**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**
**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования**

**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
*Институт фундаментальной медицины и биологии*
*Кафедра микробиологии*

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Изучение штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами**

Студент 3 курса

Группа 01-902

« »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2022г. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ А.В. Коробова

Научный руководитель

д.б.н., профессор,

 « »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2022г. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ М.Р. Шарипова

Казань-2022

**СОДЕРЖАНИЕ**

[**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 3](#_Toc100584060)

[**ВВЕДЕНИЕ** 4](#_Toc100584061)

[**1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 6](#_Toc100584062)

[1.1 Характеристика генома и протеома *Bacillus sp.* 6](#_Toc100584063)

[1.2 Характеристика штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами 9](#_Toc100584064)

[1.3 Методы редактирования генома грамположительных бактерий. Технология CRISPR-cas 12](#_Toc100584065)

[**2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ** 17](#_Toc100584066)

[2.1 Штаммы бактерий 17](#_Toc100584067)

[2.2 Питательные среды и культивирование 17](#_Toc100584068)

[2.3 Изучение динамики роста 18](#_Toc100584069)

[2.4 Определение фосфатазной активности 18](#_Toc100584070)

[2.6 Статистическая обработка результатов 19](#_Toc100584071)

[**3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** 20](#_Toc100584072)

[3.1 Изучение динамики роста штаммов *B. subtilis* с редуцированными геномами и штамма *B. subtilis* 168 20](#_Toc100584073)

[3.2 Определение динамики накопления протеолитической активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* 22](#_Toc100584074)

[3.3 Определение динамики накопления фосфатазной активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* 24](#_Toc100584075)

[**ВЫВОДЫ** 26](#_Toc100584076)

[**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ** 27](#_Toc100584077)

# **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

|  |  |
| --- | --- |
| АТФ | Аденозинтрифосфа́т |
| ДНК | Дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ОП | Оптическая плотность |
| ПЦР | Полимера́зная цепна́я реа́кция |
| РНК | Рибонуклеи́новая кислота́ |
| тРНК | Транспортная Рибонуклеи́новая кислота́ |
| Трис-HCl | Трисаминометан-HCl (буфер) |
| ТХУ | Трихлоруксусная кислота |
| HDR | Homology directed repair |
| LB | Среда Лурия-Бертолли |
| MS/MS | Масс спектрметрический анализ |
| NHEJ | Non-homologous end joining |
| PAM | Protospaser Adjacent Motif |
| pNPP | para-Nitrophenylphosphate |
| GeLC-MS/MS | Gel-based Liquid Chromatography-mass Spectrometry |
| DPA | Docosapentaenoic acid |
| DSB | Double Strand Break |
| IM | Inner Membrane spore |
| ZFN | Zinc finger nuclease |
| TALE (TALEN) | Transcription activator-like effector nuclease |
| tracrRNA | трансактивирующая crRNA |
| CRISPR | Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats |
| crRNA | CRISPR РНК |
| sgRNA | направляющая РНК |

**ВВЕДЕНИЕ**

Бактерии рода *Bacillus* широко используются для производства промышленных ферментов. Бациллы считаются многообещающими штаммами-хозяевами с многочисленными преимуществами, включая: нетоксичность, удобство модификации генов и высокий выход целевых белков, высокую скорость роста и низкую потребность в питательных веществах. Однако, *Bacillus sp.* продуцируют большое количество внеклеточных протеаз. В связи с этим, изучение и тестирование штаммов с редуцированными геномами для продукции гетерологичных белков является актуальной задачей биотехнологии.

В настоящей работе были изучены штаммы *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами: 27-24 и 27-39, в геноме которых инактивированы гены спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ, а также встроена кассета *comK/comS* для повышения эффективности трансформации (любезно предоставлены проф. J. Altenbuchner). В качестве контрольного штамма использовали *B. subtilis* 168. Полученные данные станут основой для использования штаммов с редуцированными геномами в качестве клеток-реципиентов для получения рекомбинантных белков.

Целью работы являлось изучение штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами.

Рабочая гипотеза заключается в том, что штаммы *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами: 27-24 и 27-39 предположительно обладают меньшей протеолитической активностью по сравнению с контрольным штаммом *B. subtilis* 168, а также являются полезными для использования в качестве продуцентов рекомбинантных белков свойствами.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1. Изучить динамику роста штаммов *B. subtilis* с редуцированными геномами и штамма *B. subtilis* 168;
2. Определить динамику накопления протеолитической активности штаммов B. subtilis с редуцированными геномами;
3. Определить динамику накопления фосфатазной активности штаммов B. subtilis с редуцированными геномами.

**1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## 1.1 Характеристика генома и протеома *Bacillus sp.*

*Bacillus subtilis* является характерным представителем бактерий рода *Bacillus*, впервые геном был секвенирован в 1997 году [Kunst *et al.*, 1997]. Геном *B. subtilis* состоит из 4 214 810 пар оснований (п.о.) и содержит 4100 генов, кодирующих белки, при этом 53% из них представлены один раз, в то время как четверть генома имеет дупликации генов. Самое большое семейство – ABC-транспортеры содержит 77 предполагаемых транспортных белков, связывающих АТФ. Кроме того, значительная часть генетического потенциала посвящена использованию различных источников углерода, включая многие молекулы растительного происхождения. Многие из генов участвуют в синтезе вторичных метаболитов, включая антибиотики [Kunst *et al.*, 1997]. *B. subtilis* продуцирует такие антибиотики, как атерримин, бацилипин, бацилизин, бацилломиксин, бациллин, бацилломицин, и т.д [Тагиева, Гахраманова, 2020]. Геном *B. subtilis* содержит по меньшей мере десять профагов или остатков профагов, указывающих на то, что бактериофаговая инфекция сыграла важную эволюционную роль в горизонтальном переносе генов, в частности в распространении бактериального патогенеза [Kunst *et al.*, 1997].

