждения или опровержения гипотез о происхождении *nif*-генов была изучена связь их структуры с таксономией микроорганизмов, построенной на основании анализа генов 16S рРНК. Предполагалось, что если *nif*-гены активно распространялись среди прокариот путем горизонтального переноса, то их дивергенция не должна коррелировать с дивергенцией генов рРНК, перенос которых весьма ограничен (Kaluza et al., 1985).

Однако реальная ситуация оказалась обратной: корреляция структуры *nif*-генов и генов рРНК очень четкая. Таким образом, горизонтальный перенос *nif*-генов в эволюции прокариот был весьма ограничен, что согласуется с гипотезой об эволюционной древности нитрогеназы. Кроме того, в пользу этой гипотезы свидетельствует высокая чувствительность нитрогеназы к кислороду, что говорит о ее возникновении в докислородную эпоху эволюции биосферы (McKay, Navaro-Gonzales, 2002).

Существенную роль в эволюции азотфиксации играла дупликация и последующая дивергенция *nif*-генов, благодаря которой, согласно гипотезе Р. Фани и соавторов (Fani et al., 2000), возникла система синтеза MoFe-кофактора нитрогеназы. Гены *nifE* и *nifN*, контролирующие этот процесс, оказались гомологичными генам *nifD* и *nifK*, кодирующим субъединицы динитрогеназы. В условиях активной экспрессии *nif*-генов белки NifE и NifN образуют тетрамерную структуру, сходную с динитрогеназой. На этой структуре и происходит сборка кофактора, который затем включается в состав нитрогеназы.

Дупликация и дивергенция *nif*-генов могла обеспечить интересное направление эволюции азотфиксации, как возникновение безмолибденовых нитрогеназ, выявленных у *Anabaena*, *Azotobacter* и *Rhodobacter*. Например, у *A. vinelandii* в дополнение к канонической молибденсодержащей нитрогеназе имеются две альтернативные формы – ванадий содержащая и железосодержащая. В этих ферментах кофакторы динитрогеназы вместо молибдена содержат ванадий или железо.

Альтернативные нитрогеназы, как и каноническая форма фермента, содержат белки α , β и γ , формирующие две субъединицы. Общие для всех нитрогеназ белки кодируются генами *vnfHDK* (ванадий-содержащая) и *anfHDK* (Fe-содержащая), которые на 60-80% гомологичны генам *nifHDK*. Однако в состав альтернативных нитрогеназ входят и небольшие α -белки, которые кодируются генами *vnfG* и *anfG*. Альтернативные нитрогеназы обеспечивают

микроорганизмам повышенную экологическую пластичность, позволяя фиксировать азот в отсутствие молибдена. Ванадийсодержащая нитрогеназа синтезируется только в том случае, если в среде нет молибдена, а железосодержащая, если нет ни молибдена, ни ванадия.

В докислородную эпоху атмосфера Земли была, скорее всего, богата аммиаком и цианистым водородом. Поэтому многие исследователи считают, что первичной функцией нитрогеназы была не фиксация азота, а детоксикация цианидов, которые сдерживали развитие аэробных организмов. Исчезновение цианидов из атмосферы привело к тому, что у большинства микробов *nif*-гены утратились. Сохранились эти гены лишь у тех форм, которым они были нужны либо для диязотрофного роста, либо для организации симбиозов с организмами, испытывающими дефицит азота (Fani et al., 2000).

1.6. Структура и функции нитрогеназы

Нитрогеназа была впервые выделена на рубеже 50-60-х годов XX в. Из *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* и цианобактерий, затем ее нашли у *Klebsiella pneumoniae* и у *Rhizobium*. После сравнительного анализа этих бактерий было установлено, что нитрогеназа является весьма консервативным ферментом. Даже у таксономически неродственных микробов выявляется функциональная взаимозаменяемость ее компонентов: в условиях *in vitro* активный фермент можно получить при объединении субъединиц из разных организмов. Консервативность нитрогеназы имеет огромное методическое значение, так как позволяет использовать зонды, содержащие гены нитрогеназы модельных организмов (например, *K. pneumoniae*), для поиска новых азотфиксаторов, а также для выделения их *nif*-генов (Пюлер и др., 1988).

У всех известных азотфиксаторов нитрогеназа состоит из белков трех типов (α , β и γ) и двух кофакторов: молибден-железосодержащего (MoFe-кофактора) и железосодержащего (Fe-кофактора). Эти компоненты организованы в две субъединицы: большую-динитрогеназу, в состав которой входит MoFe-кофактор, и малую-редуктазу динитрогеназы, содержащую Fe-кофактор. Восстановление молекул азота происходит при взаимодействии с динитрогеназой, которая получает необходимые для этого активированные электроны от редуктазы динитрогеназы.

Нитрогеназе свойственна низкая субстратная специфичность: она способна восстанавливать широкий спектр соединений с тройной связью, в том числе

цианиды и ацетилен. Вторая реакция лежит в основе «ацетиленового» метода определения нитрогеназной активности, основанного на легком разделении ацетилена и этилена с помощью газовой хроматографии. Несмотря на существенные ограничения, которые связаны с влиянием ацетилена на каталитические свойства нитрогеназы, а в случае симбиозов- и на газовую проницаемость растительных тканей и клеток, содержащих бактерии, «ацетиленовый» метод широко используется в работе с азотфиксирующими системами, в том числе и при проведении селекции на повышение нитрогеназной активности (Witty, Minchin, 1988).

Наиболее эффективными источниками энергии, способными обеспечить высокую интенсивность биологической азотфиксации, являются окислительное фосфорилирование и фотосинтез (Кретович, 1994).

Эти процессы сопряжены с присутствием кислорода, который поглощается при дыхании или выделяется при фотолизе воды. Однако нитрогеназа очень чувствительна к кислороду: она необратимо инактивируется даже при небольших его концентрациях (около 100 нмоль/л). Поэтому у микробов-азотфиксаторов имеются разнообразные механизмы, позволяющие защищать нитрогеназу от кислорода. Простейший из них - это активация генов нитрогеназы только в анаэробных условиях, что характерно для *Klebsiella*. У *Azotobacter* при переходе к азотфиксации активируется «защитное дыхание», связанное с синтезом особых цитохромов. Благодаря этому внутриклеточная концентрация кислорода снижается до уровня, совместимого с работой нитрогеназы, и бактерии могут фиксировать азот в аэробной среде. Более сложный механизм состоит в том, что азотфиксирующие клетки образуют плотную оболочку, которая очень медленно пропускает кислород. Это характерно для цианобактерий, образующих гетероцисты, которые фиксируют азот в аэробных условиях. При симбиотической азотфиксации функцию защиты нитрогеназы от кислорода может выполнять хозяин (Hennecke et al., 1997; Hennecke, 2004).

