

1. Могилевская обл., Осиповичский р-н, окр. о. п. Гряды (300 м к ССВ), полоса отчуждения ж. д. на участке Гряды – Деревцы. Короткотравная оглеенная луговина, залитая водой. 21.06.2001. Т. В. № 00431.

***J. inflexus* L.** Редкий вид, встречающийся преимущественно в западных районах Беларуси.

1. Минская обл., Мядельский р-н, кур. пос. Нарочь, между Купой и новым корпусом биостанции БГУ. Пляж по берегу оз. Нарочь. 11.07.2002. Т. В. № 01410.

2. Там же, окр. д. Волчино (0,7 км к С). В мелиоративном канале. 16.07.2002. Т. В. № 01517.

1. Джус М.А., Тихомиров Вал. Н. // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. 2003. № 2. С. 26.

2. Определитель высших растений Беларуси / Под ред. В.И. Парфенова. Мн., 1999.

3. Чырвоная Кніга Рэспублікі Беларусь: Рэдкія і тыя, што знаходзяцца пад пагрозай знікнення, віды жывёл і раслін. Мн., 1993.

4. Джус М.А., Сауткина Т.А., Тихомиров Вал. Н. и др. // Бот. журн. 2001. Т. 86. № 9. С. 128.

Поступила в редакцию 28.04.2003.

Валерий Николаевич Тихомиров – кандидат биологических наук, ассистент кафедры ботаники.

УДК 575:579.852

М.А. ТИТОК, А.В. ЛАГОДИЧ, Ю.В. СЕЛЕЗНЕВА

ПЛАЗМИДНЫЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ

It is shown that 20 % of the investigated strains of *B. subtilis* isolated from various natural sources in territory of Belarus contain plasmids of various sizes. Most widespread are extrachromosomal genetic elements more 90 kb in size.

Повсеместно распространенные бактерии *Bacillus subtilis*, способные утилизировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, продуцировать различные ферменты, антибиотики, а также стимуляторы роста растений [1–3], могут рассматриваться в качестве перспективных объектов биотехнологии. Кроме того, они являются наиболее изученными грамположительными микроорганизмами [4], что создает возможности направленной регуляции и экспрессии их генетического аппарата. Одним из подходов при решении ряда фундаментальных и прикладных задач является использование внехромосомных генетических элементов, которые могут содержать гены общего бактериального метаболизма, детерминировать устойчивость к антибиотикам, определять синтез токсинов, обеспечивать деградацию органических соединений и др. [5]. Плазмиды могут служить удобными объектами при изучении молекулярных механизмов репликации, транскрипции, трансляции [6], картировании геномов, транспозонном мутагенезе, молекулярном клонировании [7–9], а также для создания эффективных векторных систем [10]. Все это аргументирует целесообразность поиска новых плазмид среди природных штаммов микроорганизмов, поскольку именно в естественных условиях возникают новые комбинации генов, детерминирующие биологически значимые признаки.

Целью данной статьи являлась характеристика плазмидного состава штаммов *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников.

Материал и методика

В работе использовались 287 штаммов грамположительных бактерий, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, а также типовой штамм *B. subtilis* 168 *trpC2* из коллекции лаборатории

S.D. Ehrlich (INRA, Франция). Специфические фаги *B. subtilis* AR1, AR3, AR9, 0105, SP01 предоставлены А.А. Прозоровым (ИОГен РАН, Москва).

Бактерии выращивались в бульоне LB и на агаре LB [11]. В работе использовались коммерческие препараты антибиотиков: ампициллина (Ap) в конечной концентрации 5, 10, 20 и 50 мкг/мл, хлорамфеникола (Cm), тетрациклин гидрохлорида (Tc), триметоприма (Tr), стрептомицин сульфата (Sm), канамицина (Km), рифампицина (Rif), эритромицина (Ery) в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл.

Выделение и идентификацию грамположительных спорообразующих бактерий осуществляли общепринятыми методами [12].