В 2004 году была расшифрована полная последовательность генома промышленной бактерии *Bacillus licheniformis*– это грамположительная спорообразующая почвенная бактерия, которая используется в биотехнологической промышленности для производства ферментов, антибиотиков, биохимических препаратов и потребительских товаров [Rey *et al.,* 2004]. Этот вид производит целый ряд внеклеточных ферментов, которые могут способствовать круговороту питательных веществ в природе. Полная нуклеотидная последовательность генома *B. licheniformis* ATCC 14580 включает круговую хромосому из 4 222 336 п.о., содержащую 4208 предсказанных генов, кодирующих белки со средним размером 873 п.о., семь оперонов рРНК и 72 гена тРНК. Rey с соавторами показали, что хромосома *B. licheniformis* содержит большие области, которые являются коллинеарными с геномами *B. subtilis* и *Bacillus halodurans,* и примерно 80% прогнозируемых кодирующих последовательностей *B. licheniformis* имеют ортологи *B. subtilis*. Тем не менее, несмотря на организационное сходство между геномами *B. licheniformis* и *B. subtilis,* существуют заметные различия в количестве и расположении профагов, транспонируемых элементов и ряда внеклеточных ферментов и оперонов вторичных метаболических путей, которые отличают эти виды [Rey *et al.,* 2004].

Помимо генома, важной характеристикой вида в целом и штамма в частности является протеом. Ортология белков является важным фактором при определении степени родства видов. Так, выявлено 2787 основных белков, составляющих ортологию у всех представителей *B. subtilis* [Khatri *et al*., 2016]. С появлением масс-спектрометрии и открытием полных последовательностей генома, началось быстрое развитие протеомики [Wolff *et all*., 2007]. С помощью 2D электрофореза в клетках *B. subtilis* были выявлены белки центрального углеводного метаболизма (гликолиза, пентозофосфатного шунта и цикла лимонной кислоты), почти всех путей синтеза аминокислот, метаболизма пиримидинов, жирных кислот и основных клеточных функций, таких как репликация, транскрипция, трансляция и синтез клеточной стенки. С помощью масс спектрметрического анализа (MS/MS) было идентифицировано 1014 цитозольных белков из экспоненциально растущих клеток. Таким образом, заложен комплексный анализ протеома бактерий [Wolff *et al*., 2007].

В августе 2021 года Хенк Л. Деккер и коллеги опубликовали исследование протеома *B. subtilis* во время спорообразования. Было предпринято много усилий для изучения механизма спорообразования. В результате транскрипции генов спорообразования и трансляции мРНК вегетативные клетки претерпевают ряд морфологических изменений вплоть до выхода спор в окружающую среду. Для непосредственного изучения протеома спор была создана *kinA*-индуцируемая система спорообразования, которая обеспечивает синхронную инициацию образования спор и приводит к значительно более гомогенной популяции спорулирующих клеток. Благодаря использованию масс-спектрометрического анализа было идентифицировано 2370 белков. Было показано, что во время споруляции существует четыре основных модуля коэкспрессируемых белков. Два из них были в основном заселены белками, связанными со споруляцией. Таким образом, это исследование впервые показывает высокоточное представление об изменениях экспрессии белков во время споруляции и выявляет отдельные модули совместно экспрессируемых белков, которые активируются или репрессируются на определенных стадиях споруляции [Tu *et al*., 2021].

В 2016 году Линли Чжен с соавторами опубликовали исследование, в котором они выделили внутреннюю мембрану спор *B. subtilis* параллельно с выделением мембраны вегетативных клеток. С использованием GeLC-MS/MS (Gel-based Liquid Chromatography-mass Spectrometry) было идентифицировано более 900 белков из препаратов внутренней мембраны спор *B. subtilis* [Zheng *et al.*, 2016]. В исследовании было показано, что повреждение внутренней мембраны играет важную роль в уничтожении спор под воздействием высоких температур и окисления. Высокие температуры могут вызвать разрушение внутренней мембраны, что способствует высвобождению DPA (Дипиколиновой кислоты) из ядра споры. Окисляющие агенты повреждают внутреннюю мембрану спор и могут вызвать их уничтожение, не вызывая при этом высвобождения DPA [Zheng *et al.*, 2016]. Было идентифицировано большое количество уникальных белков, а также белков, общих для мембранных протеомов. В дополнение к ранее известным белкам внутренней мембраны был идентифицирован новый ряд белков интеркалярной мембраны, некоторые из которых, дадут новое представление о физиологии внутренних мембран, раскрывая белки, предположительно участвующие в механизме прорастания спор, и, следовательно, предполагаемые цели ингибирования прорастания [Zheng *et al.*, 2016].

## 1.2 Характеристика штаммов *Bacillus subtilis* с редуцированными геномами

С биотехнологической точки зрения геномная инженерия *Bacillus* очень привлекательна, поскольку позволяет устранить нежелательные особенности, такие как выработка поверхностно-активных веществ, и перенаправить клеточный метаболизм на выработку белков и витаминов, которые являются основными продуктами *Bacillus*. До настоящего времени большинство исследований геномной инженерии были в большей степени сосредоточены на понимании функционирования живой клетки с фундаментальной точки зрения, чем с точки зрения промышленного применения бактерий с редуцированным геномом.

К примеру, как показали Manabe и коллеги, сокращение генома *B. subtilis* (штамм MGB874) на 20.7% привело к повышению выхода секретируемой щелочной целлюлазы Egl237 примерно в 2 раза [Manabe *et al.,* 2011]. Тем не менее, штамм *B. subtilis* (MG1M) с уменьшенным на 23.3% геномом секретировал щелочную целлюлазу и субтилизиноподобную щелочную протеазу до уровня, сопоставимого со штаммом 168 [Ara *et al.,*  2007].