1.7. Организация и экспрессия *nif*-генов

Первыми микроорганизмами, у которых была выяснена организация генов нитрогеназы, стали свободноживущие азотфиксаторы *Klebsiella pneumoniae* и *Azotobacter vinelandii*. У энтеробактерии *K. pneumoniae* эта система включает 25 *nif*-генов, которые организованы в семь транскрипционных единиц, собранных в единый хромосомный кластер. При переносе этого кластера из *K. pneumoniae* в генетически близкий организм, кишечную палочку

(*Escherichia coli*) она приобретает способность фиксировать азот, хотя и не столь активно, как бактерия донор (Dixon, Postgate, 2002).

Полная расшифровка структурно-функциональной организации *nif*-кластера *Klebsiella* была завершена А. Пюлером и В. Клиппом в начале 80-х годов XX в. (Puhler, Klipp, 2001).

Наиболее подробно изучены гены *nifH*, *nifD*, *nifK*, которые кодируют структуру α , β и γ -белков нитрогеназы, а также гены *nifM*, *nifS*, *nifU*, *nifY*, определяющие процессинг этих белков. Специальная группа генов (*nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV*) кодирует синтез MoFe-кофактора (Arnold et al., 2008).

Регуляцию синтеза нитрогеназы у *Klebsiella* и *Azotobacter* осуществляет оперон *nifA-nifL*, продукты которого образуют двухкомпонентную систему. Белок *nifA* является транскрипционным регулятором, содержащим С-концевой ДНК-связывающий домен, центральный домен, а также регуляторный N-концевой домен. Находясь в активной форме, этот белок взаимодействует с промоторами *nif*-генов и активирует их транскрипцию, однако она ингибируется в присутствии молекулярного кислорода или связанного азота. Эти ингибиторы воздействуют на белок *nifL*, который подавляет активность белка *nifA*, не позволяя ему активировать *nif*-промоторы (Dixon et al., 2007).

Гены, ответственные за азотфиксацию

Все микроорганизмы, в том числе и клубеньковые бактерии, которые способны фиксировать азот, обладают специфическим ферментным комплексом, который называется «нитрогеназа», восстанавливающим молекулярный азот до аммиака (Сидорова, 2010). Восстановление молекул азота происходит при взаимодействии с динитрогеназой, которая получает необходимые для этого активированные электроны от редуктазы динитрогеназы (Тихонович и Проворов, 2009).

Процесс восстановления азота до аммиака требует затрат большого количества энергии. Это связано с чрезвычайной стабильностью тройной связи в молекуле азота – одной из самых прочных химических связей. Наиболее эффективными источниками энергии, способными обеспечить высокую интенсивность биологической азотфиксации, являются окислительное фосфорилирование и фотосинтез. Эти процессы сопряжены с присутствием кислорода, который поглощается при дыхании или выделяется при фотолизе воды. Однако нитрогеназа очень чувствительна к кислороду: она необратимо инактивируется даже при небольших его концентрациях (около 100 нмоль/л) (Тихонович и Проворов, 2009). Поэтому в клубеньках

присутствует железосодержащий белок – леггемоглобин, который аналогичен гемоглобину крови человека и животных по строению и функции. Леггемоглобин связывает кислород и, тем самым создает условия для работы нитрогеназы (Сидорова, 2010).

Синтез и регуляцию фермента нитрогеназы кодируют комплекс *nif* генов. У ризобий *nif* гены разделены на несколько кластеров, что отражает сложную регуляцию симбиотической азотфиксации, осуществляемую не только внешними факторами, но и растением-хозяином. За регуляцию синтеза и созревание нитрогеназного комплекса отвечают гены *nifX*, *nifS*, *nifQ* и *nifW*. Специальная группа генов (*nifB*, *nifE*, *nifN*) кодирует синтез MoFe-кофактора.

У некоторых ризобий выявлены множественные копии гена *nifH*: *R. etli* имеет 3 идентичные копии, тогда как копии *nifH1* и *nifH2* у *A. caulinodans* различаются по 6 нуклеотидам. Все эти копии кодируют функционально активные белки, участвующие в азотфиксации, а их высокое сходство или даже идентичность говорит о том, что многокопийность гена *nifH* является результатом дупликаций, а не горизонтального переноса. Эта многокопийность может играть роль в адаптации ризобий к фиксации азота в различных экологических условиях. Нельзя исключить и того, что некоторые из копий *nifH* могут выполнять редуктазные функции в биохимических процессах, не связанных с азотфиксацией (Спайнк и др., 2002).

У ризобий, как и у несимбиотических азотфиксаторов, транскрипция структурных генов нитрогеназы активируется геном *nifA* (Тихонович и проворов, 2009). Однако функции этого гена у ризобий значительно шире, чем у свободноживущих бактерий. Во-первых, *nifA*-зависимая активация синтеза нитрогеназы у ризобий является кислород-чувствительной, что связано с присутствием в белке NIFA дополнительного кислород-связывающего домена. Во-вторых, у ризобий *nifA* контролирует экспрессию ряда генов, непосредственно не связанных с азотфиксацией: *nfe* (нодуляционная конкурентоспособность) и *mos* (синтез ризопинов) у *R. meliloti*, *glnII* (синтез глутаминсинтетазы-2) и *groELS* (синтез шаперонов) у *B. japonicum*; *melA* (синтез меланина) у *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. У многих видов ризобий мутации в гене *nifA* нарушают развитие и стабильность клубеньков, тогда как мутации в структурных генах нитрогеназы не влияют на эти признаки (Жуков и др., 2009).

У *Klebsiella pneumoniae* гены "упакованы" в один компактный хромосомный кластер, тогда как у ризобий *nif*- и *fix*-гены могут составлять несколько кластеров, разбросанных по геному. У *R. meliloti*, как и у *K. pneumoniae*,

кластер содержит все выявленные *nif*-гены. Однако между генами *nifE* и *nifN* расположен оперон *nodABC*, кодирующий образование клубеньков. У *R. leguminosarum* bv. *viciae* и bv. *trifolii* относительное расположение *nif*- и *fix*-генов такое же, как у *R. meliloti*, тогда как относительное расположение *nod* генов варьирует, хотя они всегда сцеплены с *nif* генами. У *A. caulinodans* и *B. japonicum* *nif*-гены составляют не менее двух крупных хромосомных кластеров.