Чувствительность к специфическим фагам *B. subtilis* AR1, AR3, AR9, 0105, SP01 проверялась путем нанесения фаголизата в концентрации 10^9 фаг/мл на поверхность 0,7 % агаризованной среды LB, в которую предварительно вносилось 0,1 мл бактериальной культуры, выращенной до стационарной фазы. О чувствительности клеток к бактериофагам судили по наличию на газоне бактерий зон лизиса.

Обработка бактерий с целью элиминации плазмид осуществлялась трипафлавином в концентрациях 1, 5, 10 мкг/мл [11].

Компетентную культуру клеток с последующей трансформацией бактерий *B. subtilis* получали по методу, описанному в работе [13].

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [14], тотальную ДНК – с использованием метода, описанного в работе [15].

Электрофоретический анализ плазмидной ДНК проводили по методике, изложенной в [16].

Рестрикцию плазмидной ДНК осуществляли согласно рекомендациям фирм – изготовителей ферментов (Boehringer Mannheim и Biolabs New Haven). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали λ BstEI (производства Biolabs New Haven).

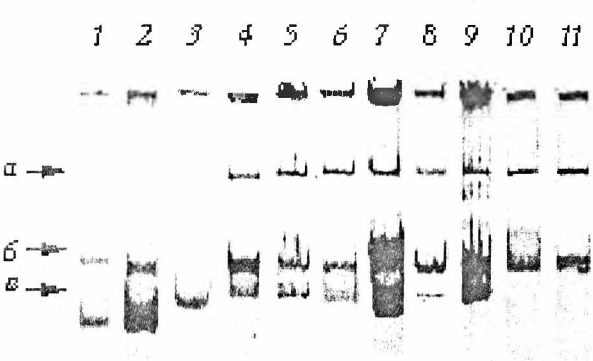
Результаты и их обсуждение

Для обнаружения бактерий *B. subtilis* из 87 образцов почвы и воды, собранных в различных регионах Беларуси, были выделены 287 штаммов грамположительных бактерий. Проверка этих бактерий на чувствительность к видоспецифическим бактериофагам AR1, AR3, AR9, 0105, SP01 показала, что 55 штаммов являются представителями *B. subtilis*, обладающими чувствительностью к одному либо к нескольким бактериофагам одновременно.

Бактерии 55 штаммов, идентифицированных как *B. subtilis*, были проверены на наличие плазмидной ДНК методом щелочного лизиса. В результате в клетках 11 штаммов были обнаружены плазмиды различной молекулярной массы, при этом клетки 6 штаммов содержали по две плазмиды (штаммы N1, 2, 4, 8, 15, 57), а 5 штаммов – по одному внехромосомному элементу (штаммы 1, 19, 72, 21Z, 4K31) (рисунок). Для более точного определения размеров выявленных внехромосомных генетических элементов проводился рестрикционный анализ плазмидной ДНК. На основании электрофоретической подвижности фрагментов, возникающих при обработке рестриктазами EcoRI, PstI, Styl, HindIII, были определены размеры мелких плазмид (табл. 1). Размер крупных плазмид был установлен ранее посредством рестрикции одной из них (pBs19) ферментами EcoRI и ClaI и составил 96,7 kb [17]. Таким образом, в результате этих исследований было установлено, что у клеток 6 штаммов с двумя плазмидами одна из них представлена молекулой ДНК размером более 90 kb, вторая – размером 8 kb (штаммы N1, 2, 4, 8, 15, 57). Бактерии 5 штаммов содержали по одной плазмиде размерами более 90 kb (штаммы 19, 72), 6,3 kb (штаммы 21Z, 4K31) и 8 kb (штамм 1) соответственно (табл. 2).

Для уточнения таксономической принадлежности изолированных плазмидсодержащих бактерий был использован трансформационный тест. С этой

целью тотальной ДНК, выделенной из плазмидсодержащих клеток, трансформировали бактерии типового штамма *B. subtilis* 168. Селекцию трансформантов осуществляли на среде, не содержащей триптофана. В результате во всех случаях было выявлено формирование *trp*⁺-рекомбинантов с частотой от 2,0·10⁵ до 1,9·10⁶, что свидетельствует о генетической гомологии изолированных микроорганизмов и является дополнительным доказательством их принадлежности к бактериям *B. subtilis* (см. табл. 2).