В исследовании 2017 года Reuß с соавт. сконструировали штаммы *B. subtilis*  PG10 и PS38 с делецией 36% генома. Было показано, что полученные штаммы полностью жизнеспособны, и их темпы роста в сложной питательной среде сопоставимы с темпами роста штаммов дикого типа. Мультиомный анализ штаммов с редуцированными геномами показал, как делеции влияют на регуляторную сеть транскрипции клетки, трансляции и метаболизм. Сравнение количества генов и распределения ресурсов, необходимых для трансляции (тРНК, рибосомы, аминокислоты и т.д.), демонстрирует резкие различия в двух параметрах: 50% генов используют всего 10% трансляционной способности, в то время как 6% основных генов требуют 57% трансляционных ресурсов. Был проведен мультиомный анализ, который выявил значительные последствия делеций на уровнях транскриптома, протеома и метаболома. По меньшей мере 65% всех белков с различным количеством делеций между эталонными и редуцированными штаммами демонстрируют аналогичные изменения на уровне транскриптома [Reuß *et al.,* 2017]. Интересно, что представление функциональных классов резко отличается на уровне протеома. В эталонном штамме *B. subtilis* Δ6 белки, участвующие в обработке информации, требуют 56% трансляционной способности клетки, в то время как соответствующие гены занимают лишь 20% генома. Аналогично, ферменты и белки, участвующие в метаболизме, чрезмерно представлены в протеоме по сравнению с их долей в геноме, т.е. уровень их экспрессии значительно выше, чем уровень их представленности в геноме. У штаммов с редуцированным геномом наблюдается снижение способности к синтезу белка, хотя количество генов, отвечающих за обработку информации, увеличилось с 20% до 24% [Reuß *et al.,* 2017].

В работе Suárez *с соавт*. (2019) тестировали различные штаммы *B. subtilis* в качестве продуцентов гетерологичных секретируемых репортерных белков *Staphylococcus aureus* (CHIPS, SCIN, IsaA Nuc): протеазодефицитные штаммы *B. subtilis* (BRB02, BRB03, BRB04, BRB05, BRB06, BRB07, BRB08, BRB09, BRB10, BRB11, BRB12, BRB13, BRB14), а также штаммы *B. subtilis* 168, *B. subtilis* Δ6 и штамм *B. subtilis* PG10 (редуцировано 36% генома). Было показано, что штамм PG10 позволяет производить секретируемые гетерологичные стафилококковые репортерные белки, которые не могут быть получены с помощью штамма *B. subtilis* 168. Кроме того, было показано, что штамм *B. subtilis* PG10 более эффективен как продуцент гетерологичных секретируемых репортерных белков, чем протеазодефицитные штаммы BRB02, BRB03, BRB04, BRB05, BRB06, BRB07, BRB08, BRB09, BRB10, BRB11, BRB12, BRB13 и BRB14. Полезные свойства штамма PG10 связаны как с уменьшением протеолиза, так и с усилением трансляции. Среди протеазодефицитных штаммов наилучшие результаты показали BRB08, BRB11, BRB12 и BRB14, тем не меннее, авторы сделали вывод о том, что удаления генов ответственных за протеазную активность недостаточно для серьезного увелечения продукции изучаемых белков. Также было проведено сравнение деградации продукта после его синтеза у разных штаммов и предпринята попытка ингибировать остаточную активность протеазы, вызывающую деградацию продукта у штамма PG10 путем добавления ингибиторов протеаз в среду растущих бактерий. Действительно, это работало для IsaA, продуцируемого штаммом PG10, где деградация IsaA была существенно снижена в течение первых 5 ч после индукции. Таким образом, данное исследование представляет собой доказательство того, что геномная инженерия является источником большого числа возможностей для производства “сложных белков” на основе клеток *B. subtilis*. Примером этого является штамм PG10, продуцирующий четыре различных стафилококковых антигена, которые не могут быть получены с помощью применяемых в настоящее время штаммов *B. subtilis*. Следует отметить, что штаммы 168 и PG10 далеки от изогенных из-за удаления 36% генома у штамма PG10. Это затрудняет определение конкретных мутаций, приведших к улучшению выработки белка штаммом PG10. Тем не менее, это исследование подчеркивает преимущества оптимизации генома как подхода к повышению ценных свойств штаммов бацилл для производства белка. Для раскрытия потенциала таких штаммов, необходима дальнейшая оптимизация, особенно в отношении деградации продукта, снижения лизиса клеток и простоты использования при крупномасштабной ферментации. Такой подход может дать возможность получить штаммы нового поколения для производства широкого спектра белков, включая не только ферменты, но и многие жизненно необходимые биофармацевтические препараты [Suárez *et al.,* 2019].

## 1.3 Методы редактирования генома грамположительных бактерий. Технология CRISPR-cas

Методы редактирования генома представлены четырьмя основными типами: первые используют мегануклеазы, вторые - нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), третьи – нуклеазы TALE (TALEN), и четвертые - CRISPR/Cas9. Более ранние технологии введения двухцепочечных разрывов, такие как нуклеазы цинкового пальца (ZFN) и активаторы транскрипции, подобные эффекторным нуклеазам (TALEN), представляют собой слияние неспецифического домена расщепления ДНК от эндонуклеазы рестрикции FokI и специфичных к последовательности ДНК-связывающих доменов, полученных из белков цинкового пальца и TALE. ZFN и TALEN требуют перекодирования белков для каждого нового целевого сайта, что очень дорого и требует затрат времени. CRISPR/Cas9 для нацеливания на новый сайт требует только подходящей sgRNA. Кроме того, экспрессия Cas9 и нескольких направляющих РНК может быть использована для одновременного редактирования нескольких целевых сайтов в геноме млекопитающих [Cong *et al.,* 2013]. Дело в том, что технология CRISPR/Cas9 проста в разработке и производстве, высокоэффективна и недорога [Harms *et al.*, 2014].

CRISPR (Clustered Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats)– особые локусы бактерий и архей, состоящие из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены уникальными последовательностями (спейсерами). Система CRISPR/Cas представляет собой высокоадаптивный и наследуемый механизм резистентности, который включает короткие последовательности вирусов и других мобильных генетических элементов в локус CRISPR хозяина [Charpentier, Marraffini, 2014].

