

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ pBS72 БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

А. С. Гуринович

Белорусский государственный университет, г. Минск

nastia.gurinovich96@gmail.com

науч. рук. – М. А. Туток, д-р биол. наук, проф.

В результате настоящего исследования установлено широкое распространение плазмиды тета-типа pBS72 в клетках природных бактерий рода *Bacillus*, изолированных на территории Беларуси, Нидерландов, Индии, Пакистана и Австралии. Анализ полной нуклеотидной последовательности данного внехромосомного генетического элемента размером 102 254 п.н. выявил присутствие генов, определяющих синтез белков, влияющих на функции клеточного метаболизма. Показано, что присутствие плазмиды pBS72 в клетках *B. subtilis* 19 достоверно увеличивает их выживаемость в среде с повышенной осмоларностью (в присутствии 7,5 % NaCl).

Ключевые слова: плазида; геном; стрессоустойчивость.

Плазмиды не являются обязательными структурами бактерий, но в ряде случаев могут обеспечивать выживание содержащим их микроорганизмам в стрессовых условиях среды. Определенный интерес представляют плазмиды, широко использующиеся в биотехнологии бактерий *B. subtilis*. В клетках этих повсеместно распространенных в естественной среде обитания бактерий в основном обнаруживаются небольшие плазмиды размером до 10 kb, копирующиеся в соответствии с механизмом «разматывающегося рулона», и достаточно редко выявляются плазмиды тета-типа размером более 40 kb [1]. Эти плазмиды относят к разряду криптических, поскольку не содержат генетических маркеров, обеспечивающих явно выраженные фенотипические признаки (гены антибиотикорезистентности, биodeградации, синтеза токсинов). Показано, что в состав их геномов входят гены, продукты которых могут регулировать отдельные этапы метаболизма бактериальной клетки (в частности, Рар-белки, регулирующие синтез вторичных метаболитов, спорообразование, компетентность и способность формировать биоплёнки) [2]. Однако функциональная роль плазмид и отдельных генетических детерминант, входящих в их состав, практически не исследована. Изучение влияния внехромосомных генетических структур на процессы жизнедеятельности бактерий *B. subtilis* позволит в полной мере охарактеризовать генетический аппарат этих биотехнологически важных микроорганизмов.

Целью настоящей работы являлось изучение распространения, особенностей генетической организации и влияние плазмиды pBS72 на жизнеспособность бактерий *B. subtilis* в стрессовых условиях среды. В работе использовали микробиологические (культивирование бактерий),

молекулярно-генетические (выделение ДНК из почвы, ПЦР-анализ), физические (электрофоретический и спектрофотометрический анализ) и информационные (BLASTN2.2.1 сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) методы исследования.

Ранее с использованием разных методов (выделение плазмидной ДНК, гибридизация, ПЦР-анализ) установлено, что 20 % природных штаммов бактерий *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, содержат плазмиды идентичные pBS72 (обнаружена в 11 штаммах из 55 проверенных) [3]. В ходе настоящей работы использование несколько иного методического подхода позволило выявлять присутствие бактерий, содержащих репликон pBS72, непосредственно в почвенных образцах. Для этого из почвы выделяли тотальную ДНК, которую использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции с праймерами, обеспечивающими амплификацию фрагментов генов бактериальных 16S рРНК, генов *spoA* *B. subtilis* и уникальной области плазмиды pBS72 размером 685 п.н. (содержит *orf138* и *orf139*). В результате из 36 исследованных образцов почвы, содержащей бактерии (получены ампликоны генов 16S рРНК), в 22 обнаружены бактерии *B. subtilis* (получены ампликоны гена *spoA*), из которых 6 образцов содержали репликоны pBS72 (получены ампликоны фрагмента плазмиды pBS72). Использованный подход позволил установить, что в 27 % почвенных изолятов присутствуют бактерии *B. subtilis*, содержащие репликон pBS72. Сравнение Rep-белка плазмиды pBS72 с известными, депонированными в ГенБанк NCBI, позволил выявить идентичные на 99 % белки, синтез которых детерминирован генами, входящими в состав геномов четырех штаммов бактерий *B. subtilis* BCM26, BOH71, MB378, MB415, выделенных на территории Пакистана из загрязненной нефтепродуктами почвы (ODV48082.1, OJH64027.1, NZ_MBPE01000006 NODE_15 и NZ_MQSR01000011 NODE_14 соответственно), штамма бактерий *B. subtilis* B4071, выделенного в Нидерландах из кари супа (KIN41328.1 NODE_32). Сходные плазмиде pBS72 внехромосомные генетические элементы были выявлены в штамме *B. paralicheniformis* G-1, выделенного из сухого молока в Австралии (NZ_AZSK00000000) и в штамме *Bacillus sp.* MSP1, изолированного из засоленного пруда в Индии (NZ_JXAQ01000015 NODE_00018).

Размер генома плазмиды pBS72 составляет 102 254 п.н. В состав плазмиды входят 142 открытые рамки считывания, из них 49 кодируют белки с известными функциями и 93 определяют синтез гипотетических полипептидов. Около 1/4 всего генома представлено генами, детерминирующими белки конъюгации (*orf21–orf57*).

Содержание ГЦ-пар плазмиды составляет 35 %, что отличается от ГЦ-состава хромосомы бактерий хозяев (содержания ГЦ-пар у бактерий *B. subtilis* составляет 43–45 %).

