

# Sekwencjonowanie pełnego genomu bakterii z rodzaju *Achromobacter* wyizolowanej z ryzosfery w uprawie kukurydzy

**Anna Marzec-Grządziel<sup>1</sup>, Anna Gałązka<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, [agrządziel@iung.pulawy.pl](mailto:agrządziel@iung.pulawy.pl)

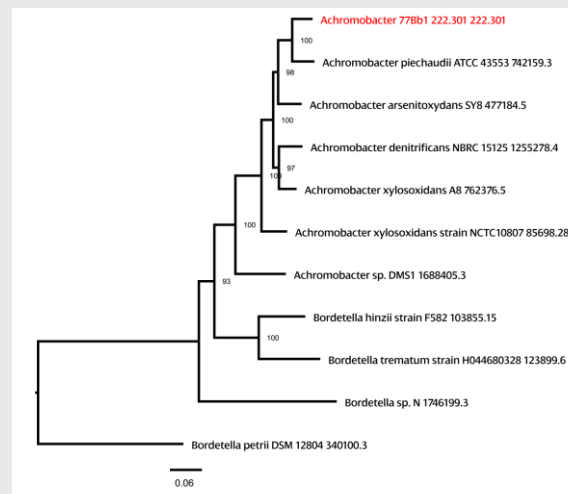
Badania realizowano w ramach projektu prac przedwdrożeniowych Inkubator Innowacyjności 4.0; nr 1/ININ 4.0/IUNG-PIB/2021

Izolacja nowych szczepów bakteryjnych z naturalnego środowiska może doprowadzić do wykrycia mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Charakterystyka takich mikroorganizmów może być prowadzona klasycznymi metodami mikrobiologicznymi oraz metodami biologii molekularnej. Klasyczne metody mikrobiologiczne obejmują hodowlę badanych mikroorganizmów na podłożach selektywnych lub w odpowiednio dobranych warunkach inkubacji. Nowoczesną odmianą takich metod są analizy wykorzystujące techniki mikromacierzy, pozwalające jednocześnie na określenie wzrostu badanego szczepu w kilkunastu – kilkudziesięciu różnych warunkach (różne źródła azotu, węgla, pH, zasolenie, substancje bakteriostatyczne/ bakteriobójcze).

Metody biologii molekularnej wykorzystywane są do charakterystyki genetycznej badanych izolatów. Obecnie badania nad nowo wykrytymi mikroorganizmami opierają się w dużej mierze na technikach sekwencjonowania. Techniki klasyczne typu sekwencjonowanie Sanger pozwala na analizę filogenetyczną badanego szczepu, przypisanie go do rodzaju. Ogromne możliwości daje sekwencjonowanie pełnego genomu, które może dostarczyć wielu informacji na temat pochodzenia szczepu, jego przynależności taksonomicznej czy charakterystyki fenotypowej. Połączenie analiz genomu z technikami mikromacierzy pozwala na dogłębną charakterystykę analizowanej bakterii.

Głównym celem pracy była charakterystyka genetyczna bakterii wyizolowanej z endosfery korzeniowej kukurydzy. Analizowana bakteria pochodziła z banku mikroorganizmów Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB. Analiza sekwencjonowania Sanger pozwoliła na przypisanie bakterii do rodzaju *Achromobacter*. W celu sekwencjonowania całego genomu wykonano: hodowlę płynną w podłożu LB; izolacja DNA komercyjnym zestawem do izolacji DNA z hodowli bakteryjnych; określenie stężenia oraz jakości uzyskanego izolatu DNA. Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie zewnętrznej (Eurofins Genomics, Germany). Sekwencjonowanie prowadzono w technologii Illumina NovaSeq 6000, Paired end Read, 2 x 150 bp. Uzyskano 3 698 490 000 nt w 12 328 300 odczytach.

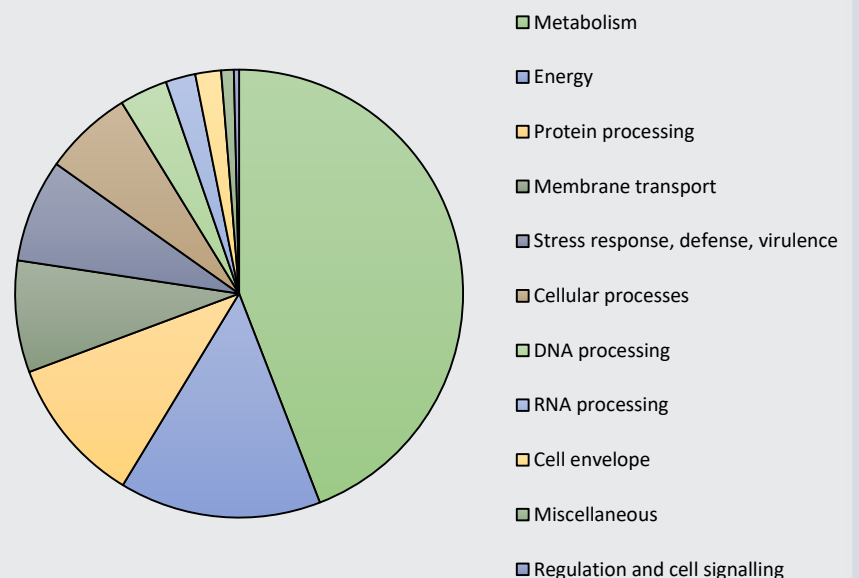
Analiza bioinformatyczna uzyskanego genomu bakteryjnego pozwoliła na określenie 6026 regionów kodujących. Sekwencja genu 16S rRNA, kodująca małą podjednostkę rybosomalną pozwoliła na przypisanie analizowanego genomu do rodzaju *Achromobacter* (Ryc.2).