CRISPR были впервые обнаружены в геноме *Escherichia coli* в 1987 году [Ishino *et al.,* 1987]. Ишино и коллеги заметили локусы, содержащие повторяющиеся последовательности с неизвестной функцией, следующие после генов *iap*. Локусы CRISPR наблюдаются почти в 40% геномов секвенированных бактерий и почти в 90 % геномов секвенированных архей [Sorek *et al.,* 2008]. В 2007 году группа ученых продемонстрировала, что CRISPR вместе с ассоциированными генами Cas образуют адаптивный иммунитет, обеспечивающий устойчивость к бактериофаговой инфекции [Barrangou *et al.*, 2007]. CRISPR/Cas системы бактериального адаптивного иммунитета классифицируются на три типа в соответствии с различиями между последовательностью и структурой белков Cas. Механизмы иммунитета в системах CRISPR/Cas I и III типов достаточно сложны, поэтому эти типы не применяются в геномной инженерии. Самой простой среди систем CRISPR/Cas является тип II, который требует наличие только одного многофункционального белка Cas9. Эта прокариотическая система была адаптирована в молекулярной биологии, она стала одной из самых мощных и универсальных платформ для геномной инженерии. CRISPR/Cas9 – это простой и быстрый инструмент, который позволяет эффективно модифицировать эндогенные гены в различных видах и типах клеток. Простота CRISPR/Cas9 привела к широкому использованию этой технологии во многих областях, включая фундаментальные исследования, биотехнологию и биомедицину [Hryhorowicz *et al.,* 2016].

В системе CRISPR/Cas9 для резки мишени необходимы три компонента: белок Cas9, CRISPR РНК (crRNA) и трансактивирующая crRNA (tracrRNA), которая способствует созреванию crRNA и образованию комплекса Cas9. Образование системы CRISPR/Cas типа II включает три стадии: 1) получение CRISPR; 2) биогенез crRNA; 3) интерференция со вторгающейся ДНК. Сначала вторгшаяся ДНК фага обрабатывается нуклеазой Cas на небольшие фрагменты ДНК, называемые протоспейсерными последовательностями, а затем включается в локус CRISPR бактериального генома в качестве нового спейсера [Wiedenheft *et al.,* 2012]. Впоследствии, на стадии биогенеза, локус CRISPR транскрибируется в длинную предшественницу CRISPR РНК (пре-crRNA), tracrRNA гибридизуется с повторяющимися последовательностями пре-crRNA, а затем эндогенная РНКаза III расщепляет этот комплекс, давая зрелые crRNAs, каждая из которых содержит один спейсер и частичную последовательность повторов [Deltcheva *et al..* 2011]; [Pougach *et al.,* 2010]. Наконец, на этапе интерференции зрелая crRNA направляет белок Cas9 к комплементарным чужеродным нуклеиновым кислотам, вызывая деградацию последовательностей ДНК вторгающихся фагов [Garneau *et al.,* 2010] [Marraffini, Sontheimer*,* 2008].

Направляющая последовательность внутри спейсеров CRISPR обычно соответствует чужеродным вирусным геномам, составляющим форму приобретенного иммунитета бактерий, но может быть легко заменена представляющей интерес последовательностью для нацеливания на белок Cas9. В 2012 году две исследовательские группы опубликовали результаты, в которых говорится, что очищенный Cas9, полученный из *Streptococcus thermophilus* или *Streptococcus pyogenes*, может управляться crRNAs для расщепления целевой ДНК *in vitro* [Gasiunas *et al.*, 2012] [Jinek *et al.*, 2012]. Для распознавания цели Cas9 требует наличие последовательности PAM (Protospaser Adjacent Motif) в целевой ДНК и спаривание комплементарных оснований направляющей последовательностью РНК и комплементарной последовательностью ДНК-мишени [Jinek *et al.,* 2012]. Cas9-генерируемые сайт-специфичные двухцепочечные разрывы ДНК индуцируют эндогенные процессы репарации клеточной ДНК, которые могут быть использованы для инженерии генома. DSB (Double Strand Break - двунитевые разрывы) обычно восстанавливаются одним из двух путей: гомологичной направленной репарацией (HDR), если гомологичный участок ДНК доступен, или с помощью негомологичного соединения концов (NHEJ). NHEJ-это подверженный ошибкам процесс, который может быстро лигировать сломанные концы, и генерировать небольшие вставки и делеции (индели) в целевых сайтах, что часто приводит к нарушению или отмене функции целевых генов. Альтернативно, DSB также может быть восстановлен с помощью гомологичной напрвленной репарации HDR, которая способна рекомбинировать экзогенную ДНК, и может быть использована для введения трансгенов или точного редактирования генома [Hryhorowicz *et al.,* 2016].

В 2016 году Josef Altenbuchner впервые сконструировал плазмиды для направленного редактирования генома *B. subtilis* – pJOE8999.1, он представляет собой челночный вектор, содержащий ориджин репликации в клетках *E. coli* и чувствительный к температуре ориджин для репликации в *B. subtilis.* Для демонстрации функциональности системы CRISPR-Cas9 у *B. subtilis* в геном были введены две хромосомные делеции: большая делеция 25.1 кб, содержащая ген *amyE*, и более короткая делеция с 4.1 кб, содержащая гены биосинтеза пульхерримина. Затем, на основе вектора pJOE 8999.1 были получены плазмиды pJOE9012.1, pJOE9150.2, pJOE9198.1 и pJOE9202.1, которые были использованы для трансформации генома *B. subtilis* и показали свою эффективность для удаления генов альфа амилазы и пульхерримина. Таким образом, была разработана эффективная система для редактирования генома *B. subtilis* [Altenbuchner, 2016].

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### 2.1 Штаммы бактерий

Штаммы использованные в работе, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы бактерий, использованные в работе