Большинство *nif*-генов организовано в опероны, состав которых варьирует у разных видов. Так, у *R. meliloti* гены *nifH* и *nifD* транскрибируются совместно с *nifK*, *nifE*, *ORFII0* и *nifN* (Спайнк и др., 2002), тогда как у *A. caulinodans* общая транскрипционная единица имеет состав *nifHDKE*. У *B. japonicum*, а также у медленно растущих симбионтов *Vigna* и *Parasponia*, *nifH* транскрибируется отдельно от *nifDK*, которые составляют общий оперон с *nifE*, *nifN* и *nifX*. Гены *fixABCX* составляют общую единицу транскрипции у всех ризобий за исключением *B. japonicum*, у которых *fixA* и *fixBCX* - разные опероны. Ген *nifA* может транскрибироваться как отдельная единица у *A. caulinodans* (Ratet et al., 1989) или как часть оперона: *fixRnifA* у *B. japonicum* или *nifABfdxNy* *R. meliloti* (Спайнк и др., 2002).

У всех видов ризобий выявлена специфическая система регуляции азотфиксации, состоящая из генов *fixL*, *fixJ*, *fixK*. Данные гены имеют гомологов у свободноживущих бактерий, однако эти гомологи не связаны с контролем азотфиксации. Гены, гомологичные *fixLJ*, кодируют двухкомпонентные регуляторные системы (*FIXL* – мембранный белок, обладающий киназной и фосфатазной активностями; *FIXJ* – цитоплазматический фосфорилируемый белок регулятор транскрипции). Активация этой системы происходит лишь в макроаэрофильных условиях, поскольку *fixL* является гем - содержащим сенсором кислорода. Гомологи *fixK* – это транскрипционные регуляторы, относящиеся к семейству *Crp* – *Fnr*. У ризобий система регуляции азотфиксации помимо структурных генов нитрогеназы включает гены *dctABD* (кодируют транспорт в бактериоиды дикарбоновых кислот, являющихся основным источником энергии для азотфиксации), *fixNOPQGHIS* (кодируют синтез бактериоидной цитохромоксидазы *CBV3*, обеспечивающей транспорт электронов в дыхательных цепях бактериоидов) и гены биосинтеза гема (Жуков и др., 2009; Юрков и др., 2007).

Основными признаками ризобий, характеризующими их симбиотический потенциал, являются: азотфиксирующая (нитрогеназная) активность, симбиотическая эффективность (влияние на продуктивность растений), а также способность конкурировать за образование клубеньков и хозяйская

специфичность, проявляемая по отношению к разным видам и сортам растений (Проворов, 2009). Изучение взаимосвязи этих признаков необходимо для разработки - экспресс методов отбора эффективных симбиотических систем, которую обычно связывают с использованием “ацетиленового” метода (Hardy et al., 1968), основанного на способности нитрогеназы разрывать тройную связь не только в молекуле N_2 , но и в молекуле C_2H_2 (в последнем случае основным продуктом нитрогеназной реакции является этилен C_2H_4). Дешевизна и простота определения ацетиленредуктазной активности позволяет использовать ее для того, чтобы исключать из селекции симбиотически неактивные генотипы (Nod-, Fix-), и среди активных (Fix+) растений и бактерий отбирать формы с максимальным проявлением признаков симбиоза (Проворов, 2009). Симбиотически важные гены ризобий часто сгруппированы в больших плазмидах (pSym) или внутри геномных островков (называемых симбиотическими островками - CO). Длина симбиотических островков *B. japonicum* штамма USDA110611 составляет 681 kb. Интеграция CO в геномы *M. loti* и *B. japonicum* происходит внутри генов phe-tRNA и val-tRNA, соответственно. Схожесть CO у обоих видов с интегразой, родственной фагу, означает то что CO могли появиться вследствие древней интеграции бактериофага. Наоборот, у *S. meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum*, и *Sinorhizobium* sp. штамма NGR234 большинство генов, вовлеченных в симбиоз (nod, nif, и fix) имеет плазмидную локализацию.

У ряда видов, таких как *R. leguminosarum* (биотипы *viciae* и *trifolii*), *S. meliloti*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. tropici*, NGR234 *Rhizobium* sp., гены нодуляции находятся на Sym-плазмидах и лишь регуляторный ген *noIR* локализован в хромосоме. У других ризобий (*B. japonicum*, *A. caulinodans*, *S. fredii*, *M. loti*) все гены нодуляции находятся в хромосоме (Allyson et al., 2007).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Компьютерные программы для анализа нуклеотидных последовательностей Lasergene.

Пакет компьютерных программ Lasergene состоит из программ, специализированных для работы с последовательностями нуклеиновых кислот и полипептидов. Каждая программа выполняет свою узкую задачу. Программа Editseq предназначена для сохранения последовательностей ДНК и белков в специальном формате, где есть возможность кроме собственно самой последовательности сохранять и всю легенду этой последовательности, в которой содержится вся необходимая информация, включая авторов, описание последовательности, а также информацию о публикации, где упомянута данная последовательность. Данный формат с расширением файлов *.seq в дальнейшем позволяет другим программам пакета.

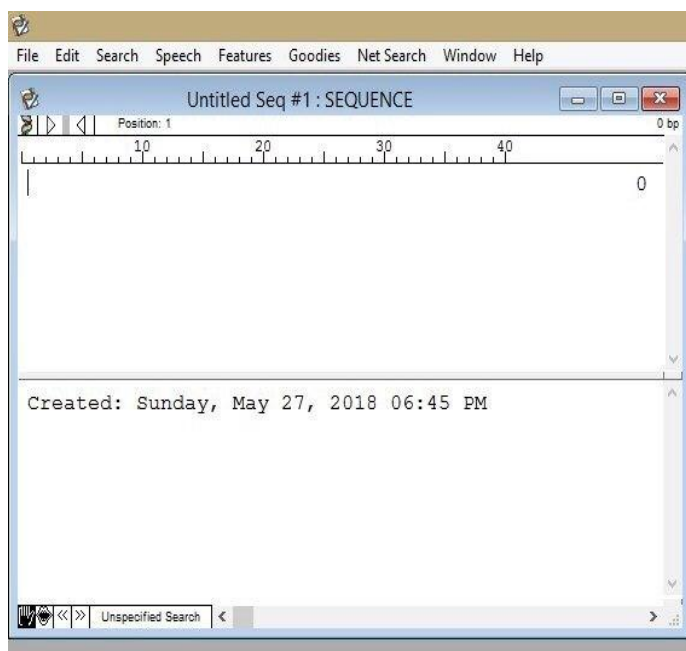


Рис. 1. Программа EditSeq для анализа нуклеотидных последовательностей.