Электрофореграмма плазмидной ДНК, выделенной из природных штаммов *B. subtilis*:
1 – штамм 21Z; 2 – 4K31; 3 – 1; 4 – 57; 5 – N1; 6 – 2; 7 – 4; 8 – 8; 9 – 15; 10 – 19; 11 – штамм 72; а, б – плазмидная, б – хромосомальная ДНК

Проверка плазмидсодержащих штаммов на устойчивость к антибиотикам (Cm, Ap, Tc, Tr, Sm, Km, Rif, Ery в конечной концентрации 5, 10, 20 мкг/мл) позволила установить, что почти все исследуемые бактерии характеризуются чувствительностью к использованным препаратам. Исключение составляли штаммы 8, 15, 72, клетки которых способны расти в присутствии стрептомицина в концентрации 10 мкг/мл.

Элиминация признака антибиотикоустойчивости с использованием акридиновых красителей не позволила отобрать чувствительные к данному антибиотику варианты клеток. Этот факт свидетельствует о хромосомальной природе стрептомицинрезистентности и отсутствии маркеров антибиотикоустойчивости в составе плазмидных репликонов.

Таблица 1

Размеры плазмид, определенные на основании рестрикционного анализа

Плазмид	Размер, kb	Размер фрагментов рестрикции (kb), полученных с использованием ферментов			
		HindIII	EcoRI	Styl	PstI
21Z, 4K31	6,3	2,2+1,6+1,4+1,1	4,4+1,9	3,1+2,3+0,9	5,1+1,2
2, 4	8	3,0+2,0+1,6+1,4	8,0	3,5+2,1+1,3+1,1	4,7+2,0+1,3
15, N1	8	2,2+2,1+1,6+1,4+0,7	8,0	–	5,0+1,9+1,1
1, 57, 8	8	3,8+1,2+1,6+1,4	–	–	1,7+6,3

Примечание. Рестрикции плазмидной ДНК не наблюдалось (–).

Таблица 2

Характеристика плазмидсодержащих штаммов *B. subtilis*, выделенных из природных источников

Номер штамма	Источник выделения	Чувствительность к специфическим фагам <i>Bacillus subtilis</i>					Частота появления <i>trp</i> ⁺ -рекомбинантов <i>Bacillus subtilis</i> 168 (на 1 мкг ДНК)	Размер обнаруженных плазмид, kb
		AR1	AR3	AR9	θ105	SP01		
4K31	Дождевая вода (г. Минск)	+	–	+	–	+	0,8·10 ⁵	6,3
21Z	Поле (Минская обл.)	+	–	–	–	+	1,3·10 ⁵	6,3
1	оз. Святое (Гомельская обл.)	+	–	–	–	+	0,9·10 ⁵	8,0
8	Луг (Гродненская обл.)	+	+/-	+/-	+/-	+	1,5·10 ⁵	8,0>90,0
57	р. Бобрик (Брестская обл.)	+	–	–	+/-	+	1,9·10 ⁵	8,0>90,0
2	оз. Нарочь (Минская обл.)	+	+/-	+/-	–	+	1,1·10 ⁵	8,0>90,0
4	оз. Рясловское (Гомельская обл.)	+/-	–	–	–	+/-	1,3·10 ⁵	8,0>90,0
15	оз. Рясловское (Гомельская обл.)	+/-	+/-	+/-	+/-	+	0,2·10 ⁵	8,0>90,0
N1	оз. Нарочь (Минская обл.)	+/-	–	+/-	+/-	+	0,3·10 ⁵	8,0>90,0
19	Лес (Гродненская обл.)	+/-	–	–	–	+	1,1·10 ⁵	96,7
72	Клумба (Минская обл.)	+	+	+	+	+	1,3·10 ⁵	>90,0

Примечание. Хорошо выраженные зоны лизиса (+); неотчетливые зоны лизиса (+/-); зоны лизиса отсутствуют (–).