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Название штамма** | **Генотип** | **Источник** |
| *Bacillus subtilis* 168 | ∆*trpC2* | Музей кафедры Микробиологии, КФУ |
| *Bacillus subtilis* 27-39 | *∆SPβ, ∆PBSX, ∆proФ1, ∆proФ3, ∆proФ2 , ∆proФ5, ∆proФ6, ∆CmR , ∆bpr, ∆spoIIGA, ∆ sig, ∆yqc, ∆fli, ∆wprA, ∆ger, ∆nprB, ∆vpr, ∆nprE, ∆epr ∆ yvcA, ∆ yyd, ∆ yyzF, ∆yyc, ∆ rap, ∆ phr, ∆ mpr, ∆ ybfJ**∆ kinD, ∆ mhqR, ∆ mot, ∆ ymz, ∆ pks, ∆acpK, ∆ yma, ∆ aprX, ∆ ebr, ∆ yul, ∆yuxG, ∆ tlp, ∆ mcp, ∆ tgl, ∆ yuz, ∆ yug, ∆mstX, ∆ yef, ∆ yee, ∆ yez, ∆ yes, ∆ cot, ∆rhgT, ∆ yet, ∆ lpl, ∆ yhf, ∆ apr, ∆ssp, ∆yfj, ∆ mal, ∆ yfi, ∆ cat, ∆ padR, ∆ est, ∆com, ∆yuaB, ∆ ywr, ∆ cot, ∆ ywq, ∆ yvzF, ∆ ger, ∆yoj, ∆ yoy, ∆ ger, ∆ yod* |
| *Bacillus subtilis* 27-24 | *∆SPβ, ∆PBSX, ∆proФ1, ∆proФ3, ∆proФ2, ∆proФ5, ∆proФ6, ∆CmR , ∆bpr, ∆spoIIGA, ∆ sig, ∆yqc, ∆fli, ∆wprA, ∆ger, ∆nprB, ∆vpr, ∆nprE, ∆epr ∆ yvcA* |

### 2.2 Питательные среды и культивирование

Культивирование штаммов проводили на среде LB (Луриа-Бертани) [Sambrook *et al*., 2001] (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH=8.5. Агаризованная среда LB включала дополнительно 2% агар (LA).

Среды стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин. Для приготовления сред использовали дистиллированную воду.

### 2.3 Изучение динамики роста

Динамику роста изучали на среде LB в течение 72 часов. Культивирование проводили на термостатируемом вибростенде (Inkubations-Schüttelschrank BS4, Braun, Германия) с интенсивностью качания 180 об/мин при температуре +37ºС. Соотношение объёмов питательной среды и колбы составляло 1:4. В качестве посевного материала использовали 12-часовой инокулят. Рост бактерий отслеживали по изменению оптической плотности культуры на спектрофотометре xMark (BioRad, США) при длине волны излучения λ=600 нм. Количество биомассы выражали в единицах оптической плотности (ОП).

### 2.4 Определение фосфатазной активности

Для определения фосфотазной активности смешали 0.1M NaAc буфера (pH 4.5) с 0.19 г pNPP, внесли в эппендорф (Eppendorf, Германия) по 200мкл полученного раствора, инкубировали 10 мин при температуре +37ºС. Далее вносили по 30 мкл образца (использовали пробы, отобранные при изучении динамики роста с интервалом в 6 ч) и инкубировали 30 мин при температуре +37ºС. Останавливали реакцию внесением 1мл 1M NaOH. В качестве контроля использовали 200 мкл смеси 0.1M NaAc буфера, pH4.5 с 0.19г pNPP, инкубировали 40 минут при температуре +37ºС, далее вносили 1мл 1M NaOH и 30мкл образца.

Оптическую плотность определяли на спектрофотометре xMark (BioRad, США) при длине волны излучения λ=405 нм.

Фосфатазную активность определяли по формуле u/ml=Δabs/time×1/d×E×Vtotal/Venz, где Δabs- разность ОП между опытом и контролем; time- время инкубации после внесения образца, мин; d- диаметр кюветы, см; E=18.2 см2/µmol; Vtotal- общий объем, мкл; Venz- объем образца.

 2.5 Определение протеолитической активности по гидролизу азоказеина [Demidyuk *et al*., 2004]

К 100 мкл субстрата (раствор азоказеина в концентрации 10 мг/мл в 0.05 М Трис-HCl буфере рН 7.3 с 5 мМ Са2+) добавляли 50 мкл образца и инкубировали при 37ºС в течение 1 ч. В качестве контроля использовали раствор 100 мкл субстрата, к которому было добавлено 200 мкл 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). После инкубации в опытный образец добавили 200 мкл ТХУ для осаждения, а в контроль 50 мкл фермента и выдерживали всё в ледяной бане 10 минут. Далее пробы центрифугировали 7 мин при 13000 об/мин. После чего в планшет отбирали 250 мкл супернатанта и добавляли 50 мкл 4Н NaOH. Измерение проводили на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

### 2.6 Статистическая обработка результатов

Обработку результатов активности проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и Origin. Применяли критерий Краскела-Уоллиса, тест Стьюдента,

# **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

## 3.1 Изучение динамики роста штаммов *B. subtilis* с редуцированными геномами и штамма *B. subtilis* 168

Грамположительная бактерия *B. subtilis* широко известна своей способностью продуцировать и секретировать большое количество промышленно значимых белков [Cui *et al.,* 2018], поэтому оптимизация штаммов бацилл является одной из важных задач современной биологии. Геномная инженерия позволяет устранить «нежелательные» свойства, такие как выработка поверхностно-активных веществ, перенаправление клеточного обмена веществ в сторону производства гетерологичных белков и витаминов [Suarez *et al*., 2018]. В настоящей работе в качестве потенциальных штаммов для получения рекомбинантных белков были протестированы редуцированные штаммы *B. subtilis* – 27-24 и 27-39, которые имеют делеции по генам образования биопленок, генам споруляции, внеклеточных протеаз , а также несут кассету *com* для эффективной трансформации. В качестве контрольного штамма использовали *B. subtilis* 168.

Изучение динамики роста проводили в течение 72 часов на питательной среде LB (Рисунок 1). Полученные данные показали, что пик оптической плотности культуры *B. subtilis* 168 приходится на 15 час роста, после чего культура переходит в стационарную фазу (18-48 час) и затем фазу отмирания культуры (Рисунок 1А). Полученные результаты согласуются с работой Manabe и коллег [Manabe *et al.,* 2011], где исследовали динамику роста штамма *B. subtilis* 168 в течение 72 часов. Экспоненциальная фаза роста культуры в их работе приходилась примерно на 3-18 час, стационарная фаза 18-40 часы, затем следовала фаза отмирания.

Также на графике видно, что максимальной оптической плотности штамм *B. subtilis* 27-24достигал к 15 часу роста, после короткой стационарной фазы (18-21 час) культура переходила в фазу отмирания (Рисунок 1Б). Штамм *B. subtilis* 27-39 достигал максимума оптической плотности к 18 часу, затем до 48 часа продолжалась стационарная фаза с последующим отмиранием культуры (Рисунок 1В).