2.2. Краткий обзор базы нуклеотидных последовательностей

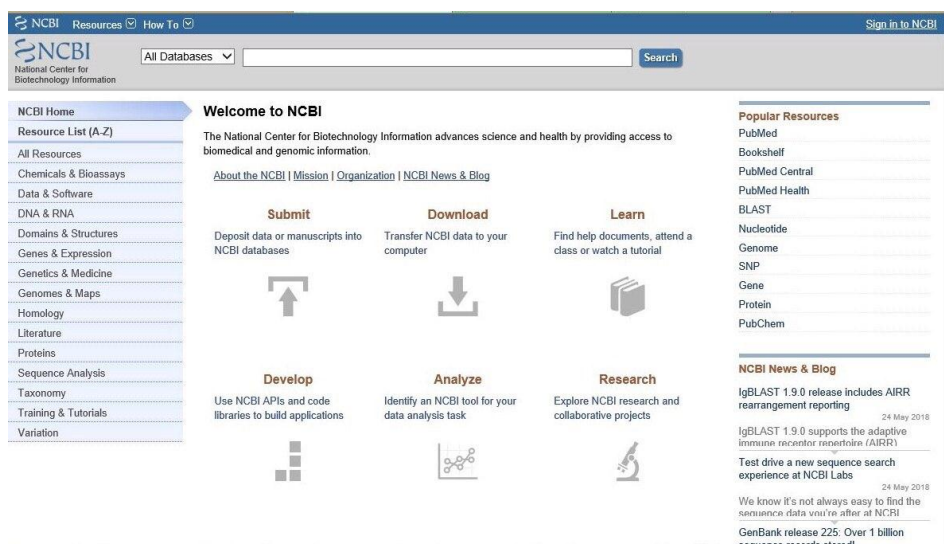
GenBank — база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков. GenBank поддерживается Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI),

входящего в состав Национальных Институтов Здоровья в США, и доступен на бесплатной основе исследователям всего мира. GenBank получает и объединяет данные, полученные в разных лабораториях, для более чем 100 000 различных организмов.

GenBank — архивная база данных, то есть ответственность за содержимое каждой записи несут создатели этой записи, которыми, как правило, являются экспериментаторы, определившие данную последовательность. GenBank вместе с банками EMBL и DDBJ входит в консорциум INSDC (<http://insdc.org/>), осуществляющий регулярный обмен данными между этими тремя архивами аннотированных нуклеотидных последовательностей.

Релиз GenBank происходит каждые два месяца и доступен с сайта по протоколу FTP. Заметки о выпуске для текущей версии GenBank предоставляют подробную информацию о выпуске и уведомлениях о предстоящих изменениях в GenBank. Также доступны примечания к выпуску предыдущих версий GenBank.

NCBI постоянно совершенствует и создает новые средства для помещения новых последовательностей в базу, средства эффективного поиска в базе. Крупнейшая интегрированная поисковая система ENTREZ для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, библиографии (PubMed), полных геномов (Genomes), а также трехмерных структур белков (MMDB) создана и поддерживается NCBI. При этом поиск ДНК и белков не ограничивается только ресурсами GenBank, но и другими доступными по сети хранилищами информации.



2.3. Работа с программой BLAST

BLAST (англ. *BasicLocalAlignmentSearchTool* — средство поиска основного локального выравнивания) — семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент. Используя BLAST, исследователь может сравнить имеющуюся у него последовательность с последовательностями из базы данных и найти последовательности предполагаемых гомологов. Является важнейшим инструментом для молекулярных биологов, биоинформатиков, систематиков. Программа BLAST была разработана учёными StephenAltschul, WarrenGish, WebbMiller, EugeneMyers, и David J. Lipman в системе Национальных институтов здравоохранения США и была опубликована в журнале *JournalofMolecularBiology* (англ.) в 1990.

Классификация программы BLAST

Нуклеотидные (предназначены для сравнения изучаемой нуклеотидной последовательности с базой данных секвенированных нуклеиновых кислот и их участков):

- megablast — быстрое сравнение с целью поиска высоко сходных последовательностей,
- dmegablast — быстрое сравнение с целью поиска дивергировавших последовательностей, обладающих незначительным сходством,
- blastn — медленное сравнение с целью поиска всех сходных последовательностей и др.

Белковые (предназначены для сравнения изучаемой аминокислотной последовательности белка с имеющейся базой данных белков и их участков):

- blastp — медленное сравнение с целью поиска всех сходных последовательностей,
- cdart — сравнение с целью поиска гомологичных белков по доменной архитектуре,
- rpsblast — сравнение с базой данных консервативных доменов,
- psi-blast — сравнение с целью поиска последовательностей, обладающих незначительным сходством,
- phi-blast — поиск белков, содержащих определённый пользователем паттерн и др.

Транслирующие (способны транслировать нуклеотидные последовательности в аминокислотные):

- blastx — переводит изучаемую нуклеотидную последовательность в кодируемые аминокислоты, а затем сравнивает её с имеющейся базой данных аминокислотных последовательностей белков,
- tblastn — изучаемая аминокислотная последовательность сравнивается с транслированными последовательностями базы данных секвенированных нуклеиновых кислот,
- tblastx — переводит изучаемую нуклеотидную последовательность в аминокислотную, а затем сравнивает её с транслированными последовательностями базы данных секвенированных нуклеиновых кислот.

Геномные (предназначены для сравнения изучаемой нуклеотидной последовательности с базой данных секвенированного генома какого-либо организма (человека, мыши и др.))

Специальные (прикладные программы, использующие BLAST):

- bl2seq — сопоставление двух последовательностей по принципу локальных выравниваний,
- VecScreen — определение сегментов нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут иметь векторное происхождение и др.