Таким образом, в результате проведенного анализа были выделены штаммы *B. subtilis*, содержащие мелкие плазмиды (6,3 и 8,0 kb), и штаммы, наследующие крупные внехромосомные элементы (более 90 kb). Согласно данным, полученным другими авторами, для большинства штаммов *B. subtilis*, выделенных из природных источников, характерно наличие небольших по размеру криптических плазмид [18, 19]. Причем размер внехромосомных генетических элементов, как правило, коррелирует с определенным типом репликации, в частности, плазмиды размером до 10 kb в основном копируются в соответствии с механизмом «катящегося кольца» [20], тогда как плазмиды более 10 kb реплицируются через тета-структуру [21]. Следует отметить, что крупные плазмиды *B. subtilis* практически не изучены, и в настоящее время наиболее детально охарактеризована лишь одна из них – pLS20 – размером 55 kb [22]. Тем не менее именно крупные плазмиды, механизм репликации которых сходен с таковым бактериальной хромосомы, представляются наиболее перспективными для использования в различного рода генетических исследованиях, в частности для определения особенностей механизма копирования геномов *B. subtilis* [23], а также создания на их основе векторных систем, пригодных для молекулярного клонирования [21]. Собранная в процессе работы коллекция плазмидсодержащих штаммов *B. subtilis* фактически является уникальной, поскольку клетки восьми из одиннадцати штаммов содержат крупные плазмиды размером более 90 kb, что позволяет их рассматривать в качестве нового класса внехромосомных элементов *B. subtilis*.

Авторы приносят глубокую благодарность Ю.К. Фомичеву за оценку полученных результатов.

- Bernhard K., Schrempf H., Goebel W. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 133. P. 897.
- Hardy F., Vriend G., van der Vinne B. et al. // Protein Eng. 1994. Vol. 7. P. 425.
- Leifert C., Li H., Chidburee S. et al. // J. Appl. Bacteriol. 1995. Vol. 78. P. 97.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I. et al. // Nature. 1997. Vol. 20. P. 249.
- Top E.M., Moenne-Loccoz Y., Pembroke T., Thomas C.M. // The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmid and Gene Spread. Amsterdam, 2000. P. 249.
- Чернин Л.С. // Итоги науки и техники. Микробиология. 1985. Т. 15. С. 150.
- Holloway B.W. // Plasmid. 1979. Vol. 2. P. 1.
- Simon R., Priefer U., Puhler A. // Biotechnology. 1983. Vol. 1. P. 784.
- Renault P., Corthier G., Goupil N. et al. // Gene. 1996. Vol. 183. P. 175.
- Baum J.M., Coyle D.M., Gilbert M.P. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56. P. 3420.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
- Козловский Ю.Е., Прозоров А.А. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 258. С. 1457.
- Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. 1961. Vol. 81. P. 741.
- Birnboim H.C., Doly J. // Nucleic Acids Res. 1979. Vol. 7. P. 1513.
- Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 8. P. 2541.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
- Лотарева О.В., Незамединова В.З., Федорина Е.А. и др. // Генетика. 2001. Т. 37. С. 1598.
- Tanaka T., Koshikawa T. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 131. P. 699.
- Uozumi T., Ozaki A., Beppu T., Arima K. // J. Bacteriol. 1980. Vol. 142. P. 315.
- Khan S.A. // Genetic Engineering. 1996. Vol. 18. P. 183.
- Janniere L., Gruss A., Ehrlich S.D. // *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Washington, 1993. P. 625.
- Meijer W.J.J., de Boer A.J., Tongeren S. et al. // Nucleic Acids Res. 1995. Vol. 23. P. 3214.
- Dervyn E., Suski C., Daniel R. et al. // Science. 2001. Vol. 294. P. 1716.

Поступила в редакцию 22.11.2002.

Марина Алексеевна Титок – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.

Алексей Викторович Лагодич – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – М.А. Титок.

Юлия Валерьевна Селезнева – младший научный сотрудник кафедры микробиологии.