В уже указанной работе Manabe и коллег [Manabe *et al.,* 2011], геномно-редуцированный штамм MGB874 вел себя схожим образом, экспоненциальная фаза роста культуры в их работе приходилась примерно на 3-18 час, что согласуется с нашими данными по *B. subtilis* 27-24 и *B. subtilis* 27-39, но стационарная фаза роста MGB874 длилась с 18 по 40 час, а затем следовала несколько ускоренная фаза отмирания, что несколько не соотносится с нашими данными. Такие различия могут объясняться различиями хромосомных делеций в экспериментальных штаммах.



Рисунок 1– График динамики роста штамма *B. subtilis* 168 и штаммов *B. subtilis* с редуцированными геномами*.* A– динамика роста *B. subtilis* 168; Б–динамика роста *B. subtilis* 27-24; В– динамика роста *B. subtilis* 27-39.
Согласно критерию Краскела-Уоллиса, статистически значимые отличия существуют между А и Б при p< 0.01; между А и В при p< 0.001; между Б и В при p< 0.001.

## 3.2 Определение динамики накопления протеолитической активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis*

Протеолитическую активность оценивали по гидролизу азоказеина (Рисунок 2). В штамме *B. Subtilis* 168 максимальная протеолитическая активность наблюдалась на 57 час роста культуры и составила 0.8127 ед/мл (Рисунок 2А). В редуцированном штамме *B. subtilis* 27-24 максимальная активность наблюдалась на 45 час и составила 0.3 ед/мл (Рисунок 2Б). В штамме *B. subtilis* 27-39 практически отсутствовала протеолитическая активность (Рисунок 2В). Полученные данные можно объяснить количеством делеций генов протеаз в редуцированных штаммах. Так, в штамме *B. subtilis* 27-24 удалены гены *∆nprB, ∆vpr, ∆nprE, ∆epr,* *∆bpr*, а в штамме *B. subtilis* 27-39 - *∆bpr, ∆wprA, ∆nprB, ∆vpr, ∆nprE, ∆epr, ∆ mpr, ∆ apr.*

Таким образом, по результатам исследования протеолитическая активность исследуемых редуцированных штаммов 27-24 и 27-39 ниже, чем контрольного 168.



Рисунок 2 – Динамика роста и протеолитическая активность штаммов *B. subtilis.* A– динамика роста и протеолитическая активность контрольного штамма *B. subtilis* 168, ед/мл; Б– динамика роста и протеолитическая активность *B. subtilis* 27-24, ед/мл; В– динамика роста и протеолитическая активность *B. subtilis* 27-39, ед/мл. Согласно тесту стьюдента, статистически значимые отличия существуют между А и Б при p< 0.01; между А и В при p< 0.001; между Б и В при p< 0.001.

Однако, для более эффективного использования штамма в качестве продуцента гетрологичных белков, удаление только протеаз недостаточно. В работе Suárez *с соавт*. (2019) тестировали беспротеазные и редуцированные штаммы *B. subtilis* в качестве продуцентов репортерных белков *Staphylococcus aureus* (CHIPS, SCIN, IsaA, Nuc). Было показано, что редуцированный штамм B. subtilis PG10 (делетировано 36% генома) был наиболее эффективным продуцентом, при этом авторы статьи подчеркивают, что сложно определить конкретные мутации и их вклад, который привел к улучшению продукции белка штаммом PG10. Тем не менее, данное исследование подчеркивает преимущества оптимизации генома как подхода к усилению и увеличению ценных свойств Bacillus [Suárez *et al.,* 2019].

## 3.3 Определение динамики накопления фосфатазной активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis*

*B. subtilis* реагирует на фосфатное голодание, индуцируя транскрипцию гена Pho регулона. Этот ответ модулируется регуляторной сетью, содержащей три двухкомпонентные системы передачи сигнала, две из которых (ResDE и PhoPR) участвуют в активации системы Pho, а одна (Spo0A) подавляет реакцию Pho [Liu *et al.,* 1997]. Гены Pho регулона *B. subtilis* включают структурные гены трех секретируемых щелочных фосфатаз: *phoA* (кодирует фосфатазу A), которая экспрессируется главным образом при голодании по фосфатам; *phoB* (кодируюет фосфатазу B), которая экспрессируется тандемными промоторами либо во время фосфатного голодания, либо во время II стадии развития спор и *phoD* (кодирует фосфатазу D), которая экспрессируется во время фосфатного голодания и кодирует фермент с активностью щелочной фосфодиэстеразы, а также активностью фосфатазы [Liu *et al.,* 1997].

В штаммах *B. subtilis* 27-24 и 27-39 удален ген фосфатазы B (∆*phoB*), поэтому представляло интерес изучить фосфатазную активность в редуцированных штаммах и штамме *B. subtilis* 168 (рисунок 3). Максимальную фосфатазную активность штамма *B. subtilis* 168 наблюдали на 66 час роста, и она составила 3.6 ед/мкл. Максимальная активность штамма *B. subtilis* 27-24 и 27-39 составила 3.25 ед/мкл на 72 час роста и 3.53 ед/мкл на 36 час роста, соответственно.

  Рисунок 3 – Фосфатазная активность и динамика роста штаммов *B. subtilis,* ед/мкл. A – фосфатазная активность и динамика роста контрольного штамма *B. subtilis* 168; Б – фосфатазная активность и динамика роста *B. subtilis* 27-24; В – фосфатазная активность и динамика роста *B. subtilis* 27-39. Согласно тесту стьюдента, при p < 0.05, статистически значимых отличий между штаммами не обнаружено.

Согласно полученным данным фосфатазная активность варьирует у различных штаммов. Для нативного штамма она достигает максимального значения и сохраняется на протяжении стационарной фазы. У штаммов с редуцированными геномами уровень фосфатазной активности снижается в среднем на 50%, достигая максимального значения у штамма 27-39 в середине стационарной фаза ( 36-42 час), и в стадии отмирания клеток у штамма 27-24, что может быть связано с лизисом клеток. Полученные результаты могут быть связаны с разносторонним вкладом фосфатаз в регуляторную сеть у штаммов с разными наборами генов.