Принципы работы BLAST

Все выравнивания делят на глобальные (последовательности сравниваются полностью) и локальные (сравниваются только определённые участки последовательностей). Программы серии BLAST производят локальные выравнивания, что связано с наличием в различных белках сходных доменов и паттернов. Кроме этого локальное выравнивание позволяет сравнить иРНК с геномной ДНК. В случае глобального выравнивания обнаруживается меньшее сходство последовательностей, особенно их доменов и паттернов.

После введения изучаемой нуклеотидной или аминокислотной последовательности (запрос) на одну из веб-страниц BLAST, она вместе с другой входной информацией (база данных, размера «слова» (участка), значение величины E и др.) поступает на сервер. BLAST создаёт таблицу всех «слов» (в белке — это участок последовательностей, который по

умолчанию состоит из трёх аминокислот, а для нуклеиновых кислот из 11 нуклеотидов) и сходных «слов».

Затем в базе данных проводится их поиск. Когда обнаруживается соответствие, то делается попытка продлить размеры «слова» (до 4 и более аминокислот и 12 и более нуклеотидов) сначала без гэпов (пробелов), а затем с их использованием. После максимального продления размеров всех возможных «слов» изучаемой последовательности, определяются выравнивания с максимальным количеством совпадений для каждой пары запрос — последовательность базы данных, и полученная информация фиксируется в структуре SeqAlign. Форматер, расположенный на сервере BLAST, использует информацию из SeqAlign и представляет её различными способами (традиционным, графическим, в виде таблицы).

Для каждой обнаруженной в базе данных программами BLAST последовательности необходимо определить, насколько она сходна с изучаемой последовательностью (запрос) и значимо ли это сходство. Для этого BLAST вычисляет число битов и величину E (expectedvalue, E-value) для каждой пары последовательностей.

При определении сходства ключевым элементом является матрица замен, так как она определяет показатели сходства для любой возможной пары нуклеотидов или аминокислот. В большинстве программ серии BLAST используется матрица BLOSUM62 (BlocksSubstitutionmatrix 62 % identity, блоковая матрица замен с 62 % идентичности). Исключением являются blastn и megablast (программы, которые выполняют нуклеотид — нуклеотидные сравнения и не используют матрицы аминокислотных замен).

С помощью модифицированных алгоритмов Смита-Уотермана или Селлерса определяются все пары сегментов (продленные «слова»), которые нельзя увеличить, так как это приведёт к уменьшению показателей сходства. Такие пары продленных «слов» называются парами сегментов с максимальным сходством (high-scoringsegmentpairs, HSP).

Теоретически локальное выравнивание может начинаться с любой пары нуклеотидов или аминокислот выровненных последовательностей. Однако HSP, как правило, не начинаются близко к краю (началу или концу) последовательностей. Для коррекции такого краевого эффекта необходимо вычислять эффективную длину последовательностей. В случае последовательностей длиной более 200 остатков происходит нейтрализация краевого эффекта.

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool

My NCBI

[Sign In](#) | [Register](#)

[Home](#)
[Recent Results](#)
[Saved Strategies](#)
[Help](#)

▶ [NCBI/BLAST/blastp suite](#)

[blastn](#)
[blastp](#)
[blastx](#)
[tblastn](#)
[tblastx](#)

Enter Query Sequence

BLASTp programs search protein databases using a protein query. [more...](#)

[Reset page](#)
[Bookmark](#)

Enter accession number, gi, or FASTA sequence

>

VRTKSSRTWFSLLLALLIFVPTVAPNHKAEAAQNGTMMQYFEWYVPNDGQHWNRLRNDAAYLKSI

Query subrange

From

To

Or, upload file

Job Title

VRTKSSRTWFSLLLALLIFVPTVAPNHKAEAAQNGTMMQYFEWYVPNDGQHWNRLRNDAAYLKSI

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database

Non-redundant protein sequences (nr)

Organism

Optional

☐ Exclude

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Exclude

Optional

☐ Models (XMP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query

Optional

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Algorithm

☐ blastp (protein-protein BLAST)

☒ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)

☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

Search database **Non-redundant protein sequences (nr)** using **PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)**

☒ Show results in a new window

▶ [Algorithm parameters](#)

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback

NCBI | NLM | NIH | DHHS

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

С целью выполнения задач дипломной работы была проделана следующая работа. Для выявления степени полиморфности гена *nifA* у бактерий проведен их сравнительный анализ. Было выполнено сравнение последовательностей исследуемого гена как у штаммов внутри отдельных родов ризобий (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*), так и общее сравнение данных последовательностей микроорганизмов относящихся к группе клубеньковых бактерий. Последовательности для сравнения были получены из GenBank.

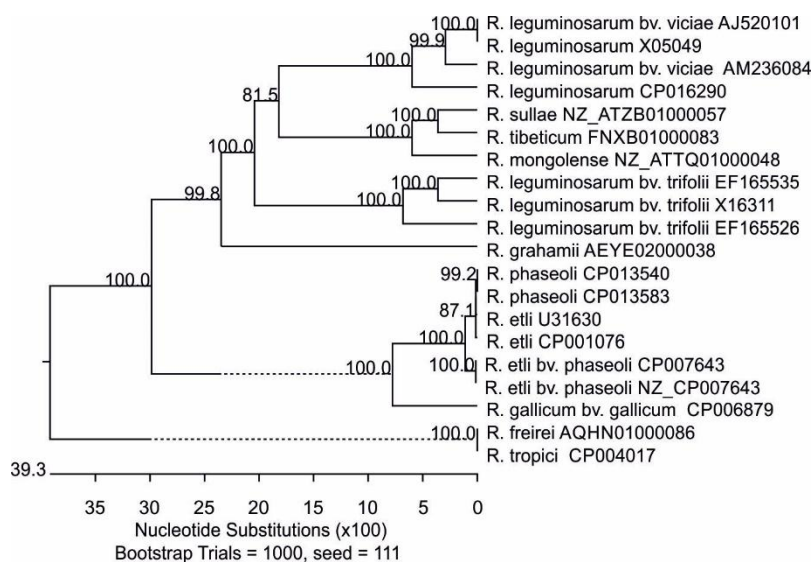


Рис. 2. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*.