Сравнительный анализ белков, кодируемых открытыми рамками считывания, позволил их условно разделить на 4 группы. Первую группу составили транскрипционные факторы, белок, содержащий TIR-домен, который может участвовать в регуляции метаболизма, а также Rap-белок (всего 6 белков). Вторая группа представлена трансмембранными белками (всего восемь белков), в которые входит гистидин-киназа и регулятора ответа. В третью группу включены белки (всего 8 белков), предположительно выполняющие защитную функцию (две метилтрансферазы, рестриктаза и белки, участвующие в процессе SOS-репарации). В четвертую группу включены белки, предположительно обладающие ферментативной активностью (некоторые из них являются характерными для бактериофагов), а также tРНК цистеина. Следует отметить, что перечисленные белки наделены определенными функциями условно и их функциональная значимость может быть установлена только на основании генетического анализа.

В бактерии *B. subtilis*72, содержащие плазмиду pBS72, был введен ее мини-репликон, с последующим культивированием отобранных трансформантов в неселективных условиях, что позволило отобрать бесплазмидный вариант. Наличие изогенных бактерий, содержащих и не содержащих плазмиду pBS72, позволило сравнить их свойства. Для этого бактерии в логарифмической фазе роста подвергали в течение трех часов воздействию стрессовых факторов (высокая и низкая концентрация ионов водорода, повышенная осмолярность). В результате было установлено, что присутствие плазмиды достоверно увеличивает выживаемость бактерий на среде, содержащей 7,5 % NaCl (рисунок).

Выявлены отличия в выживаемости бактерий в среде с низкой и высокой концентрацией ионов водорода. Показано, что в среде с низкой концентрацией ионов водорода (рН4,5) небольшое преимущество имеют бактерии, содержащие плазмиду pBS72. В частности, после трех часов культивирования выживаемость плазмидного варианта в среде с рН4,5 составила 30,57 %, а бесплазмидного – 18,16 %. В среде с высоким значением рН (рН11) после культивирования в течение часа выживаемость плазмидного варианта составила 39,64 %, а бесплазмидного – 23,99 %, а затем наблюдали снижение выживаемости для обоих штаммов.

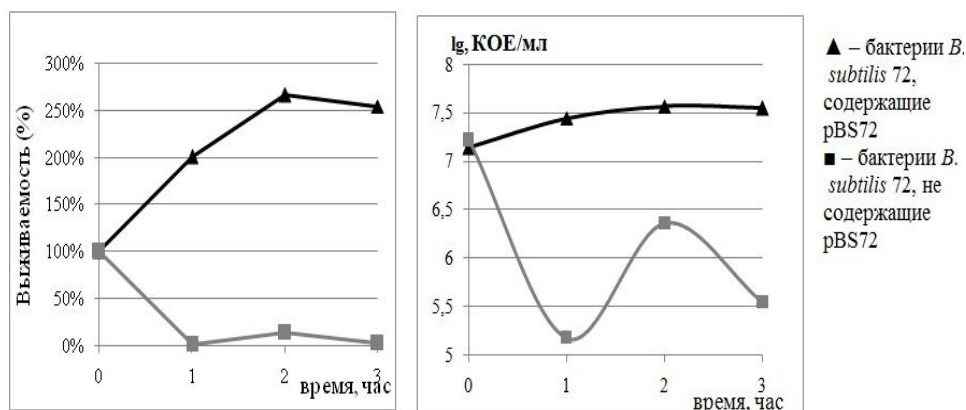


Рис. Выживаемость и динамика роста бактерий *B. subtilis* 72 в среде, содержащей 7,5 % NaCl

Изучение динамики роста плазмидного и бесплазмидного вариантов при температурах 37 °С, 45 °С и 54 °С не выявило отличий. Не установлена разница в жизнеспособности спор, поскольку в результате термической обработки бактерий (кипячение в течение 40 и 60 минут) с последующим культивированием при 37 °С количество формирующихся колоний на плотной агаризованной среде было примерно одинаковым.

Таким образом, в результате настоящего исследования установлено, что в 27 % почвенных изолятах, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, присутствуют бактерии *B. subtilis*, содержащие репликон рBS72. Сравнительный сиквенс-анализ позволил установить, что внехромосомные генетические элементы, подобные рBS72 присутствует в клетках природных бактерий *B. subtilis*, *B. paralicheniformis* и *Bacillus* sp., изолированных на территории Нидерландов, Пакистана, Индии и Австралии. Анализ полной нуклеотидной последовательности данного внехромосомного генетического элемента размером 102 254 п.н. выявил присутствие генов, определяющих синтез белков, влияющих на функции клеточного метаболизма. Показано, что присутствие плазмиды рBS72 в клетках *B. subtilis* 19 достоверно увеличивает их выживаемость в среде с повышенной осмолярностью (в присутствии 7,5 % NaCl).

Библиографические ссылки

1. Титок, М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. Минск: БГУ, 2004.
2. A plasmid-born Rap-Phr system regulates surfactin production, sporulation and genetic competence in the heterologous host, *Bacillus subtilis* OKB105 / Yang Y [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. 2015. V. 99. № 17. P. 7241–7252. DOI: 10.1007/s00253-015-6604-3.
3. Титок М.А., Лагодич А.В., Селезнева Ю.В. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников // Вестник БГУ. 2003. Сер. 2. № 3. с. 35–38.