# **ВЫВОДЫ**

1. Установлено, что штамм B. subtilis 168 и штаммы B. subtilis с редуцированными геномами 27-24 и 27-39 достигают максимальной оптической плотности к 15-18 часу. Стационарная фаза роста штамма B. subtilis 27-24 значительно короче, чем у B. subtilis 168.
2. Максимальная протеолитическая активность *B. subtilis* 168 наблюдалась на 57 час роста культуры и составила 0.81 ед/мл. Для штамма *B. subtilis* 27-24 максимальная активность наблюдалась в стационарной фазе роста на 45 час и составила 0.3 ед/мл. В штамме *B. subtilis* 27-39 протеолитическая активность оставалась на уровне менее 0.5 ед/мл на протяжении всего роста.
3. Максимальная фосфатазная активность в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 168 сохранялась на протяжении стационарной фазы роста, тогда как максимальная активность фосфатазы в культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 27-24 наблюдалась на стадии отмирания (3.3 ед/мкл), для штамма 27-39 на середину стационарной фазы с 36 по 42 час роста (3.5 ед/мкл).

# **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

# **Тагиева, С. А.** Преимущества применения бактериоцинных препаратов по-сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных (обзор) [Текст] / С. А. Тагиева, Ф. Х. Гахраманова // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 4. – С.122-128.