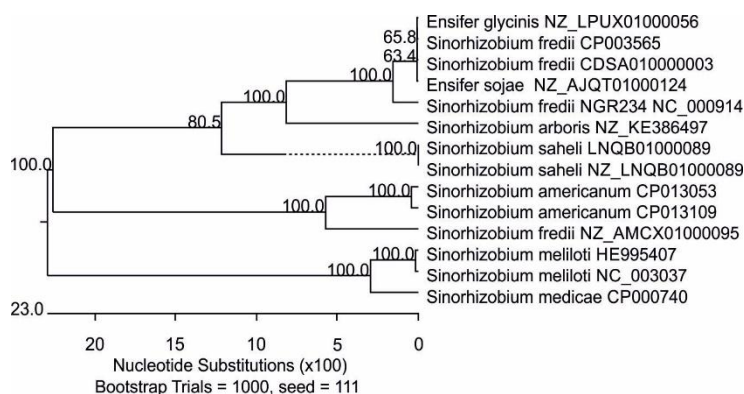


Рис. 3. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода *Ensisifer* (*Sinorhizobium*), построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*.

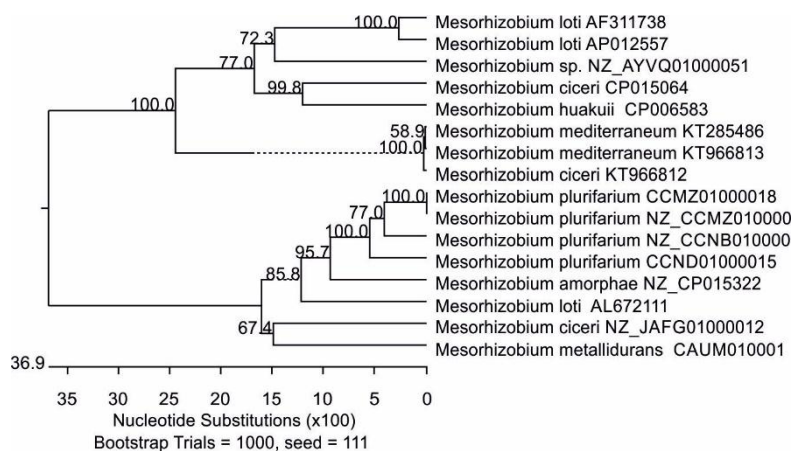


Рис. 4. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий рода *Mesorhizobium*, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*.

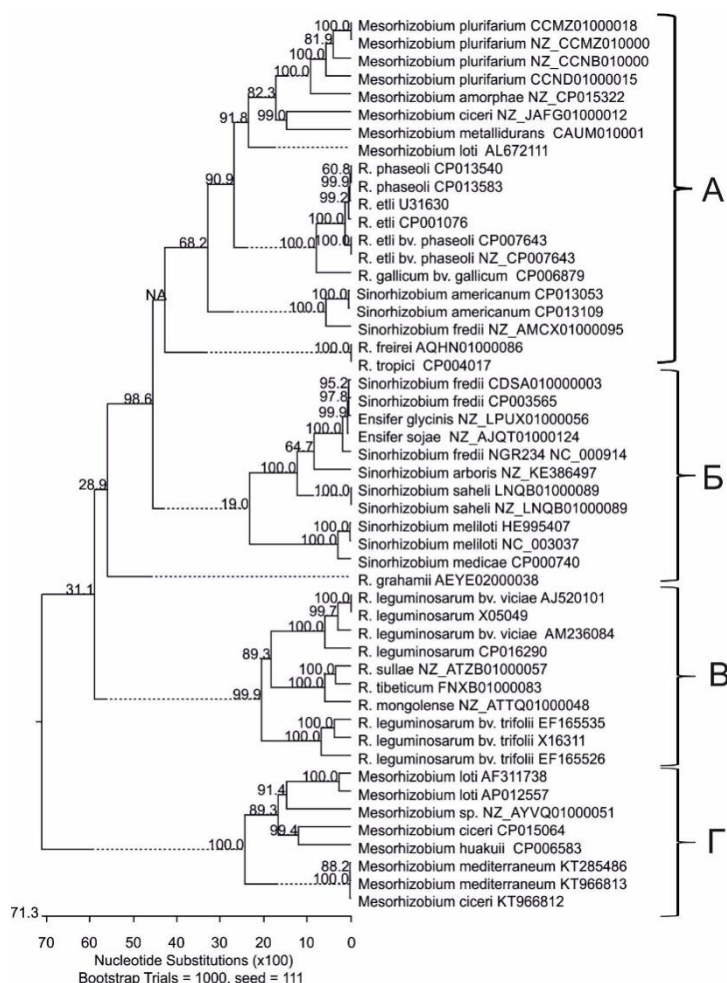


Рис. 5. Филогенетическое древо клубеньковых бактерий, построенное на основе сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. А – кластер образованный сразу тремя родами бактерий; Б- кластер образованный бактериями рода *Ensifer* (*Sinorhizobium*); В - кластер образованный бактериями рода *Rhizobium*; Г - кластер образованный бактериями рода *Mesorhizobium*.

По результатам анализа был обнаружен высокий полиморфизм гена *nifA* внутри родов бактерий, выражающийся как в нуклеотидном составе (рис.2-4), так и в размере генов. Так полученным из GenBank данным внутри рода

Mesorhizobium разница в размерности данного гена составляет 800 п.н. Так для некоторых штаммов *Mesorhizobium loti* размер гена *nifA* составляет 1000 п.н., а размер этого же гена у штаммов *Mesorhizobium ciceri* достигает 1800 п.н. Примерно такая же разница обнаруживается и внутри бактерий рода *Rhizobium*. Так у бактерий *Rhizobium leguminosatum* штаммы, относящиеся к разным биоварам имеют сильно отличающиеся по размеру гены *nifA*. Так для *bv. viciae* размерность данного гена примерно составляет 1700 п.н., а у *bv. trifolii* ~ 1050 п.н. Кроме того, по результатам множественного выравнивания была обнаружена весьма высокая степень гетерогенности и по нуклеотидному составу данного гена внутри анализируемых родов бактерий. Эти данные говорят о том, что ген *nifA* не является консервативным и, вероятно, высокая его вариабельность связана с различиями активации генов нитрогеназного комплекса у разных штаммов клубеньковых бактерий.

Более интересные данные были получены при сравнительном анализе последовательностей данного гена между штаммами разных родов клубеньковых бактерий. Было обнаружено, что на филогенетическом древе, построенном на основе множественного выравнивания последовательностей генов *nifA* представители разных родов клубеньковых бактерий образуют преимущественно отдельные кластеры. Так например на рисунке 5 видно что кластер Б образован бактериями рода *Ensifer* (*Sinorhizobium*), кластер В – *Rhizobium*, кластер Г – *Mesorhizobium*. Но если обратить внимание на кластер А, то оказывается, некоторые штаммы всех анализируемых родов имеют в составах своих геномов схожие *nifA* гены. Из этого следует, что нет строгого соответствия филогении гена *nifA* и самих бактерий. Из чего можно предположить, что такое обстоятельство возможно возникло из-за того, что симбиотические гены активно включены в процесс горизонтального переноса генов.