Ryc.2 Drzewo filogenetyczne wykonane na podstawie sekwencji 16S rRNA

W genomie analizowanej bakterii znaleziono 56 genów kodujących czynniki oporności na antybiotyki, 10 genów kodujących czynniki wirulencji, oraz 7 genów odpowiedzialnych za syntezę białek będących elementami docelowymi dla leków (Ryc.1).

Wykazano obecność genów kodujących 4855 białek z przypisanymi funkcjami, oraz 1171 hipotetycznych białek. Sklasyfikowane białka tworzyły 301 subsystemów, biorących udział w przebiegu 136 ścieżek metabolicznych. Najwięcej genów brało udział w szlakach metabolicznych, najmniej w procesach regulacji i przekazywania sygnałów komórkowych (Ryc.3).



Ryc.3 Liczba genów zaangażowanych w analizowane procesy metaboliczne

## ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

### LINUX:

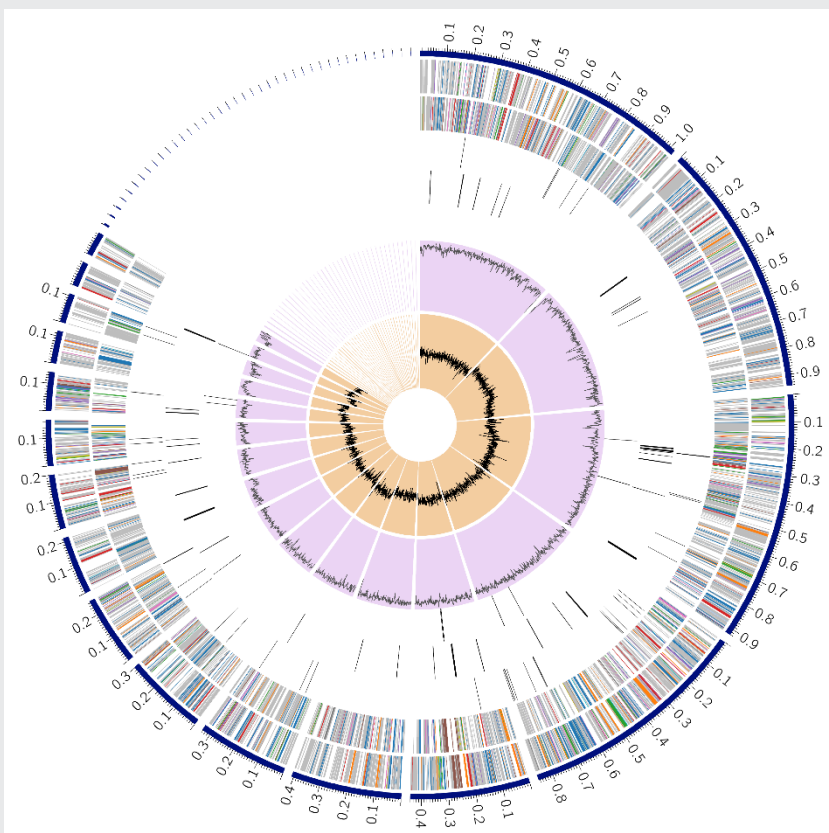
- Trim Galore – usunięcie sekwencji adapterów
- Assembly Unicycler – uzyskanie k-mer(ów) oraz kontigów

Uzyskano 57 kontigów, N50: 855 260, długość: 6 651 435; najdłuższy kontig: 1 018 060 (Ryc.1)

- GlimmerHMM, Quast – wygenerowanie listy potencjalnych genów
- BlastN, MetaQuast – przyrównanie do genomu referencyjnego

### PATRIC 3.6.12:

- Wygenerowanie listy potencjalnych genów CDS (6026), tRNA (55), rRNA (4), białek z przypisanymi funkcjami (4855) oraz potencjalnych białek (1171), opracowanie graficzne



Ryc.1 Wykres typu circos obrazujący liczbę oraz długość analizowanych kontigów, CDS na nici forward, CDS na nici reverse, geny RNA, CDS przypisane do genów oporności na antybiotyki, CDS przypisane do genów wirulencji, zawartość GC, stosunek G/C (w kolejności od zewnątrz do środka)