1. **Altenbuchner, J.** Editing of the Bacillus subtilis Genome by the CRISPR-Cas9 System. [Text] / J. Altenbuchner // Appl Environ Microbiol. – 2016.– V.82. – No.17. – P.5421-5427. doi: 10.1128/AEM.01453-16. PMID: 27342565; PMCID: PMC4988203.
2. **Ara, K.** Bacillus minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. [Text] /K. Ara, K. Ozaki, K. Nakamura, K. Yamane, J. Sekiguchi, N. Ogasawara // Biotechnol Appl Biochem.– 2007 –V.3. – P.169-178. doi: 10.1042/BA20060111. PMID: 17115975.
3. **Barrangou, R.** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. [Text] / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath // Science.– 2007 – V.315. – No.17.– P.1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140. PMID: 17379808.
4. **Cong, L.** Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. [Text] / L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang // Science. – 2013 – V.339– No.6121. – P.819-823. doi: 10.1126/science.1231143. PMID: 23287718; PMCID: PMC3795411.
5. **Charpentier, E.** Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. [Text] / E. Charpentier, L. A. Marraffini // Curr Opin Microbiol.– 2014 – V.19. – P.114-119. doi: 10.1016/j.mib.2014.07.001. Epub 2014 PMID: 25048165; PMCID: PMC4155128.
6. **Copeland, J. C.** The Bacillus subtilis genome: replication – order and map-position discrepanciesevidence for a second origin [Text] / J. C. Copeland// Genetics – 1974 – V.78 – P.1015-1034.
7. **Cui, W.** Exploitation of Bacillus subtilis as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. [Text] / W. Cui, L. Han, F. Suo, Z. Liu, L. Zhou, Z. Zhou //World Journal of Microbiology and Biotechnology – 2018 – V.34. – No.10. – P.1016-1035. doi:10.1007/s11274-018-2531-7
8. **Deltcheva, E.** CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. [Text] / E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, E. Charpentier // Nature – 2011 – V.471. – No.7340. – P.602-607. doi: 10.1038/nature09886. PMID: 21455174; PMCID: PMC3070239.
9. **Demidyuk, I.V.** Protein [Text] / I.V. Demidyuk, D.V. Romanova, E.A. Nosovskaya, G.G. Chestukhina, I.P. Kuranova, S.V. Kostrov // Protein Eng. – 2004 – V.17. – P.411–416.
10. **Garneau, J. E.** The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. [Text] / J. E. Garneau, M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadán, S. Moineau // Nature – 2010 – V.468. – No.7320. – P.67-71. doi: 10.1038/nature09523. PMID: 21048762.
11. **Gasiunas, G.** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. [Text] / G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012 – V.109. – No.39. – P.2579-2586. doi: 10.1073/pnas.1208507109. PMID: 22949671; PMCID: PMC3465414.
12. **Harms, D. W.** Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. [Text] / D. W. Harms, R. M. Quadros, D. Seruggia, M. Ohtsuka, G. Takahashi, L. Montoliu, C. B. Gurumurthy// Curr Protoc Hum Genet. – 2014 – V.83. – P.1-27. doi: 10.1002/0471142905.hg1507s83. PMID: 25271839; PMCID: PMC4519007.
13. **Hryhorowicz, M.** CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. [Text] / M. Hryhorowicz, D. Lipiński, J. Zeyland, R. Słomski // Arch Immunol Ther Exp (Warsz) – 2017 – V.65. – No.3. – P.233-240. doi: 10.1007/s00005-016-0427-5. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27699445; PMCID: PMC5434172.
14. **Hulett, F. M.** The signal-transduction network for Pho regulation in Bacillus subtilis. [Text] / F. M.Hulett/ Molecular Microbiology –1996– V.19. – No.5. – P.933–939. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.421953.x
15. **Ishino, I.** Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. [Text] / I. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata // J Bacteriol – 1987 – V.169. – No.12. – P.5429-5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987. PMID: 3316184; PMCID: PMC213968.
16. **Jinek, M.** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. [Text] / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier // Science. – 2012 – V.337. – No.6096. – P.816-821. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249; PMCID: PMC6286148.
17. **Khatri, I.** Complete Genomes of Bacillus coagulans S-lac and Bacillus subtilis [Text] / I. Khatri, S. Sharma, T. N. Ramya, S. Subramanian // TO-A JPC, Two Phylogenetically Distinct Probiotics. PLoS One – 2016 – V.11. doi: 10.1371/journal.pone.0156745. PMID: 27258038; PMCID: PMC4892684.
18. **Kunst, F.** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. [Text] / F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin, *et al.* // Nature – 1997 – V.390. – No.6657. – P.249-256. doi: 10.1038/36786. PMID: 9384377.
19. **Liu, W.**, Bacillus subtilis PhoP binds to the phoB tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. [Text] / W. Liu, F. M. Hulett // Journal of Bacteriology – 1997 – V.179. – No.20. – P.6302–6310. doi:10.1128/jb.179.20.6302-6310.1997
20. **Makarova, K. S.** Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. [Text] / K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost, E. V. Koonin // Nat Rev Microbiol – 2011 – V.9. – No.6. – P.467-77. doi: 10.1038/nrmicro2577. Epub 2011 May 9. PMID: 21552286; PMCID: PMC3380444.
21. **Manabe, K.** Combined effect of improved cell yield and increased specific productivity enhances recombinant enzyme production in genome-reduced Bacillus subtilis strain [Text] /K. Manabe, Y. Kageyama, T. Morimoto, T. Ozawa, K. Sawada, K. Endo, M. Tohata, K. Ara, K. Ozaki, N. Ogasawara// MGB874. Appl Environ Microbiol – 2011 –V.77. – No.23. – P.8370-8381. doi: 10.1128/AEM.06136-11. Epub 2011 Sep 30. PMID: 21965396; PMCID: PMC3233064.
22. **Marraffini, L. A.** CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. [Text] / L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer // Science – 2008 – V.322. – No.5909. – P.1843-1845. doi: 10.1126/science.1165771. PMID: 19095942; PMCID: PMC2695655.
23. **Olanrewaju, O.S.** Genome Mining of Three Plant Growth-Promoting Bacillus Species from Maize Rhizosphere. [Text] / O. S. Olanrewaju, M. S. Ayilara, A. S. Ayangbenro, O. O. Babalolacorresponding // Appl Biochem Biotechnol – 2021 –V.193. – No.12. – P.3949-3969. doi: 10.1007/s12010-021-03660-3. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34529229; PMCID: PMC8610958.
24. **Pougach, K.** Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in Escherichia coli. [Text] / K. Pougach, E. Semenova, E. Bogdanova, K. A. Datsenko, M. Djordjevic, B. L. Wanner, K. Severinov // Mol Microbiol – 2010 – V.77. – No.6. – P.1367-1379. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07265.x. PMID: 20624226; PMCID: PMC2939963.
25. **Reuß, D. R.** Large-scale reduction of the Bacillus subtilis genome: consequences for the transcriptional network, resource allocation, and metabolism. [Text] / D. R. Reuß, J. Altenbuchner, U. Mäder, H. Rath, T. Ischebeck, P. K. Sappa, A. Thürmer, C. Guérin, P. Nicolas, L. Steil, B. Zhu, I. Feussner, S. Klumpp, R. Daniel, F. M. Commichau, U. Völker, J. Stülke // Genome Res – 2017 – V.27. – No.2. – P.289-299. doi: 10.1101/gr.215293.116. Epub 2016 Dec 13. PMID: 27965289; PMCID: PMC5287234.
26. **Rey, M. W**. Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species. [Text] / M. W. Rey, P. Ramaiya, B. A. Nelson, S. D. Brody-Karpin, E. J. Zaretsky, M. Tang, A. Lopez de Leon, H. Xiang, V. Gusti, I. G. Clausen, P. B. Olsen, M. D. Rasmussen, J. T. Andersen, P. L. Jørgensen, T. S. Larsen, A. Sorokin, A. Bolotin, A. Lapidus, N. Galleron, S. D. Ehrlich, R. M. Berka // Genome Biol – 2004 – V.5. – No.10. – R77. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r77. PMID: 15461803; PMCID: PMC545597.
27. **Sambrook, J.** Molecular Cloning - a laboratory manual [Text] / J. Sambrook, D.W. Russell // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold. - 2001. – Р.1-2100.
28. **Sorek, R.** CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. [Text] / R. Sorek, V. Kunin, P. Hugenholtz // Nat Rev Microbiol – 2008 – V.6. – No.3. – P.181-186. doi: 10.1038/nrmicro1793. PMID: 18157154.
29. **Su, Y**. Bacillus subtilis: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. [Text] / Y. Su, C. Liu, H. Fang, D. Zhang // Microb Cell Fact – 2020 – V.19. – No.1. – P.173. doi: 10.1186/s12934-020-01436-8. PMID: 32883293; PMCID: PMC7650271.
30. **Suárez, A. R.** Less Is More: Toward a Genome-Reduced Bacillus Cell Factory for "Difficult Proteins". [Text] / R. A. Suárez, J. Stülke, J. M. van Dijl // ACS Synth Biol. – 2019 – V.8. – No.1. – P.99-108. doi: 10.1021/acssynbio.8b00342. Epub 2018 Dec 27. PMID: 30540431; PMCID: PMC6343112.
31. **Tu, Z.** High Resolution Analysis of Proteome Dynamics during Bacillus subtilis Sporulation. [Text] / Z. Tu, H. L. Dekker, W. Roseboom, B. N. Swarge, P. Setlow, S. Brul, G. Kramer // Int J Mol Sci. – 2021 – V.22. – No.17. – P.9345. doi: 10.3390/ijms22179345. PMID: 34502250; PMCID: PMC8431406.
32. **Wiedenheft, B.** RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. [Text] / B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna // Nature. – 2012 – V.482. – P.331-338. doi: 10.1038/nature10886. PMID: 22337052.
33. **Wolff, S.** Towards the entire proteome of the model bacterium Bacillus subtilis by gel-based and gel-free approaches. [Text] / S. Wolff, H. Antelmann, D. Albrecht, D. Becher, J. Bernhardt, S. Bron, K. Büttner, J. M. van Dijl, C. Eymann, A. Otto, L. T. Tam, M. Hecker // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2007 – V.849. – P.129-140. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.029. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055787.
34. **Zheng, L.** Bacillus subtilis Spore Inner Membrane Proteome. [Text] / W. Abhyankar, N. Ouwerling, H. L. Dekker, H. van Veen, N. N. van der Wel, W. Roseboom, L. J. de Koning, S. Brul, C. G. de Koster // J Proteome Res. – 2016 – V.15. – No.2. – P.585-594. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00976. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26731423.