ВЫВОДЫ

1. Для гена *nifA* характерен высокий полиморфизм внутри родов бактерий, выражающийся как в нуклеотидном составе, так и в размере генов.
2. Выявлено отсутствие строгого соответствия филогении гена *nifA* и гена 16S рРНК бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Умаров М. М., Кураков А. В., Степанов А. Л. Микробиологическая трансформация азота в почве. — М.: ГЕОС, 2007.
2. Б.В. Романовский "Современный катализ: наука или искусство?". Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 9. — С. 43-48.
3. Доуни Дж. Функции ризобияльных генов клубенькообразования. В кн.: Rhizobiaceae. СПб, 2002: 417-434.
4. Камински П., Батут Ж., Боистард П. Контроль симбиотической фиксации азота ризобиями. В кн.: Rhizobiaceae. СПб, 2002: 465-492.
5. Nye T., Lio P., Gilks W. A novel algorithm and web-based tool for comparing two alternative phylogenetic trees. Bioinformatics, 2005, 22(1): 117-119.
6. Nye T. Trees of trees: an approach to comparing multiple alternative phylogenies. Syst. Biol., 2008, 57(5): 785-794 (doi: 10.1080/10635150802424072).
7. Provorov N., Andronov E. Evolution of root nodule bacteria: reconstruction of the speciation processes resulting from genomic rearrangements in a symbiotic system. Microbiology, 2016, 83(2): 131-139 (doi: 10.1134/S0026261716020156).
8. Gonzalez V., Santamaria R., Bustos P. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. PNAS USA, 2006, 103(10): 3834-3839 (doi: 10.1073/pnas.0508502103).
9. Girard M., Flores M., Brom S. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. J. Bacteriol., 1991, 173(8): 2411-2419.
10. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*

11. USDA110. DNA Res., 2002, 9(6): 189-197 (doi: 10.1093/dnares./9.6.189).
12. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res., 2000, 7(6): 331-338 (doi: 10.1093/dnares./7.6.331).
13. Reeve W., Chain P., O'Hara G. Complete genome sequence of the *Medicagomicrosymbiont* *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419. Stand Genomic Sci., 2010, 2(1): 77-86 (doi: 10.4056/siqs.43526).
14. Reeve W., O ' H a r a G., Chain P. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. Stand Genomic Sci., 2010, 2(1): 66-76 (doi: 10.4056/sigs.44642).
15. Young J., Crossman L., Johnston A. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biol., 2006, 7(4): R34 (doi: 10.1186/gb-2006-7-4-r34).
16. Bardin, S.D.; Finan, T.M. Regulation of phosphate assimilation in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. Genetics 1998, 148, 1689–1700.
17. Кретович В.А. Биохимия усвоения азота воздуха растениями / М.: Наука, 1994.- 168 с.
18. Тихонович И.А., Проворов Н.А., 2009. Симбиозы растений и микроорганизмов / С.-Пб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 210с.
19. Молекулярная биология бактерий *Rhizobiaceae*, взаимодействующих с растениями / Ред.: Г. Спайнк и др.; Рус.пер. под ред. И.А.Тихоновича. - СПб. : [б. и.], 2002. - 567 с.
20. Проворов Н.А., Воробьев Н.Н. Эволюционная генетика клубеньковых бактерий: молекулярные и популяционные аспекты // Генетика. 2000. - Т. 36, -№ 12.-С. 1573-1587

- 21.Симаров Б.В., Аронштам А.А., Новикова Н.И. и др. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий / Л.: Агропромиздат, 1990.192с.

ПРИЛОЖЕНИЕ



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Салахова Миляуша Нафисовна
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401Б
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА NIF A У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
Название файла	ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА NIF A У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ.docx
Процент заимствования	7,54%
Процент цитирования	1,63%
Процент оригинальности	90,83%
Дата проверки	13:55:15 25 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"

Работу проверил

Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи

27.06.2018.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего

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



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

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Салахова Миляуша Нафисовна выполнила выпускную квалификационную работы на тему «Исследование полиморфизма гена *nifA* у клубеньковых бактерий»

Работа представляет из себя биоинформатический анализ генетического разнообразия и филогении гена регуляторного белка *nifA* у клубеньковых бактерий. В работе использованы современные биоинформатические инструменты в виде компьютерных программ. Проведена работа с базой данных нуклеотидных последовательностей GenBank, онлайн-инструментом Blast и прикладными коммерческими программами из пакета программ Lasergene.

За время обучения в БГМУ Салахова Миляуша Нафисовна проявила удовлетворительные способности к освоению учебного материала.

В процессе выполнения ВКР Салахова Миляуша Нафисовна освоила биоинформатические программы, используемые для сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей, работу с базой данных нуклеотидных последовательностей и инструментами для обработки, форматирования и сохранения информации с баз данных.

Считаю, что ВКР Салаховой Миляушой Нафисовной выполнена удовлетворительно.

РАБОТА ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ.

Научный руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



Ан.Х.Баймиев.

ОТЗЫВ

внешнего рецензента кандидата биологических наук Матниязова Рустама Тахировича на выпускную квалификационную работу Салаховой Миляуши Нафисовны «Исследование полиморфизма гена *nifA* у клубеньковых бактерий».

Актуальность темы исследования.

Белок NifA является неотъемлемой частью азотфиксирующего аппарата клубеньковых бактерий. Поскольку симбиотические гены, к которым также относятся гены белков нитрогеназного комплекса, характеризуются высокой мобильностью, то в их эволюции большую роль играет комбинативность, механизм возникновения которого можно отследить с помощью анализа эволюции отдельных генов белков нитрогеназного комплекса. Поэтому исследование генетического разнообразия генов *nifA* является весьма актуальной для понимания эволюции становления азотфиксирующего аппарата бактерий.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Работа имеет теоретическую значимость для понимания эволюции азотфиксации у бактерий на примере ризобий и становления азотфиксирующего аппарата у прокариотических организмов. С практической точки зрения работа может быть полезна при селекции клубеньковых бактерий для создания микроудобрений.

Достоверность и апробация результатов исследования.

Результаты полученные в ходе работы достоверны.

Оценка содержания, завершенности и оформления ВКР.

Работа выполнена удовлетворительно, оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к оформлению ВКР. Содержание соответствует названию работы, цели и задачи соответствуют выводам.

Соответствие направлению подготовки.

Работа соответствует направлению подготовки

Закключение. Таким образом, выпускная квалификационная работа Салаховой Миляуши Нафисовны «Исследование полиморфизма гена *nifA* у клубеньковых бактерий», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Баймиева Андрея Ханифовича является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01. – Биология (бакалавриат).

Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (Адрес: Уфа, проспект Октября, 71. Тел.: (347) 2356088; Факс: (347) 2356088; E-mail: rmat@mail.ru)

Матниязов Рустам Тахирович



Доклад к защите дипломной работы

[1 слайд]:

Уважаемые председатель и члены государственной комиссии, разрешите представить Вам доклад на тему:

«ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА NIF A У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ»

[2 слайд]:

Белок NifA является неотъемлемой частью азотфиксирующего аппарата клубеньковых бактерий. Поскольку симбиотические гены, к которым также относятся гены белков нитрогеназного комплекса, характеризуются высокой мобильностью, то в их эволюции большую роль играет комбинативность, механизм возникновения которого можно отследить с помощью анализа эволюции отдельных генов белков нитрогеназного комплекса. Поэтому исследование генетического разнообразия генов nifA является актуальной для понимания эволюции становления азотфиксирующего аппарата бактерий.

[3 слайд]:

Цель работы: Исследование генетического разнообразия и филогении генов nifA у клубеньковых бактерий.

Задачи исследования:

4. Сбор последовательностей генов nifA азотфиксирующих бактерий из базы нуклеотидных последовательностей.
5. Провести филогенетический анализ собранных последовательностей.
6. Провести сравнение филогении гена nifA и 16S рибосомального гена.

[4 слайд]:

Компьютерные программы для анализа нуклеотидных последовательностей Lasergene.

Пакет компьютерных программ Lasergene состоит из программ, специализированных для работы с последовательностями нуклеиновых кислот и полипептидов. Каждая программа выполняет свою узкую задачу. Программа Editseq предназначена для сохранения последовательностей ДНК и белков в специальном формате, где есть возможность кроме собственно самой последовательности сохранять и всю легенду этой последовательности, в которой содержится вся необходимая информация, включая авторов, описание последовательности, а также информацию о публикации, где упомянута данная последовательность. Данный формат с

расширением файлов *.seq в дальнейшем позволяет другим программам пакета.

[5 слайд]:

GenBank — база данных, находящаяся в открытом доступе, содержащая все аннотированные последовательности ДНК и РНК, а также последовательности закодированных в них белков. GenBank поддерживается Национальным центром биотехнологической информации США (NCBI), входящего в состав Национальных Институтов Здоровья в США, и доступен на бесплатной основе исследователям всего мира. GenBank получает и объединяет данные, полученные в разных лабораториях, для более чем 100 000 различных организмов.

BLAST (англ. BasicLocalAlignmentSearchTool — средство поиска основного локального выравнивания) — компьютерная программа, служащая для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна первичная структура (последовательность) или её фрагмент. Используя BLAST, исследователь может сравнить имеющуюся у него последовательность с последовательностями из базы данных и найти последовательности предполагаемых гомологов. Является важнейшим инструментом для молекулярных биологов, биоинформатиков, систематиков.

[6 слайд]:

Megalign- сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, построение филогенетических деревьев.

[7-9 слайд]:

С целью выполнения задач дипломной работы была проделана следующая работа. Для выявления степени полиморфности гена *nifA* у бактерий проведен их сравнительный анализ. Было выполнено сравнение последовательностей исследуемого гена как у штаммов внутри отдельных родов ризобий (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*), так и общее сравнение данных последовательностей микроорганизмов относящихся к группе клубеньковых бактерий. Последовательности для сравнения были получены из GenBank.

По результатам анализа был обнаружен высокий полиморфизм гена *nifA* внутри родов бактерий, выражающийся как в нуклеотидном составе (рис.2-4), так и в размере генов. Так полученным из GenBank данным внутри рода

Mesorhizobium разница в размерности данного гена составляет 800 п.н. Так для некоторых штаммов *Mesorhizobium loti* размер гена *nifA* составляет 1000 п.н., а размер этого же гена у штаммов *Mesorhizobium ciceri* достигает 1800 п.н. Примерно такая же разница обнаруживается и внутри бактерий рода *Rhizobium*. Так у бактерий *Rhizobium leguminosatum* штаммы, относящиеся к разным биоварам имеют сильно отличающиеся по размеру гены *nifA*. Так для *bv. viciae* размерность данного гена примерно составляет 1700 п.н., а у *bv. trifolii* ~ 1050 п.н. Кроме того, по результатам множественного выравнивания была обнаружена весьма высокая степень гетерогенности и по нуклеотидному составу данного гена внутри анализируемых родов бактерий. Эти данные говорят о том, что ген *nifA* не является консервативным и, вероятно, высокая его вариабельность связана с различиями активации генов нитрогеназного комплекса у разных штаммов клубеньковых бактерий.

[10 слайд]:

Более интересные данные были получены при сравнительном анализе последовательностей данного гена между штаммами разных родов клубеньковых бактерий. Было обнаружено, что на филогенетическом древе, построенном на основе множественного выравнивания последовательностей генов *nifA* представители разных родов клубеньковых бактерий образуют преимущественно отдельные кластеры. Так например на рисунке 5 видно что кластер Б образован бактериями рода *Ensifer* (*Sinorhizobium*), кластер В – *Rhizobium*, кластер Г – *Mesorhizobium*. Но если обратить внимание на кластер А, то оказывается, некоторые штаммы всех анализируемых родов имеют в составах своих геномов схожие *nifA* гены. Из этого следует, что нет строгого соответствия филогении гена *nifA* и самих бактерий. Из чего можно предположить, что такое обстоятельство возможно возникло из-за того, что симбиотические гены активно включены в процесс горизонтального переноса генов.

[11 слайд]:

ВЫВОДЫ:

1. Для гена *nifA* характерен высокий полиморфизм внутри родов бактерий, выражающийся как в нуклеотидном составе, так и в размере генов.
2. Выявлено отсутствие строгого соответствия филогении гена *nifA* и гена 16S рРНК бактерий.